

EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E ÍNDICE DE REPARACIÓN EN EL EPITELIO BUCAL DE NIÑOS EXPUESTOS AL HUMO DE COMBUSTIBLES SÓLIDOS MEDIANTE EL ENSAYO CITOMA DE MICRONÚCLEOS

JEYSON PERAFAN COLLAZOS
ALDAIR BERYERY ROSERO CALDON

Trabajo de grado para optar a título de biólogo

Director
NOHELIA CAJAS SALAZAR
PhD D

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
TOXICOLOGÍA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2013

EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E ÍNDICE DE REPARACIÓN EN EL EPITELIO BUCAL DE NIÑOS EXPUESTOS AL HUMO DE COMBUSTIBLES SÓLIDOS MEDIANTE EL ENSAYO CITOMA DE MICRONÚCLEOS

JEYSON PERAFAN COLLAZOS
ALDAIR BERYERY ROSERO CALDON

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
TOXICOLOGÍA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2013

Nota de Aceptación

Director

Nohelia Cajas Salazar Ph.D

Jurado

Elizabeth Londoño Velasco. Biol

Jurado

Sulma Muñoz Benítez. MSc

15 de abril del 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos inmensamente a Dios quien nos ha guiado y permitido llegar hasta este punto, darnos la fortaleza para lograr los objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A nuestras familias, por habernos apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, ejemplos de perseverancia y constancia, por la motivación pero más que nada, por su amor.

A nuestra directora la PhD Nohelia Cajas Salazar, por aceptarnos para realizar este trabajo de grado, su importante aporte y participación en el desarrollo de nuestra formación investigativa, su disponibilidad y paciencia siempre, sus ideas enmarcadas en su orientación y rigurosidad, que fueron clave en el buen trabajo realizado.

A la comunidad de los municipios del Tambo y Morales incluidas en el trabajo de investigación, quienes voluntariamente siempre nos ofrecieron su ayuda y generosidad.

A los jurados, MSc Sulma Muñoz Benitez y la Bióloga Elizabeth Londoño, por sus invaluable aportes y correcciones, no cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado, y más que nada por la amistad brindada.

Al grupo de investigación en toxicología genética y citogenética de la universidad del cauca, en especial a Elsa Betty Velasco, por su gran amistad y colaboración constante durante la formación académica y el desarrollo del trabajo de grado.

Al grupo de investigación de genética humana aplicada, en especial a Fabián Hurtado, Walter Gonzales y la profesora Rosa Alvarez por su colaboración y conocimientos.

A nuestro excelente amigo Felipe Polanco, porque siempre estuvo y estará ahí, brindándonos su valiosa amistad.

A Carolina Ortega, por su colaboración, cariño, amor e interés durante nuestra formación académica y vida personal.

A nuestros compañeros, en especial Soallin Pineda, que nos brindaron su apoyo y jovialidad durante la carrera.

A los profesores que dejaron huella e inspiraron nuestros sueños de seguir en la vida académica, especialmente la profesora Luz Stella Hoyos, Silvio Carvajal, Hildier Zamora y Edna Orozco.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 COMBUSTIBLES SÓLIDOS.....	18
3.2 MONITOREO BIOLÓGICO.....	19
3.3. EPITELIO DE LA MUCOSA BUCAL.....	19
3.4 BIOMARCADORES CITOGENÉTICOS	20
3.5 ENSAYO CITOMA DE MICRONÚCLEOS.....	21
3.5.1 Células con micronúcleos (MNi).....	21
3.5.2 Células con yemas nucleares (NBUD)	22
3.5.3 Células binucleadas	22
3.5.4 Células con cromatina condensada.....	23
3.5.5 Células cariorrécticas (KR).....	23
3.5.6 Células picnóticas.....	23
3.5.7 Células cariolíticas (KL).....	23
3.6 ÍNDICE DE REPARACIÓN (IR).....	24
4. ANTECEDENTES.....	25
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
6. MARCO METODOLÓGICO.....	29
6.1 TIPO DE ESTUDIO	29
6.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.....	29
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	29
6.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA	29
6.5 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CÉLULAS DEL EPITELIO DE LA MUCOSA BUCAL	30

6.6 ENSAYO CITOMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS BUCALES (PREPARACIÓN CELULAR, TINCIÓN, REGISTRO).	30
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
7. RESULTADOS.....	33
7.1 CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.....	33
7.2 EFECTO GENOTÓXICO, CITOTÓXICO Y DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REPARACIÓN EN CÉLULAS BUCALES DE NIÑOS EXPUESTOS AL HUMO DE COMBUSTIBLES SÓLIDOS.....	36
7.2.2 FRECUENCIA DE LOS BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDAD O MUERTE CELULAR.....	37
7.2.3 ÍNDICE DE REPARACIÓN.....	38
7.3 EFECTO MODULADOR DEL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN, SOBRE LOS BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD: MICRONÚCLEOS Y CÉLULAS BINUCLEADAS.....	38
7.4 EFECTO DE LAS VARIABLES DEL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN SOBRE LOS BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDAD O MUERTE CELULAR	41
7.5 CORRELACIONES ENTRE MICRONÚCLEOS, CÉLULAS BINUCLEADAS, ÍNDICE DE REPARACIÓN Y BIOMARCADORES DE MUERTE CELULAR.	44
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	60
10. RECOMENDACIONES	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización Demográfica de la población objeto de estudio.	33
Tabla 2. Condiciones de salud de la población objeto de estudio.	35
Tabla 3. Caracterización de la exposición.	36
Tabla 4. Frecuencia los biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad e índice de reparación en la población de estudio.	38
Tabla 5. Efecto de las variables demográficas, del estilo de vida y la exposición sobre la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas.....	39
Tabla 6. Efecto de las variables demográficas, del estilo de vida y exposición sobre las frecuencias de los biomarcadores de muerte celular.	43
Tabla 7. Correlaciones entre los biomarcadores de genotóxicidad, citotoxicidad e índice de reparación	44

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Estratificación del epitelio bucal	20
Figura 2. Tipos de células obtenidas mediante el ensayo citoma de micronúcleos.....	24
Figura 3. Biomarcadores de genotoxicidad y muerte celular	37
Figura 4. Asociación de la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas y el tiempo de exposición.....	41
Figura 5. Asociación de los biomarcadores de muerte celular el tiempo de exposición....	42

RESUMEN

En el mundo 3000 millones de personas utilizan intensivamente los combustibles sólidos como principal fuente de energía, en actividades como cocinar y calefacción, siendo éste el primer factor de contaminación intradomiciliario. El uso de combustibles sólidos y por ende la carga de morbilidad asociada a éstos se ha convertido en un problema de salud pública, que tanto la OMS, la ONU y los gobiernos han propuesto disminuir mediante el desarrollo de programas de intervención y de epidemiología molecular. Para contribuir con esta iniciativa realizamos el estudio del riesgo potencial a desarrollar enfermedades en una población de 108 niños de 5 a 15 años en zonas rurales del departamento del Cauca, con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico, genotóxico e índice de reparación en el epitelio bucal de niños expuestos al humo de combustibles sólidos, utilizando el ensayo citoma de micronúcleos con tinción diferencial del ADN. Los resultados obtenidos mostraron el aumento de la frecuencia de micronúcleos, células binucleadas e índice de reparación en el grupo expuesto, es decir, una frecuencia de micronúcleos 2 veces más elevada y una frecuencia de células binucleadas 1,7 veces más alta, comparadas con el grupo referente. No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Sin embargo, cuando se ajustaron a factores del estilo de vida y de la exposición, se observa un incremento significativo entre la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas en los niños expuestos ($p < 0,05$). Por otro lado, las células cariolíticas, cariorréticas, con cromatina condensada y picnóticas eran significativamente más altas en el grupo de niños expuestos a humo de combustibles sólidos ($p < 0,01$) comparado con el grupo referente. En conclusión el presente estudio sugiere que la población de niños expuestos está en riesgo a desarrollar problemas de salud crónicos, pues los datos de citotoxicidad y genotoxicidad obtenidos mediante el ensayo citoma de micronúcleos, incluyen biomarcadores de exposición que permiten evaluar la toxicidad de los compuestos presentes en la contaminación intradomiciliaria por la combustión incompleta de los combustibles sólidos.

INTRODUCCIÓN

El 50% de la población mundial y en Colombia el 62% de la población en zonas rurales utilizan combustibles sólidos para generar energía en actividades tales como cocinar, y calefacción (DANE, 2005; Rehfuess, 2007). Por lo tanto, se ven afectados directamente por los tóxicos que se generan durante su combustión, (IARC, 2006), de los que se destacan hidrocarburos aromáticos policíclicos, monóxido de carbono, óxido nitroso, óxido sulfuroso, ozono y material particulado (PM10 y PM2.5) (Smith et al., 2000; WHO, 2006), clasificados según la IARC en los grupos 1 A y 2 A. Serios problemas de salud especialmente en los niños han sido ligados al uso de combustibles sólidos, ya que en la infancia los mecanismos de metabolismo, absorción, sistema inmune y excreción, están aún en proceso de desarrollo (fisiológicamente inmaduros) (Neri et al., 2006; Rehfuess, 2007); confiriendo mayor susceptibilidad y provocando enfermedades respiratorias crónicas como neumonía, asma e infecciones respiratorias bajas; que se agravan en la adultez, y pueden resultar en el desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o cáncer de pulmón (ONU, 2003; Rehfuess et al., 2011). La exposición prolongada a la contaminación en interiores por humo de combustibles sólidos está asociada al 4% de la carga mundial de morbilidad y puede ser responsable de casi 2 millones de muertes en países en vía de desarrollo; esta cifra incluye las 800.000 defunciones infantiles al año (Rehfuess, 2007; Van Lerberghe, 2008).

Estudios indican que los mecanismos tóxicos de los componentes del humo de combustibles sólidos causan cambios citotóxicos y genotóxicos en poblaciones humanas (Bravo and Leon, 2008; Mondal et al., 2011), pero hasta ahora son pocos los estudios que se han conducido en la población infantil (Sisenando et al., 2012). El gran impacto de la exposición al humo de combustibles sólidos sobre la salud pública, ha suscitado un interés de las instituciones nacionales e internacionales para plantear estrategias que lleven a una disminución del uso de

este tipo de combustibles como energético y reducir la exposición de mujeres y niños (Constituyente, 1991; ONU, 2003). Dado que en el departamento del Cauca el 62% de la población pertenece a áreas rurales, donde se utilizan combustibles sólidos, es importante identificar la magnitud del daño genético en la población infantil a través de técnicas no invasivas y sensibles, propósito que el estudio abordó dentro de sus objetivos.

El presente estudio fue conducido en 54 niños del departamento del Cauca expuestos al humo de combustibles sólidos y 54 referentes, usando el ensayo citoma de micronúcleos en células del epitelio bucal, con el fin de determinar la sensibilidad del biomarcador y evaluar el riesgo a desarrollar problemas de salud por exposición crónica en una población infantil. De esta manera se estaría construyendo un aporte de tipo científico, para que desde las entidades gubernamentales y de salud, se tomen las medidas respectivas que reduzcan el riesgo.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mitad de la población mundial y más del 70% de los hogares en zonas rurales especialmente en países en vía de desarrollo y de niveles socioeconómicos bajos, utilizan combustibles sólidos, incluida la biomasa sin procesar como estiércol, residuos de cultivos y madera, además del carbón mineral, para satisfacer las necesidades básicas de energía, principalmente cocinar y calefacción (Neymark and Judkoff, 2002; WHO, 2006). De hecho en Colombia, el 62% de las personas utilizan combustibles sólidos, convirtiéndolo en el sexto país de América Latina donde este tipo de combustibles son en su mayoría la leña, carbón de leña y carbón mineral (DANE, 2005; Rehfuss, 2007). El humo de combustibles sólidos en espacios cerrados da origen aproximadamente al 35,7% de las infecciones respiratorias bajas, el 22% de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas y el 1,5% de los cánceres de tráquea, bronquios y pulmón (WHO, 2002). Además, causa el 21% de las muertes por infecciones respiratorias bajas, el 35% por enfermedad pulmonar obstructiva crónica y cerca de 3% por cáncer de pulmón (WHO, 2009). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) han catalogado que la contaminación en interiores por combustibles sólidos esta entre las 10 primeras causas de morbilidad a nivel mundial y la segunda de tipo ambiental; clasificándolas como “carcinogénicas en el caso del carbón mineral y probablemente carcinogénicas para el uso de biomasa en los seres humanos” (grupo 1A y 2A, respectivamente) (IARC, 2006; Rehfuss, 2007; WHO, 2002).

Mujeres y niños son las personas que presentan mayor riesgo de exposición a la nociva contaminación del aire al interior del hogar, debido a que permanecen en el ambiente contaminado por muchas horas, con poca ventilación, sin protección alguna y generalmente la cocina no se encuentra separada en su totalidad del resto de la casa. Este riesgo ambiental, según la evidencia encontrada ejerce un efecto mayor en niños que en los adultos, porque en esta etapa presentan un

sistema inmune inmaduro, vías respiratorias en desarrollo e inhalan más aire en proporción a su peso (Neri et al., 2006; Rehfuess, 2007), haciéndolos vulnerables a enfermedades en etapas tempranas y a desarrollar enfermedades crónicas en la edad adulta (Landrigan et al., 2004; Perera et al., 2002). El material particulado en el humo de combustibles sólidos afecta el sistema respiratorio en niños desencadenando asma, neumonía e infecciones agudas de las vías respiratorias. La exposición durante la etapa de gestación está asociada al bajo peso al nacer, cardiopatía isquémica, enfermedad pulmonar intersticial y cáncer nasofaríngeo y laríngeo (Craig et al., 2008; Rehfuess, 2007). Las cifras de defunciones infantiles atribuibles a la exposición crónica al humo de combustibles sólidos llegan hasta los 800.000 por año y en Colombia para el año 2010 una tasa de mortalidad de 14 por cada 100.000 niños menores de 5 años son atribuibles al humo de combustibles sólidos, convirtiéndose en un problema de salud pública (DANE, 2005; Rehfuess, 2007).

El uso de combustibles sólidos como medio para obtener energía, es altamente ineficiente, por ejemplo, en el caso de la madera 1250 y 2000kg se requieren para generar el calor necesario en la cocción de las comidas (5GJ) (Albalak et al., 1999). La gran cantidad de humo emitido de la combustión incompleta genera acumulación de material particulado con diámetros inferiores a 10 micrones (PM10), y 2.5 micrones (PM2.5), estas últimas pueden penetrar en los bronquios y alveolos, al filtrarse por la vía “naso-oro-faríngea”, causando inflamación (Craig et al., 2008; Rehfuess et al., 2011). Estudios reportan que en las cocinas en países en vía desarrollo, las concentraciones del material particulado superan los niveles permitidos de 300-3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, incluso hasta llegar a los 30000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Kamens et al., 1985; Koch and Hansen, 2005; Saksena et al., 2004; Venkataraman et al., 2005). Las inmensas nubes contienen elevadas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos, monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), ozono (O₃), óxido nítrico (NO), óxido sulfuroso (especialmente del carbón mineral)

(IARC, 2006; WHO, 2002), y la concentración de benzopireno equivale al consumo de 2 cajetillas de cigarrillo por día (Bruce et al., 2000).

Actualmente son carentes los estudios que establezcan el estado de salud y los efectos genotóxicos y citotóxicos en los tejidos blancos en las poblaciones expuestas, especialmente en la población infantil, que permitan dilucidar los eventos tempranos que conllevan al desarrollo de la enfermedad y las variables que modulen la toxicidad de los combustibles sólidos. Además la problemática se agrava por falta de educación y de conciencia pública, especialmente en áreas rurales donde el nivel de escolaridad es bajo y se desconoce los problemas de salud generados por la exposición residencial al humo de combustibles sólidos.

Las áreas de toxicología genética y epidemiología molecular contribuyen a establecer parámetros de medición mediante el uso de biomarcadores sensibles y tejidos de fácil obtención por métodos no invasivos, que permiten evaluar la magnitud del daño a nivel genético en esta población. Por lo tanto la presente investigación respondió a las siguientes preguntas, ¿el humo de combustibles sólidos produce daños en el material genético de las células de la mucosa oral en niños expuestos de manera crónica?, y si es así ¿el ensayo citoma de micronúcleos utilizando la tinción específica para el ADN (Fuelgen-Fast Green) y estimación del índice de reparación son biomarcadores sensibles para detectar este efecto genotóxico y citotóxico?

2. JUSTIFICACIÓN

Por el gran impacto que tiene la contaminación intradomiciliaria en la salud de la población mundial, uno de los objetivos de desarrollo del milenio planteados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas (ONU) es la necesidad de implementar estrategias entre los diferentes gobiernos para disminuir la utilización de biomasa y carbón mineral como energía, reemplazándolos con métodos más eficientes y limpios (ONU, 2003). En Colombia, la política de prevención y control de la contaminación del aire que se orienta por los principios fundamentales consagrados en la Constitución Nacional, específicamente en la Ley 99 de 1993 y la normatividad ambiental que la desarrolla, plantea dentro de sus objetivos identificar las principales fuentes de emisión de los contaminantes que afectan la salud humana y el bienestar de la población, en especial el de la niñez (Constituyente, 1991). Siguiendo el interés de las instituciones nacionales e internacionales por abordar la problemática y con el objetivo de contribuir en esta iniciativa, el presente estudio permitió evaluar la magnitud del efecto a nivel genotóxico y citotóxico producido por la exposición residencial al humo de combustibles sólidos en niños del departamento del Cauca, y a su vez determinar cómo los factores del estilo de vida, demográficos y ambientales propios de nuestra región modulan el riesgo.

El estudio fue conducido en niños del departamento del Cauca que tenían un rango de edad de 5 a 15 años, debido a que las poblaciones infantiles se ven afectadas en menor proporción por factores de confusión como el hábito de fumar, consumir alcohol y exposición ocupacional (Neri et al., 2003b), y en gran medida también, porque son un grupo muy importante para evaluar el riesgo a desarrollar enfermedades ambientales. Estudios demuestran la alta vulnerabilidad de los niños a los tóxicos y agentes genotóxicos presentes en el ambiente, producto del estado aun en desarrollo de sus mecanismos del metabolismo, absorción, excreción, tasa de detoxificación, procesos de reparación del DNA, y proliferación celular (Armstrong et al., 2002; Landrigan et al., 2004; Neri et al., 2006; Rehfues

et al., 2011; Wessels et al., 2003). Estas particularidades, varían los patrones de exposición con respecto a los adultos, de tal modo que aunque los niños compartan un mismo ambiente con éstos, van a asimilar de manera diferente la exposición (Holland et al., 2008). Además el nivel y la duración de la exposición en niños y niñas podría ser modificado por la fisiología y el comportamiento, puesto que una frecuencia respiratoria más acelerada los hace inhalar altas dosis de aire, ocasionando un consumo desproporcionado de agentes tóxicos (Bonassi et al., 2011), y según la EPA 2003 la contaminación del aire intradomiciliario afecta en mayor proporción a la población infantil.

El biomonitoreo de poblaciones expuestas a factores de riesgo de tipo ambiental, como el humo de combustibles sólidos, usando biomarcadores citogenéticos y moleculares, ha sido una herramienta ampliamente utilizada para evaluar el impacto del genotipo, factores del estilo de vida y exposición a genotoxinas sobre la estructura del ADN, segregación de los cromosomas, proteínas encargadas de la división celular y también los procesos de muerte celular (Thomas et al., 2009). El uso del ensayo citoma de micronúcleos en células del epitelio bucal posee importantes ventajas, ya que, el proceso para obtener los extendidos celulares, así como su tinción son rápidos, económicos y permiten que se lleve a cabo en células en interfase, las cuales son de fácil adquisición por métodos no invasivos, posibilitando su uso en estudios con poblaciones infantiles para monitorear eventos genotóxicos tempranos producidos en las células basales como resultado de carcinógenos potenciales que entran al cuerpo a través de ingestión o inhalación (Bonassi et al., 2011). Son pocos los estudios que existen en la literatura científica que incluyan como población vulnerable a niños expuestos al humo de combustibles sólidos, por, lo anterior, nuestro estudio identificó el efecto citotóxico, genotóxico e índice de reparación en la población infantil expuesta crónicamente al humo de combustibles sólidos y evaluó, si el biomarcador es lo suficientemente sensible para detectar el daño que se está produciendo en células

de la mucosa bucal, de tal manera que se pueda proponer como un sistema de evaluación de riesgo temprano en esta población.

Estudios en micronúcleos con células exfoliadas bucales muestran resultados inconsistentes con muchos falsos positivos debido a la tinción clásica con Giemsa que no permitía diferenciar micronúcleos de estructuras similares producto de restos celulares o precipitados de los reactivos usados. En los últimos años en el ensayo citoma de micronúcleos se han implementado metodologías en las que utilizan tinciones específicas para el ADN. Por lo tanto es importante conducir estudios con este nuevo método de tinción específico (Fuelgen-Fast Green) y evaluar la sensibilidad del ensayo citoma de micronúcleos en el monitoreo de poblaciones expuestas. Además, contribuir con la validación como biomarcador de efecto y como herramienta para asociación temprana de riesgo a padecer enfermedades por exposición de tipo ambiental, envejecimiento acelerado, cáncer y enfermedades neurodegenerativas siguiendo la recomendaciones internacionales y dentro del contexto que viene desarrollando el proyecto de micronúcleos humanos en células bucales exfoliadas (HUMNxl) (Bonassi et al., 2011; Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009).

La realización del presente estudio permitió la formación investigativa de dos estudiantes de pregrado, puesto que fueron capacitados en las metodologías de trabajo con poblaciones humanas, tratar variables de exposición y conducir un monitoreo biológico. Al mismo tiempo, se estará aportando información valiosa a la comunidad expuesta, a la comunidad científica, a las entidades de salud pública para que se tomen medidas de prevención y disminuir los efectos adversos sobre la salud de los niños expuestos al humo de combustibles sólidos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 COMBUSTIBLES SÓLIDOS

Son aquellos sólidos que emiten o desprenden energía por combustión controlada (energía química) capaces de plasmar su contenido energético en trabajo. Una amplia variedad de combustibles que se basan en biomasa y carbón se utilizan en los hogares de los países en desarrollo para cocinar y calefacción. Así, La biomasa, se define como un conjunto de material biológico (organismos vivos y sus derivados) que está presente en un área específica, siendo la combustión de ésta un evento que ha acompañado al hombre desde sus inicios (Core et al., 1984). La madera (Calderón-Segura et al.) es la biomasa más comúnmente utilizada en el mundo (de Koning et al., 1985), para la obtención de energía, de una manera no procesada o como carbón vegetal (Saksena et al., 2004; Smith, 1987). La combustión de la madera húmeda o seca da lugar a la formación de una gran cantidad de humo, generando una contaminación al interior de los hogares y por ende a una exposición intensiva al humo producto de la combustión incompleta. La toxicidad que genera el humo se debe a los componentes inhalados a través de las vías respiratorias, generando patologías que van desde neumonía en niños, hasta cáncer de pulmón en adultos.

La combustión incompleta de combustibles sólidos a partir de la condensación de gases (Naeher et al., 2007), da lugar a una variedad de compuestos, entre los que se encuentran: material particulado, que dependiendo del tamaño pueden viajar dentro y a través del tracto respiratorio (Hays et al., 2002; Kleeman et al., 1999). Son partículas con un diámetro menor a $2,5\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$ fácilmente transportadas), y partículas inhalables con un diámetro menor a $10\mu\text{m}$ (PM_{10} , no pueden ser transportadas a larga distancia). Igualmente, se encuentran muchos compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, incluyendo monóxido de carbono, ozono y dióxido de nitrógeno, del cual del 5-20% corresponde a una variedad de fracciones

de carbono orgánico y radicales libres del tipo semiquinona (Tian, 2006). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en los que se incluyen alcanos de 1-7 carbonos, alquenos con 2-7 carbonos (1,3-butadieno), compuestos aromáticos (benceno, tolueno, xileno, estireno), compuestos orgánicos parcialmente oxidados (alcanoles, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, alquil esterés y compuestos fenólicos metoxilados). En la fase gaseosa contienen algunos carcinogénicos como el benceno, el 1,3-butadieno y el formaldehído (Rogge et al., 1998; Saksena et al., 2004; Smith, 1987).

3.2 MONITOREO BIOLÓGICO

Permite la medición de los marcadores biológicos en medios indicadores humanos; cuya finalidad es brindar una medición de la dosis interna de exposición, el efecto o la susceptibilidad de una persona a determinada sustancia o agente que represente riesgo para la salud humana (Iarmarcovai et al., 2008). Un monitoreo biológico eficaz depende de la disponibilidad de técnicas analíticas sensibles, precisas y exactas para medir los marcadores biológicos, además, la recolección de especímenes debe estar estrictamente normalizada para minimizar la variación en el muestreo (Ünal et al., 2005). El uso del biomonitoreo de personas expuestas a factores del medio ambiente, genéticos y del estilo de vida ha provocado un creciente esfuerzo mundial para determinar el impacto de estos sobre la estabilidad genómica en poblaciones humanas (Bonassi et al., 1999). De esta manera permite identificar de forma temprana poblaciones en riesgo y así tomar estrategias de prevención.

3.3. EPITELIO DE LA MUCOSA BUCAL

Dentro de la cavidad bucal se encuentran el tejido escamoso y estratificado en varias capas (Shojaei, 1998; Squier and Brogden, 2011; Veiro and Cummins, 1994): el estrato germinativo, contiene células basales en continua división y células madre basales, que producen la progenie que diferenciadas mantienen el

perfil, la estructura y la integridad de la mucosa bucal; el estrato espinoso (capa de células espinosas), y el estrato granuloso (capa de células granulares) contienen una población de células diferenciadas, apoptóticas y necróticas; el estrato corneo (capa de células queratinizadas) es la línea de la cavidad oral que comprende células que están siendo constantemente renovadas como resultado del desgaste y rotura del tejido (Holland et al., 2008; Rosin, 1992; Shojaei, 1998; Squier and Kremer, 2001)

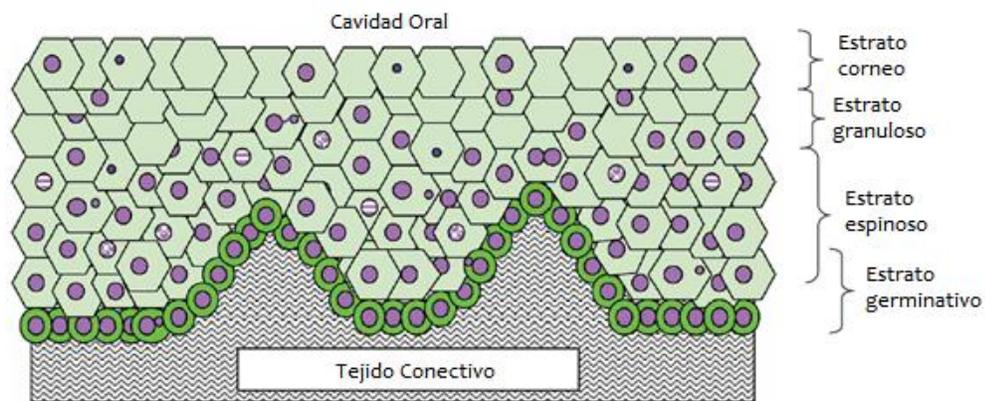


Figura 1 Estratificación del epitelio bucal, tomado y modificado de Tomas et al.,(2009)

3.4 BIOMARCADORES CITOGENÉTICOS

En el biomonitorio de poblaciones humanas es común el uso de los biomarcadores, definidos como, cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico (Collins, 1998). Las propiedades que debe poseer un buen biomarcador es la especificidad para una característica determinada, métodos de medición sensibles, detectables en muestras disponibles con facilidad, obtención poco invasiva; y el bajo costo de la técnica de determinación. En la toxicología genética los biomarcadores son utilizados para identificar y cuantificar agentes genotóxicos ambientales que pueden ser peligrosos cuando el hombre se ve expuesto. De este modo, estos marcadores de tipo biológico son indicadores de eventos moleculares y celulares

que permiten evaluar reacciones entre los factores ambientales y sus efectos sobre la salud humana (Perera and Weinstein, 2000). Los biomarcadores pueden ser de exposición, encargados de la medición cuantitativa y cualitativa de químicos o agentes físicos en el ambiente. Biomarcadores de efecto, son bioindicadores del estado del cuerpo o de un sistema orgánico afectado por la exposición a factores ambientales y biomarcadores de susceptibilidad, que permiten descifrar la variabilidad en la respuesta entre un individuo y otro, además reflejan susceptibilidad debido a factores genéticos y ambientales (Groopman et al., 1995).

3.5 ENSAYO CITOMA DE MICRONÚCLEOS

El ensayo citoma de micronúcleos; es una técnica citogenética sensible, mínimamente invasiva, económica y eficaz para medir parámetros citotóxicos y genotóxicos incluyendo: defectos citocinéticos (células binucleadas), potencial proliferativo (frecuencia de células basales), muerte celular (células con cromatina condensada, cariorréticas, picnóticas y cariolíticas) y daños en el ADN (micronúcleos y brotes nucleares)(Didenko, 2011). Estos parámetros han sido asociados a un incremento del riesgo en procesos como: envejecimiento prematuro, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Thomas et al., 2009). La técnica es utilizada ampliamente en estudios de epidemiología molecular para dilucidar el impacto de una variedad de factores de riesgo asociados al estilo de vida, dieta, exposición a genotóxicos y de origen genético, que ejercen su acción sobre el ADN y la muerte celular (Özkul et al., 1997; Sarto et al., 1990).

3.5.1 Células con micronúcleos (MNI)

Surgen durante la mitosis de las capas basales del epitelio en forma de partículas de ADN extra cromosómico, cuando fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros quedan rezagados durante la división celular y no se incluyen en el núcleo principal de las células hijas. La formación de MNI es inducida por sustancias que causan la rotura de cromosomas (clastógenos), así como por los agentes que afectan al huso acromático (aneugénicos)(Majer et al., 2001). Se caracterizan por

la presencia tanto de un núcleo principal y de una o más estructuras nucleares más pequeñas, son redondos y de forma ovalada, su diámetro oscila entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal (Holland et al., 2008). La formación de MN se utiliza como criterio de evaluación para detectar el daño citogenético en individuos expuestos (ver figura 2 A).

3.5.2 Células con yemas nucleares (NBUD)

El mecanismo que conduce a la formación de yemas nucleares no se conoce, puede estar relacionado con la eliminación de ADN amplificado o reparación del ADN (Nersesyan, 2005; Tolbert et al., 1992). Estas células contienen núcleos con un aparente estrechamiento agudo en un extremo del núcleo, producto de la eliminación de material nuclear por gemación. La yema nuclear y el núcleo están generalmente muy cerca y unidos entre sí. El brote nuclear tiene las mismas características de morfología y coloración que el núcleo, sin embargo, su diámetro puede variar de 1/2 a 1/4 del núcleo principal (ver figura 2 B).

3.5.3 Células binucleadas

Probablemente son indicativos de una falla en la citocinesis después de la última división nuclear en la capa de células basales. Se ha identificado que una mala segregación de los cromosomas es más frecuente en las células binucleadas que no logran completar la citocinesis. Este mecanismo identificado recientemente puede ser un puesto de control de la citocinesis en las células binucleadas aneuploides (Shi and King, 2005). Las células binucleadas se caracterizan por poseer dos núcleos principales en lugar de uno, con núcleos generalmente muy cerca y pueden entrar en contacto entre sí, usualmente tienen la misma morfología que las células normales (ver figura 2 C).

3.5.4 Células con cromatina condensada

Estas células quizás experimentan etapas iniciales de la apoptosis. Dan lugar a núcleos fragmentados, o la eventual desintegración, y, a veces parece contener cuerpos similares a la MNI, pero éstos no se califican como tal en el ensayo porque su origen no ha sido determinado (Thomas et al., 2009). Las células presentan un patrón nuclear estriado, donde la cromatina se agrupa en ciertas regiones del núcleo y en otras no (Tolbert et al., 1991b; Wyllie, 1981) (ver figura 2 D).

3.5.5 Células cariorréticas (KR)

Estas células pueden estar en una etapa tardía de la apoptosis, sin embargo no ha sido demostrado totalmente (Chen et al., 2006; Holland et al., 2008). Se caracterizan agrupaciones de cromatina extendida por todo el núcleo y un patrón nuclear densamente salpicado, indicativo de la fragmentación nuclear que conduce a la eventual desintegración del núcleo (Tolbert et al., 1991b; Wyllie, 1981) (Ver figura 2 E).

3.5.6 Células picnóticas

Se cree que estas células pueden ser sometidas a una forma única de muerte celular, aunque no se conoce su significado biológico ni como se forman. Pueden representar un mecanismo alternativo de la desintegración nuclear (Tolbert et al., 1991b; Wyllie, 1981). Se caracterizan por un pequeño núcleo encogido, con una alta densidad de material nuclear que es uniforme (Thomas et al., 2009; Tolbert et al., 1992). El diámetro nuclear es generalmente de 1/3 a 2/3 de un núcleo normal de una célula diferenciada (ver figura 2 F).

3.5.7 Células cariolíticas (KL)

Son células en las que el núcleo carece de ADN y este se visualiza como una imagen fantasma (Tolbert et al., 1991b; Wyllie, 1981). Por lo tanto, estas células

se caracterizan por representar una etapa tardía del proceso de muerte celular (ver figura 2 G).

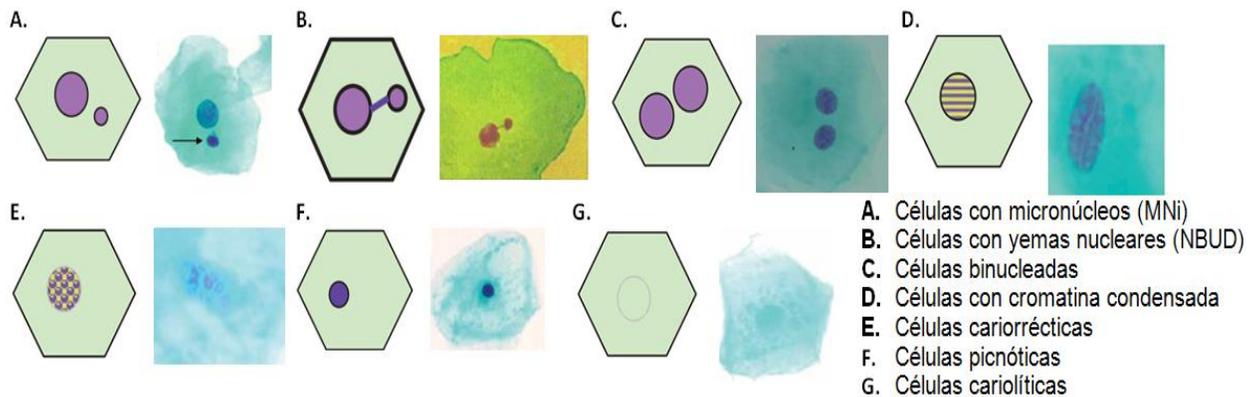


Figura 2 Diferentes tipos de células obtenidas mediante el ensayo citoma de micronúcleos, tomado y modificado de Tomas et al.,(2009)

3.6 ÍNDICE DE REPARACIÓN (IR)

Es un biomarcador utilizado para medir los efectos sobre la dinámica del tejido, producto de una exposición a agentes genotóxicos, mediante la relación de biomarcadores de daño celular (células cariolíticas KL y células cariorréticas KR) y biomarcadores de daño al ADN (células con micronúcleos MN y células con yemas nucleares BE), expresado en la fórmula: $RI = (KL + KR) / (MN + BE)$. Las células cariorréticas y yemas nucleares son considerados como estadios morfológicos previos a las células cariolíticas y la formación de micronúcleos, estas formaciones metanucleadas son analizadas juntas para seguir los estadios de degeneración nuclear: clastogénesis, mutagénesis y carcinogénesis, durante el proceso degenerativo de la homeóstasis del tejido epitelial de la mucosa oral. De esta manera el Índice de Reparación (IR), podría reflejar la dinámica del tejido epitelial hacia la carcinogénesis.(Ramirez and Saldanha, 2002).

4. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia humana, probablemente las exposiciones que generan mayor contaminación por partículas en el aire se produjeron en los hogares y se siguen produciendo, mediante el uso de combustibles sólidos como fuente de cocción, secado, y de energía para calefacción (Naeher et al., 2007). La combustión residencial de combustibles sólidos es ahora reconocida como una fuente importante de partículas en muchos países en vía de desarrollo, y el número de estudios que investigan los efectos negativos para la salud asociados con la exposición al humo de este tipo de combustibles está aumentando en la actualidad (Bølling et al., 2009).

Según la IARC y la Organización Mundial de la Salud, los problemas relacionados con el uso de la biomasa y carbón como recursos de energía han sido un tema de preocupación por más de 3 décadas; cuyo fenómeno se ve reflejado en la contaminación del aire al interior de los hogares y con mayor énfasis en los países en vía de desarrollo. Cuando se enfocó la atención en el problema de la contaminación al interior de los hogares se reveló el enorme potencial sobre la afectación de la salud; de hecho hay evidencia del vínculo con un mayor riesgo a padecer de infecciones del tracto respiratorio, exacerbaciones de enfermedades pulmonares inflamatorias, eventos cardíacos, apoplejía, enfermedades de los ojos, tuberculosis (TB), asma, problemas de vejiga, artritis, cáncer e ingresos hospitalarios por niveles altos de contaminación del aire (Smith, 2000). El aire en interiores según la EPA 2003 es uno de los medios que más contiene contaminantes dañinos para la población infantil (Wessels et al., 2003). Las enfermedades en niños asociadas a la contaminación al interior del hogar son comúnmente de tipo respiratorias (neumonía, bronquitis, infecciones, deterioro de función pulmonar, silbidos pectorales) (Boy et al., 2002; Dejmek et al., 1999; Mavalankar et al., 1991; Mishra et al., 2004; Schei et al., 2004; Šram et al., 2005) y problemas al nacer (patologías al nacer, bajo peso al nacer, deficiencia nutricional,

anemia y crecimiento retardado) (Black et al., 2003; Liang et al., 1988; Murray et al., 2001; Rudan et al., 2004).

Algunos estudios de toxicología genética han evaluado la mutagenicidad del humo de combustibles sólidos (Alfheim and Ramdahl, 1984; Asita et al., 1991; Hytonen et al., 1983). En todos los casos, los extractos del humo fueron mutagenicos en sistemas bacterianos. Una serie de factores, incluyendo condiciones de calentamiento y la concentración de HAP, parecen jugar un papel importante en la actividad mutagénica en general. Estudios realizados en animales revelan información acerca de la carcinogenicidad y la toxicidad a causa de los compuestos producidos por la combustión incompleta de combustibles sólidos. Una exposición crónica al humo de leña en ratas y ratones demostró un desarrollo de cáncer, generalmente clasificados como adenocarcinomas (Cupitt et al., 1994; Lewtas, 1993; Liang et al., 1988). Michael (1998) encontró una débil asociación al realizar un estudio caso-control con caninos para investigar si la exposición general a los fuegos de madera dentro de una residencia se asociaba con el riesgo de cáncer.

Estudios que evalúan la citotoxicidad y genotoxicidad en poblaciones humanas e *in vitro*, demostraron que la exposición al humo de la combustión incompleta de combustibles sólidos, genera un aumento de la frecuencia de MN, alteraciones cromosómicas, daño oxidativo del ADN, cambio en la expresión de genes (Bravo and Leon, 2008; Danielsen et al., 2008; Danielsen et al., 2009; Delgado et al., 2005; Herrera-Portugal et al., 2009; Kato et al., 2004; Musthapa et al., 2004). Actualmente solo hay un estudio sobre genotoxicidad asociada a la exposición al humo de combustibles sólidos en poblaciones infantiles, este trabajo fue realizado por Sisenando et al., (2012) donde niños expuestos a la combustión de biomasa tenían un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en células exfoliadas del epitelio bucal. Además, es importante describir que se han evaluado en el ambiente exterior algunos compuestos que hacen parte del humo, en forma individual. Un estudio alemán de biomonitorio en poblaciones humanas, evaluó la

exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos en trabajadores, madres y niños. Los niveles elevados de roturas de la cadena de ADN fueron detectados en las madres y sus hijos (aproximadamente de 6 años) en comparación con las madres y los niños de una zona rural (Wilhelm et al., 2007). Una exposición a productos químicos como los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en una población de niños <14años en la ciudad de México, indica que los altos niveles de HAP ambiental, representan un riesgo potencial para la salud, y además inducen un daño genético de gran importancia evaluado mediante el ensayo cometa y el biomarcador 1-Hidroxipireno (Sánchez-Guerra et al., 2012). Mediciones de los quiebres de cadena simple del ADN e incremento de los niveles de 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosina, en células del epitelio nasal en una población de niños <13 años expuestos a altos niveles de contaminantes ambientales, de la ciudad de México, indican que un daño oxidativo puede resultar en un crecimiento selectivo de células pre neoplásicas nasales, el cual puede aumentar con la edad (Calderón-Garcidueñas et al., 1999). Un incremento de las AC de linfocitos de sangre periférica se observó en niños de la República Checa durante los años 1980 y principios de 1990, expuestos a la contaminación por el uso de carbón vegetal en la industria metalúrgica y en plantas de energía, los cuales se vieron reducidos en años posteriores por factores del estilo de vida y en especial por el tipo de dieta (Rössner et al., 2002). Sin embargo, también existen otros estudios donde se evalúa la exposición al aire contaminado en niños, y a pesar de que se observa un incremento en los biomarcadores de daño al ADN en células bucales, este no es significativo (Çelik et al., 2003; Huen et al., 2006).

De lo anterior, se concluye la ausencia de estudios concretos que permitan medir el daño genético que están experimentando los niños al ser expuestos al humo de combustibles sólidos mediante biomarcadores sensibles y mínimamente invasivos, esto permite que el desarrollo del estudio tenga relevancia a nivel científico y social. De tal manera, que el uso del ensayo citoma de micronúcleos en células bucales se pueda proponer como un sistema de evaluación de riesgo temprano.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico, genotóxico e índice de reparación en el epitelio bucal de niños expuestos al humo de combustibles sólidos mediante el ensayo citoma de micronúcleos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto citotóxico y genotóxico por la exposición crónica al humo de combustibles sólidos en células del epitelio bucal, mediante la frecuencia de los biomarcadores de citotoxicidad o muerte celular (células con cromatina condensada, cariorréticas, picnóticas y cariolíticas) y daño genotóxico (micronúcleos, yemas nucleares y células binucleadas), analizados mediante el ensayo citoma de micronúcleos.

Establecer el índice de reparación del epitelio bucal de niños expuestos al humo de combustibles sólidos y compararlo con los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad.

Identificar la asociación entre variables como la edad, dieta, etnia, peso al nacer, características de la exposición y la frecuencia de los biomarcadores analizados para el ensayo citoma de micronúcleos

6. MARCO METODOLÓGICO

6.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio se realizó a través de un monitoreo genético, de tipo corte transversal, utilizando biomarcadores de efecto mediante el ensayo citoma de micronúcleos, en un grupo de niños en el departamento del Cauca. El tamaño de la muestra de la población se realizó por conveniencia.

6.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

La población objeto de estudio está conformada por 54 niños con edades de 5 a 15 años expuestos al humo de combustibles sólidos y 54 niños referentes no expuestos al factor de riesgo, provenientes de zonas rurales de los municipios del Tambo y Morales del departamento del Cauca.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Para incluir a los niños en el estudio debieron estar dentro del rango de edad, que habitaran en el departamento del Cauca, no consumir o estar expuestos directamente al humo de cigarrillo, sustancias tóxicas en general como plaguicidas, sustancias psicoactivas, solventes orgánicos, que puedan alterar la frecuencia de los biomarcadores a evaluar. Los criterios de exclusión fueron: haber sido irradiados en la cavidad oral en los últimos 6 meses, que tengan enfermedades crónicas como cáncer, herpes, hepatitis, enfermedades neurodegenerativas y que posean infecciones en la cavidad oral.

6.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Con el fin de motivar a la población a participar, se realizaron charlas donde claramente se socializaron los objetivos del estudio, la importancia de éste y los peligros para la salud de la exposición al humo de combustibles sólidos.

Posteriormente a los padres de los niños seleccionados se les aplicó una encuesta en la que se obtuvieron información relacionada con características socio-demográficas, estilo de vida, etnicidad, enfermedades respiratorias e infecciosas, índice de masa corporal, tiempo, tipo e intensidad de exposición, ubicación de la cocina, antecedentes personales, familiares y nutrición. Los grupos se aparearon por variables como la edad, sexo, género y etnia. El índice de masa corporal se calculó para cada niño, mediante la fórmula $IMC = \text{Peso}/\text{talla}^2$, y se tuvieron en cuenta las categorías establecidas según la Organización Mundial de la Salud.

6.5 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CÉLULAS DEL EPITELIO DE LA MUCOSA BUCAL

Para realizar la obtención de las muestras del epitelio bucal, a los padres de los niños seleccionados que decidieron participar en el estudio, se les hizo firmar el respectivo consentimiento informado. La toma de la muestra en cada niño se realizó de manera voluntaria, sin que aquellos sufrieran algún tipo de lesión. Las muestras se tomaron mediante el raspado de la mejilla interior con un cepillo citológico nuevo y estéril a cada uno de los niños expuestos y referentes, el cual se depositó en el buffer bucal (Tris HCl 1,6 g/L; EDTA 1,2 g/L; NaCl 37,2 g/L), bajo condiciones de asepsia, siguiendo las normas de bioseguridad. Las muestras se transportaron al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, donde se procesaron bajo las condiciones del protocolo del ensayo citoma de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa bucal.

6.6 ENSAYO CITOMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS BUCALES (PREPARACIÓN CELULAR, TINCIÓN, REGISTRO).

La solución que contiene el frotis de la cara interna de la mejilla se le agregan 50µL Dimetilsulfoxido (DMSO) y se pipetea durante 5 minutos, se centrifuga a 1800 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El sobrenadante se

descarta, se agregan 30µL DMSO, 5 mL de buffer bucal y se centrifuga nuevamente a 1800 RPM durante 10 minutos (se repite 2 veces, disminuyendo la cantidad de DMSO agregado, 20µL y 10µL respectivamente). Cuando se haya descartado el sobrenadante se procede a agregar 5 gotas de metanol frio al 80%. La preparación celular se extiende sobre una placa limpia codificada y se fijan las células con metanol frio al 80% durante 20 minutos.

La placa con el extendido celular se introduce en etanol a diferentes concentraciones (50% y 20%) durante 1 minuto. Se somete la placa a un lavado en agua miliQ durante 2 minutos y se trata 30 minutos con HCl 5M. Posteriormente se lava con agua de grifo durante 2 minutos y se colocan 5 minutos en el reactivo de Schifft calentado previamente. Pasado este tiempo se lava nuevamente con agua de chorro durante 2 minutos y con agua miliQ otros 2 minutos. Las placas se sumergen en fast Green de 5 a 10 segundos y se enjuagan con agua de grifo. Por último se observa al microscopio a un objetivo de 100X, el contraste entre el citoplasma (verde) y el núcleo (fucsia). Se registran Células basales, diferenciadas, binucleadas, picnóticas, cariorréticas, con cromatina condensada, cariolíticas, yemas nucleares y micronúcleos en 2000 células totales. Las frecuencias de los diversos tipos de células en el ensayo son representadas: número de células con efectos genotóxicos y citotóxicos en 1.000 o en porcentaje. El cálculo del índice de reparación se lleva a cabo mediante la siguiente fórmula frecuencia de células cariorréticas (KR) + frecuencia de células cariolíticas (KL)/ frecuencia de micronúcleos (MNi) + frecuencia de yemas nucleares (NBUD)

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron sistematizados y analizados utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL). Para realizar el análisis de la prueba de hipótesis que compara los grupos con respecto a las variables cuantitativas, se usaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov), homogeneidad de varianza (Levene). En cuanto al daño celular y la

comparación entre los grupos se utilizaron pruebas no paramétricas (Kruskall Wallis y U-Mann–Whitney). Para observar la relación de dependencia entre el factor de exposición y las variables cualitativas se usa la prueba de Chi-cuadrado. Los datos categorizados se analizarán mediante regresión logística binaria y correlación de Spearman. Un nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$ fue utilizado como criterio para rechazar la hipótesis nula (H_0), con un intervalo del 95% de confianza.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

En la tabla 1 se resumen las características demográficas de la población objeto de estudio (54 expuestos y 54 referentes). El 13% de la población expuesta presenta un peso al nacer inferior a 2500g y tienen en promedio 110 gramos menos que el grupo referente. La edad promedio de los niños expuestos fue 10,11 \pm 2,64 años y de los niños referentes fue de 10,19 \pm 2,54 años. La etnia que se presentó con más frecuencia fue la mestiza tanto en expuestos como en referentes con un 40,7%. El 48,1% de mujeres y el 51,9% de hombres conforman la población expuesta, mientras que en la población referente, el porcentaje de individuos femeninos y masculinos eran iguales, es decir del 50%. Al realizar la comparación entre los dos grupos de estudio, se determinó que estaban apareados correctamente, excepto para actividad física y dieta, variables que se tuvieron en cuenta como posibles “factores de confusión”. En todos los hogares de los niños expuestos utilizaban leña como combustible sólido, y el tipo de combustibles que utilizaban los hogares en el grupo referente era 53,7% gas y 46,3% energía eléctrica.

Tabla 1 Caracterización Demográfica de la población objeto de estudio.

	Referente N=54		Expuestos N=54		ρ^a
	Media	D.E	Media	D.E	
Edad (años)	10,11	2,64	10,19	2,54	1,00
Índice de masa corporal (Kg/cm ²)	18,78	3,17	17,08	2,62	0,19
Peso al nacer (g)	3273,30	479,0	3163,9	611,5	0,13
	N	%	N	%	
Tipo de combustible					
Leña	0	0	54	100	
Gas	25	53,7	0	0	-----
Energía	29	46,3	0	0	

Tabla 1. Continuación.

	N	%	N	%	
Etnia					
Blanca	12	22,2	13	24,1	
Negra	18	33,3	16	29,6	
Mestiza	22	40,7	22	40,7	0,95
Mulato	2	3,7	3	5,6	
Genero					
Femenino	27	50	26	48,1	
Masculino	27	50	28	51,9	0,85
Actividad física (horas al día)					
1-3 Horas	44	81,5	51	94,4	
>4 Horas	7	18,5	2	5,6	0,05
Dieta					
Frecuencia de consumo de alimentos ahumados					
Nunca	33	61,1	9	16,7	
Algunas Veces (mensual, anual)	21	38,9	41	75,9	0,00
Siempre (diario, semanal)	0	0	4	7,4	
Frecuencia de consumo alimentos ahumados/salados					
Nunca	37	68,5	24	44,4	
Algunas Veces (mensual, anual)	17	31,5	27	50,0	0,00
Siempre (diario, semanal)	0	0	3	5,6	
Pescado					
Alto (diario, semanal)	29	53,7	17	32,1	
Bajo (mensual, anual)	24	46,3	36	67,9	0,02
Vegetales-Frutas					
Alto (diario)	48	88,9	47	87,0	
Bajo (semanal, mensual, anual)	6	11,1	7	13,0	0,76

^a Prueba de Chi-Cuadrado

N= número de sujetos, D.E= Desviación estándar

En la tabla 2, se muestra que la población expuesta al humo de combustibles sólidos presenta un aumento significativo en la frecuencia de alteraciones respiratorias, oculares y neurológicas comparadas con el grupo referente, de las que se destacan, infecciones respiratorias bajas (12,2%), conjuntivitis (2,5%) y dolor de cabeza (89,7%), pero ninguna de éstas condiciones de salud altera la frecuencia de los biomarcadores evaluados. Además, en la población expuesta, el 74,1% de niños tienen un peso insuficiente al normal (<18,5kg/cm²) o delgadez no

muy pronunciada, según los valores calculados para el índice de masa corporal y criterios clínicos definidos por la Organización Mundial de la Salud.

Tabla 2 Condiciones de salud de la población objeto de estudio.

Condiciones de salud	Referente (N= 54)		Expuesto (N= 54)	
	N	%	N	%
Índice de masa corporal				
^a Peso insuficiente al normal (<18,5Kg/cm ²)	34	31,5	40	74,1
Respiratorias*				
Tos Seca	4	7,4	23	65,7
Infecciones respiratorias bajas	3	5,5	6	12,2
Oculares*				
Irritación Ocular	10	18,5	35	87,5
Neurológicas*				
Dolor de Cabeza	14	25,9	35	89,7

* Prueba de Chi-Cuadrado

N= número de sujetos

^a según criterios de la Organización Mundial de la Salud

Las características de la exposición e infraestructura del hogar se muestran en la tabla 3. El 87% de los niños estuvo expuesto de 8 a 15 años, incluyendo el tiempo de desarrollo intrauterino. El rango de horas de exposición al día varía entre 1-6 horas, estratificadas en mayor y menor a 3 horas según la información reportada por las madres en el momento de realizar la encuesta. El tiempo que permanecía prendido el fogón en el 92,6% de los hogares era mayor a 4 horas. El 29,6% de hogares limpiaban dos veces a la semana las paredes de su hogar o lo hacían quincenalmente. Entre las características de infraestructura del hogar se encuentra que el 16,7% de hogares poseían una cocina sin ventilación, el 29,6% tenían la cocina dentro de la casa y el 62,5% de esta población, la cocina estaba ubicada junto a la sala.

Tabla 3 Caracterización de la exposición.

Variables	N	%
Tiempo de exposición en horas		
< 3	27	50,0
>3	27	50,0
Años de exposición		
1-5	6	11,1
6-10	22	40,8
11-15	26	48,1
Cocina con ventilación		
No	9	16,7
Si	45	83,3
Ubicación de la Cocina		
Dentro de la Casa	16	29,6
Fuera de la Casa	38	70,4
Ubicación de la cocina dentro de casa		
Junto a la sala	10	62,5
Junto a las habitaciones	6	37,5
Limpieza de paredes		
Nunca	24	44,44
Diario	7	12,96
2 Veces Semana	4	7,40
Semanal	7	12,96
Quincenal	12	22,22

N= número de sujetos

7.2 EFECTO GENOTÓXICO, CITOTÓXICO Y DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REPARACIÓN EN CÉLULAS BUCALES DE NIÑOS EXPUESTOS AL HUMO DE COMBUSTIBLES SÓLIDOS.

En la figura 3, se pueden observar los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad identificados durante este estudio. La tabla 4, muestra la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad para la población referente y expuesta al humo de combustibles sólidos.

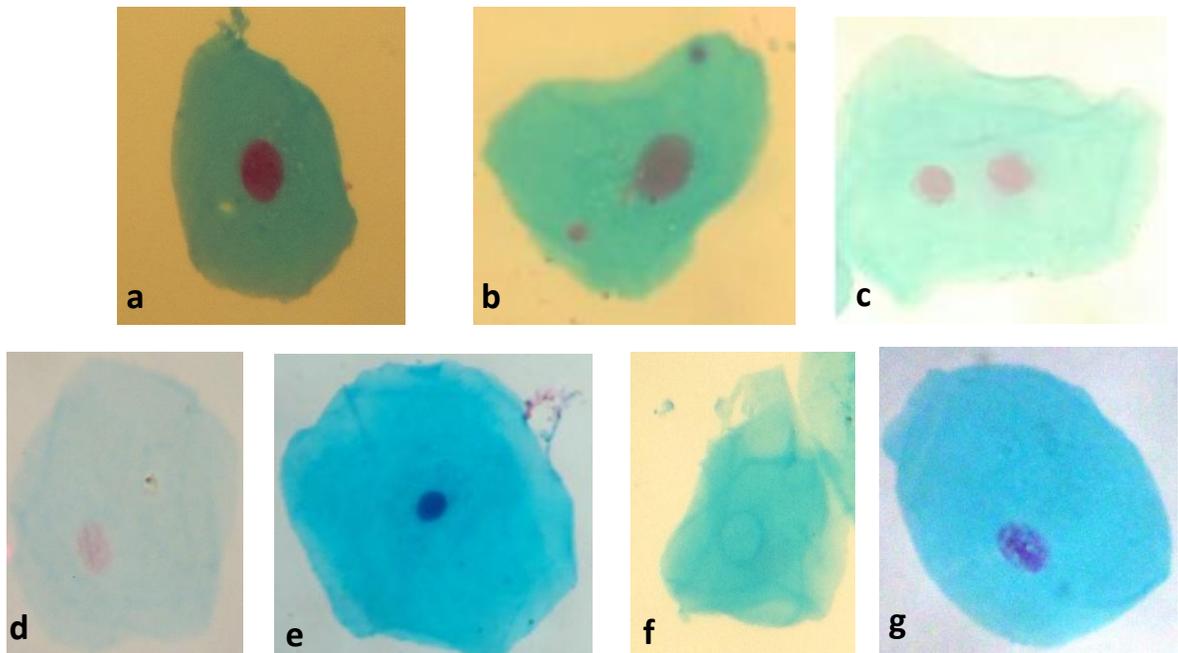


Figura 3. Imágenes de los diferentes biomarcadores de genotoxicidad y muerte celular vistos al microscopio con una magnificación de 100X. **a)** Célula diferenciada; **b)** Célula con micronúcleos; **c)** Célula binucleada; **d)** Célula con cromatina condensada; **e)** Célula picnótica; **f)** Célula cariolítica; **g)** Célula Cariorrética.

7.2.1 FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y CÉLULAS BINUCLEADAS

La frecuencia de micronúcleos ($0,74 \pm 1,10$) fue el doble y de las células binucleadas 1,7 veces mayor ($3,44 \pm 3,74$) en el epitelio bucal de los niños expuestos, comparado con la frecuencia de micronúcleos ($0,37 \pm 0,75$) y de células binucleadas ($2,02 \pm 2,62$) reportadas para el grupo referente. Sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,07$, $p=0,10$).

7.2.2 FRECUENCIA DE LOS BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDAD O MUERTE CELULAR

La evaluación de las frecuencias de los biomarcadores de citotoxicidad, células cariorréticas, células picnóticas, células cariolíticas, y células con cromatina condensada fueron significativamente más altas en el grupo expuesto que en el grupo referente ($p \leq 0,01$).

7.2.3 ÍNDICE DE REPARACIÓN

El índice de reparación en expuestos ($24,04 \pm 26,20$) es mayor que en los referentes ($19,01 \pm 13,52$), no se halló diferencias significativas ($p=0,84$).

Tabla 4 Frecuencia (%) general de los biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad e índice de reparación en la población de estudio.

Biomarcadores (n°/1000 células)	Referente Media \pm D.E	Expuesto Media \pm D.E	p^a
Micronúcleos	0,37 \pm 0,75	0,74 \pm 1,10	0,07
Células Binucleadas	2,02 \pm 2,62	3,44 \pm 3,74	0,10
Células Cariorrecticas	6,17 \pm 6,44	15,07 \pm 14,03	0,00
Células Picnoticas	17,22 \pm 28,04	22,02 \pm 23,53	0,02
Células Cariolíticas	17,30 \pm 24,69	28,89 \pm 34,50	0,01
Células con cromatina condensada	2,19 \pm 4,84	11,09 \pm 11,81	0,00
Índice de Reparación	19,01 \pm 13,52	24,04 \pm 23,20	0,84

D.E= Desviación estándar

^aprueba estadística de Kruskal – Wallis

7.3 EFECTO MODULADOR DEL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN, SOBRE LOS BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD: MICRONÚCLEOS Y CÉLULAS BINUCLEADAS

En la tabla 5, se describen las características del estilo de vida y la exposición que afectaron la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad. Al comparar la frecuencia media de micronúcleos de individuos que poseen la cocina dentro de la casa ($1,13 \pm 1,45$) e individuos cuya cocina era adyacente a la sala ($1,40 \pm 1,64$), con el grupo referente ($0,034 \pm 0,75$) se observó una diferencia significativa ($p=0,05$, $p=0,046$, respectivamente). Por su parte, se presenta un incremento significativo en la frecuencia de células binucleadas en niños expuestos asociadas con la variable limpieza de paredes, en las categorías: “dos veces a la semana” ($7,25 \pm 4,78$; $p=0,01$) y “quincenal” ($6,00 \pm 3,41$; $p=0,00$), comparados con el grupo referente ($2,02 \pm 2,62$).

Tabla 5 Efecto de las variables demográficas, del estilo de vida y la exposición sobre la frecuencia (%) de micronúcleos y células binucleadas.

	Referente (N=54)		Expuesto (N=54)	
	MN (‰)	BN (‰)	MN (‰)	BN (‰)
Individuos totales	0,37 ± 0,75	2,02 ± 2,62	0,74 ± 1,10	3,44 ± 3,74
Edad (años)				
<9	0,67 ± 1,08	2,50 ± 3,25	0,59 ± 1,00	3,12 ± 3,38
>9	0,22 ± 0,42	1,78 ± 2,25	0,81 ± 1,15	3,59 ± 3,93
Genero				
Femenino	0,22 ± 0,50	1,89 ± 2,83	0,54 ± 0,79	3,36 ± 3,83
Masculino	0,52 ± 0,89	2,15 ± 2,44	0,96 ± 1,34	3,54 ± 3,72
Etnia				
Blanca	0,25 ± 0,45	2,08 ± 3,50	0,62 ± 0,87	2,92 ± 3,35
Negra	0,44 ± 0,61	1,61 ± 2,57	0,38 ± 0,61	2,69 ± 3,51
Mestiza	0,18 ± 0,50	2,32 ± 2,29	1,14 ± 1,42 ^{*a}	4,55 ± 4,19 ^{*a}
Mulato	0,16 ± 0,18	2,00 ± 1,00	0,22 ± 0,25	2,10 ± 2,01
Ubicación De La Cocina				
Dentro de la casa	--	--	1,13 ± 1,45 ^b	3,44 ± 3,45
Fuera de la casa	--	--	0,58 ± 0,89	3,45 ± 3,81
Ubicación cocina dentro de la casa				
Junto a la Sala	--	--	1,40 ± 1,64 ^b	3,60 ± 4,24
Junto a las Habitaciones	--	--	0,67 ± 1,03	3,17 ± 2,92
Limpieza de las paredes				
2 Veces Semana	--	--	0,25 ± 0,50	7,25 ± 4,78 ^b
Quincenal	--	--	0,83 ± 1,03 ^b	6,00 ± 3,41 ^b
Actividad física (horas al día)				
1-3 Horas	0,42 ± 1,16	2,00 ± 2,55	0,69 ± 1,09	3,50 ± 3,54
>4 Horas	0,36 ± 0,75	2,21 ± 2,85	1,33 ± 0,55 ^c	6,67 ± 5,85 ^c
Consumo de alimentos ahumados				
Nunca	0,45 ± 0,87	1,82 ± 2,40	0,44 ± 0,88	4,00 ± 4,97
Algunas Veces	0,24 ± 0,44	2,33 ± 2,97	0,85 ± 1,17	3,66 ± 3,51 ^d
Dieta				
Pescado				
Alto (diario, semanal)	0,40 ± 0,75	1,90 ± 2,67	0,66 ± 1,09	3,7 ± 3,62
Bajo (mensual, anual)	0,00 ± 0,00	3,50 ± 1,29	1,10 ± 1,10 ^e	5,50 ± 4,01 ^e
Vegetales - Frutas				
Alto (diario)	0,42 ± 0,77	2,02 ± 2,60	0,66 ± 1,06	3,36 ± 3,87
Bajo (semanal, mensual, anual)	0,0 ± 0,0	3,03 ± 2,00	1,29 ± 1,25 ^e	4,00 ± 2,95

Resultados son expresados como Media ± Desviación estándar Mn=micronúcleos, BN=Células binucleadas
‰ numero de micronúcleos o células binucleadas/1000 células

* p≤ 0,05, Prueba Estadística de U-Mann Whitney

^a p<0,05 Comparado con etnia blanca-negra

^b p<0,05 Comparado con el grupo referente

^c p<0,05 Comparado con 1-3 hora/día de actividad física

^d p<0,05 Comparado con nunca consumo de alimentos ahumados

^e p<0,05 Comparado con alto consumo

N= número de sujetos

Se compararon condiciones de alto riesgo que incluyen variables del estilo de vida como alta actividad física y bajo consumo de frutas, verduras y pescado en individuos expuestos, frente a los individuos del grupo referente, cuyas características eran más favorables, es decir actividad física moderada y alto consumo de frutas, verduras y pescado. Los niños expuestos al humo de combustibles sólidos que practicaban una actividad física mayor a 4 horas al día, tenían un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos ($1,33 \pm 0,55$; $p=0,021$) y células binucleadas ($6,67 \pm 5,85$; $p=0,048$), con respecto a los niños referentes que practicaban de 1-3 horas diarias ($0,42 \pm 1,16$ y $2,00 \pm 2,55$, respectivamente). En cuanto a la dieta, los niños expuestos que reportaron un consumo bajo de vegetales-frutas y pescado, mostraron una frecuencia significativamente más alta de micronúcleos ($1,29 \pm 1,25$; $p=0,026$ y $4,00 \pm 2,95$; $p=0,046$, respectivamente) y células binucleadas ($1,10 \pm 1,10$; $p=0,017$ y $5,50 \pm 4,01$; $p=0,021$, respectivamente) en comparación con los niños referentes que tuvieron un consumo alto de estos mismos alimentos. Además, los niños expuestos que consumían algunas veces alimentos ahumados, mostraron una diferencia significativa ($3,66 \pm 3,51$; $p=0,037$) en las células binucleadas, respecto a los niños referentes que nunca consumían este tipo de alimento ($1,82 \pm 2,40$).

Otra variable que podría estar influyendo en la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad, es la etnia, ya que se puede observar que los individuos de etnia mestiza presentan un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos ($1,14 \pm 1,42$; $p=0,006$) y células binucleadas ($4,55 \pm 4,19$; $p=0,049$) respecto a los referentes de la misma etnia ($0,18 \pm 0,50$ y $2,32 \pm 2,29$, respectivamente). Asimismo, al comparar los individuos expuestos de etnia mestiza con los individuos referentes de etnias blanco ($0,025 \pm 0,045$ y $2,08 \pm 3,50$; $p<0,05$) y negro ($0,44 \pm 0,61$ y $1,61 \pm 2,57$; $p<0,05$) se encuentran diferencias significativas para los biomarcadores de genotoxicidad.

Se observa en la figura 4, que la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas aumentan con el tiempo de exposición al humo de combustibles sólidos, pero la correlación no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). El tiempo de exposición afecta en un 1,8% la frecuencia de micronúcleos y en un 6,8% la frecuencia de células binucleadas.

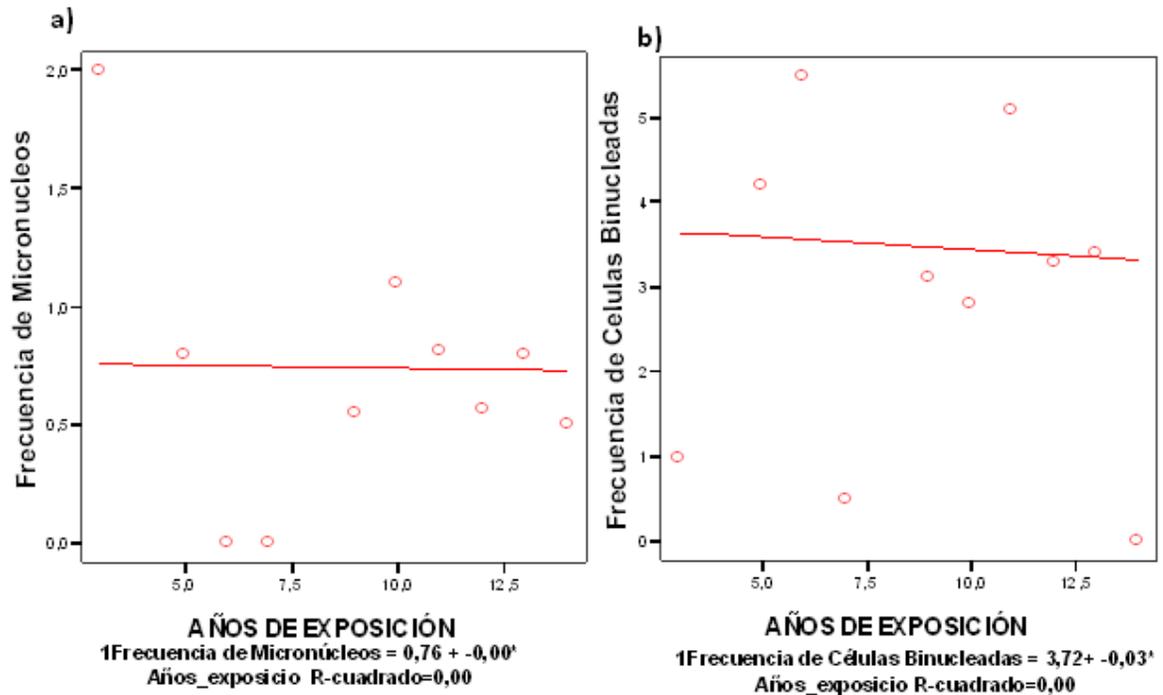


Figura 4. Análisis de asociación de la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas y el tiempo de exposición al humo de combustibles sólidos. **a)** Frecuencia de micronúcleos-años de exposición **b)** Frecuencia de células binucleadas-años de exposición.

7.4 EFECTO DE LAS VARIABLES DEL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN SOBRE LOS BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDAD O MUERTE CELULAR

La frecuencia de células con cromatina condensada, cariorrécticas, picnóticas, y cariolíticas se ven incrementadas por las variables: etnia, género, ubicación de la cocina dentro de la casa, actividad física y dieta. La diferencia fue

estadísticamente significativa para todos los biomarcadores de muerte celular ($p < 0,001$) como se observa en la tabla 6. Los biomarcadores de muerte celular que presentan mayor alteración en sus frecuencias son las células cariorrécticas y con cromatina condensada, seguido de las células cariolíticas y picnóticas, cuando se comparan con el grupo referente. En la figura 5, los años de exposición afectan en un 18,6% la frecuencia de los biomarcadores de muerte celular; de manera que cuando aumentan los años de exposición disminuyen la frecuencia de los biomarcadores; aunque esta relación no es estadísticamente significativa ($p = 0,182$, $R = -0,18$).

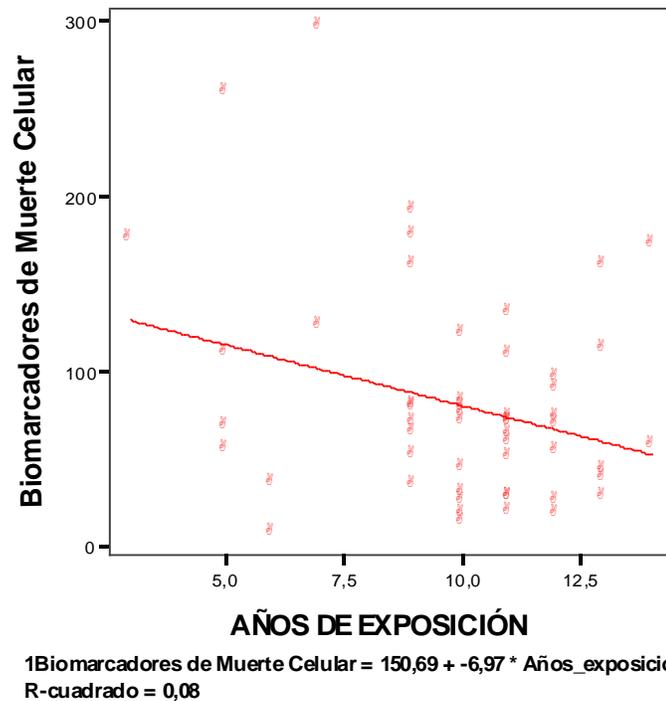


Figura 5. Análisis de asociación de los biomarcadores de muerte celular el tiempo de exposición al humo de combustibles sólidos.

Tabla 6. Efecto de las variables demográficas, del estilo de vida y exposición sobre las frecuencias (%) de los biomarcadores de muerte celular.

	REFERENTE (N=54)				EXPUESTO (N=54)			
	CR (‰)	PIC (‰)	CL (‰)	CC (‰)	CR (‰)	PIC (‰)	CL (‰)	CC (‰)
Individuos totales	6,17 ± 6,44	17,22 ± 28,04	17,30 ± 24,69	2,19 ± 4,84	15,07 ± 14,03	22,02 ± 23,53	28,89 ± 34,50	11,09 ± 11,81
Edad (años)								
<9	6,22 ± 6,62	15,72 ± 30,26	14,11 ± 20,64	2,89 ± 6,79	15,71 ± 14,40*	15,71 ± 14,89	27,12 ± 32,64	12,94 ± 13,04*
>9	6,14 ± 6,45	17,97 ± 27,27	18,89 ± 26,62	1,83 ± 3,56	14,78 ± 14,05*	24,92 ± 26,25	29,70 ± 35,88	10,24 ± 11,29*
Etnia								
Blanca	4,42 ± 4,69	22,17 ± 39,77	14,42 ± 23,71	2,42 ± 4,99	9,23 ± 7,90	27,31 ± 31,87	43,00 ± 41,07*	9,69 ± 11,93*
Negra	5,78 ± 7,48	15,56 ± 11,97	25,44 ± 28,68	2,11 ± 2,94	14,31 ± 18,00	22,69 ± 24,54	32,88 ± 36,62	10,81 ± 11,61*
Mestiza	7,45 ± 6,47	11,18 ± 18,42	11,77 ± 20,91	2,05 ± 6,20	15,77 ± 8,11*	17,05 ± 14,84	16,50 ± 26,45	10,64 ± 11,81*
Mulato	6,00 ± 7,07	12,18 ± 18,12	22,00 ± 31,11	3,00 ± 2,82	7,32 ± 6,15	15,00 ± 18,80	37,33 ± 28,36	4,00 ± 12,22
Genero								
Femenino	6,22 ± 7,09	14,56 ± 26,97	17,48 ± 26,26	1,67 ± 2,52	17,04 ± 17,71*	26,61 ± 28,84	39,07 ± 39,30	12,82 ± 11,96*
Masculino	6,11 ± 5,86	19,89 ± 29,33	17,11 ± 23,53	2,70 ± 6,39	12,96 ± 8,36*	17,08 ± 15,05*	17,92 ± 24,78*	9,23 ± 11,59*
Ubicación De La Cocina								
Dentro De Casa								
Junto a la sala	--	--	--	--	21,60 ± 20,20 ^a	36,60 ± 31,66 ^a	49,90 ± 46,11 ^a	10,40 ± 11,63 ^a
Junto a las habitaciones	--	--	--	--	23,50 ± 20,60	8,67 ± 3,23	13,50 ± 22,34	16,67 ± 14,25 ^a
Actividad Física								
(Horas al día)								
1-3 Horas	6,52 ± 6,39	18,77 ± 30,39	17,75 ± 24,54	2,39 ± 5,26	15,00 ± 14,31	22,65 ± 24,01	30,06 ± 35,14	10,98 ± 11,53
>4 Horas	3,43 ± 4,11	5,86 ± 4,81	8,71 ± 14,23	1,29 ± 2,21	17,50 ± 12,02*	11,00 ± 12,72*	9,50 ± 9,19*	19,50 ± 21,92*
Dieta								
Frecuencia de consumo de alimentos								
ahumados								
Nunca	6,09 ± 6,78	16,18 ± 23,70	20,61 ± 25,95	1,64 ± 3,32	18,00 ± 19,69*	26,67 ± 34,60	42,56 ± 45,01	16,11 ± 16,57*
Algunas Veces	6,29 ± 6,03	18,86 ± 34,35	12,10 ± 22,12	3,05 ± 6,57	14,34 ± 12,44	20,39 ± 20,47*	25,05 ± 32,72*	10,54 ± 10,85*
Frecuencia de consumo alimentos								
ahumados/salados								
Nunca	6,35 ± 6,66	16,62 ± 23,56	20,73 ± 26,95	1,46 ± 3,13	19,17 ± 18,33*	28,71 ± 30,39	30,79 ± 39,98*	13,17 ± 13,93*
Algunas Veces	5,76 ± 6,13	18,53 ± 36,78	9,82 ± 17,34	3,76 ± 7,19	12,33 ± 8,39*	16,96 ± 15,25	19,56 ± 27,92	10,11 ± 9,92*
Pescado								
Alto (diario, semanal)	6,14 ± 6,59	21,07 ± 34,50	20,03 ± 28,30	2,41 ± 3,81	18,41 ± 20,90*	25,06 ± 24,44*	39,35 ± 35,06*	13,24 ± 14,48*
Bajo (mensual, anual)	6,08 ± 6,52	12,88 ± 17,93	14,71 ± 20,02	2,00 ± 6,00	13,22 ± 9,31 ^{bd}	18,28 ± 18,70	21,50 ± 30,16	10,08 ± 10,59 ^{bd}
Vegetales-Frutas								
Alto (diario)	5,92 ± 6,28	17,15 ± 29,55	14,98 ± 22,33	2,38 ± 5,08	15,30 ± 14,90*	22,83 ± 23,95*	30,11 ± 33,43*	11,34 ± 12,17*
Bajo(semanal, mensual, anual)	8,17 ± 8,01	17,83 ± 11,14	35,83 ± 36,23	0,67 ± 1,63	13,57 ± 5,94 ^d	16,57 ± 21,30	20,71 ± 43,12	9,43 ± 9,73 ^{bd}

Resultados son expresados como Media ± Desviación estándar CR= Células Cariorrécticas, PIC= Células Picnóticas, CC= Células con Cromatina condensada.

‰ numero de formaciones metanucleadas/1000 células

^a p≤ 0,05 comparado con la media del grupo referente

^b p≤ 0,05 comparado con consumo Alto

*p≤ 0,05, Prueba Estadística de U-Mann Whitney

N= número de sujetos

7.5 CORRELACIONES ENTRE MICRONÚCLEOS, CÉLULAS BINUCLEADAS, ÍNDICE DE REPARACIÓN Y BIOMARCADORES DE MUERTE CELULAR.

En la tabla 7, se observa una correlación positiva entre la frecuencia de micronúcleos y la frecuencia de células binucleadas. Hay una correlación positiva entre micronúcleos e índice de reparación, y células binucleadas e índice de reparación. El análisis de correlación de Spearman mostró que el aumento de las células cariorréticas es dependiente del aumento de las células binucleadas, y el aumento de las células con cromatina condensada depende del aumento de la frecuencia de células binucleadas, pero se observó una correlación negativa entre las células cariolíticas y las células binucleadas, y entre las células picnóticas y las células binucleadas. Por último en este estudio, se halló que entre los biomarcadores de muerte celular que mostraban mayor significancia estadística, es decir, células cariorréticas y células con cromatina condensada, hubo una correlación positiva, al igual que entre las que presentaban una menor significancia, células cariolíticas y células picnóticas.

Tabla 7 Correlaciones entre los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad

	MN	BN	CR	CL	CC	PIC	IR
MN		p= 0,01 R=0,34*	p=0,33 R=0,13	p=0,18 R=-0,18	p=0,79 R=0,04	p=0,78 R=0,04	p= 0,01 R=0,35*
BN			p=0,02 R=0,32*	p=0,00 R=-0,43*	p=0,00 R=0,55*	p=0,05 R=-0,27*	p= 0,02 R=0,31*
CR				p=0,63 R=-0,07	p=0,00 R=0,50*	p= 0,21 R=0,17	p= 0,82 R=0,03
CL					p=0,96 R=0,00	p= 0,00 R=0,56*	p= 0,98 R=0,00
CC						p=0,54 R=0,08	p= 0,96 R=0,00
PIC							p= 0,41 R=0,11
IR							

MN= micronúcleos, BN= células binucleadas, CR= células cariorréticas, CL= células cariolíticas, CC= células con cromatina condensada, PIC= células picnóticas, IR= índice de reparación
*p<0,05, prueba de Rho Spearman

8. DISCUSIÓN

La contaminación al interior del hogar por uso de combustibles sólidos constituye uno de los principales problemas de salud pública, ya que, el material particulado y los gases tóxicos de la combustión incompleta, son una de las principales causas de morbilidad (4% de la carga de enfermedad) y mortalidad (2 millones de muertes al año) de la población expuesta (Rehfuess et al., 2011), en especial la comunidad infantil. De esta manera, es importante identificar biomarcadores de exposición y técnicas sensibles en tejidos blanco para evaluar el riesgo de la población infantil a desarrollar enfermedades. En este estudio, se evaluó el efecto genotóxico y citotóxico de la exposición residencial al humo de combustibles sólidos e índice de reparación en células exfoliadas del epitelio bucal en una población infantil por medio del ensayo citoma de micronúcleos. Además, se tuvieron en cuenta otras variables de la exposición y del estilo de vida como ubicación de la cocina, limpieza de paredes, dieta y actividad física, para determinar si estas influenciaban al daño citotóxico y genotóxico. Se describieron, a su vez, algunas enfermedades asociadas a la exposición al humo de combustibles sólidos encontrados en los niños como: enfermedades respiratorias bajas, enfermedades oculares y bajo peso al nacer.

El epitelio bucal se establece como un tejido blanco de fácil obtención para evaluar el daño genético que se está produciendo en los niños expuestos al humo de combustibles sólidos, ya que, las células epiteliales de la mucosa bucal, son la primera barrera de protección y con capacidad de metabolizar carcinógenos que pasan a través de la ruta de inhalación o ingestión a especies reactivas, constituyéndose en un sitio vulnerable a efectos genotoxicos tempranos (Holland et al., 2008). Además, aproximadamente el 90% de canceres humanos son originados a partir de células epiteliales (Stellman and Finklea, 1999).

Se ha observado que la exposición crónica del epitelio bucal a tóxicos pueden generar la aparición de cuerpos queratinicos (gránulos en el citoplasma) sin

contenido de ADN (Fontes et al., 2008), como ocurre frecuentemente en las células epiteliales de las personas que utilizan biomasa como combustible sólido y que suelen confundirse a menudo con micronúcleos (Mondal et al., 2010). La tinción de Fielgen- Fast Green, específica para el ADN, fue usada en este estudio para la detección de micronúcleos, células binucleadas y biomarcadores de citotoxicidad o muerte celular en células epiteliales de la mucosa bucal, ya que ha demostrado ser el método más consistente para identificar correctamente estas estructuras (Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009). De esta manera, al utilizar la tinción específica para el ADN disminuyeron los falsos positivos en el momento de registrar el daño genómico o anomalías nucleares que estaban ocurriendo en las células epiteliales.

La frecuencia de micronúcleos y células binucleadas en el grupo de niños referentes está por debajo de la frecuencia basal establecida en células epiteliales bucales utilizando métodos de tinción específicos y no específicos para el ADN (Bonassi et al., 2011), lo que indica que esta población no presenta una exposición a agentes genotóxicos ambientales que puedan alterar la frecuencia de los biomarcadores. El género y la edad no afectaron la frecuencia de micronúcleos al igual que en la revisión hecha por el HUMNxl y otros autores que avalan estos resultados (Baier et al., 2002; Bonassi et al., 2011; N.T. Holland and Golden, 2001; Neri et al., 2003a). La edad juega un papel importante en el incremento de la frecuencia de micronúcleos solamente a partir de los 40 años (Bolognesi et al., 1997; Jacobs and Doll, 1961; Richard et al., 1993), ya que, en edades inferiores, la eficiente función que cumplen las enzimas de reparación del ADN y del metabolismo en las células impiden que haya formación excesiva de micronúcleos (Bohr and Michael Anson, 1995; Hanawalt et al., 1992; Randerath et al., 1992). En cuanto al género, la frecuencia de micronúcleos en células bucales no se ve afectada, e incluso es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (Bonassi et al., 2011), a diferencia de los linfocitos en sangre periférica, en donde hay una

asociación entre el género femenino y una frecuencia más alta de micronúcleos, tal vez por las características específicas del tejido.

En nuestro estudio el tiempo de exposición (1-15 años) al humo de combustibles sólidos mostró un aumento no significativo de la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas (figura 4). La dinámica del epitelio bucal solo refleja un acontecimiento genotóxico que se produjo en las células que se estuvieron expuestas directamente y dividiéndose en la capa basal de 1-3 semanas, por ende al estar renovándose constantemente el epitelio, las células que han sufrido daños después de este tiempo van a desaparecer (Stich et al, 1983). Sin embargo, en la figura 4 se ve que el tiempo de exposición afecta la aparición de micronúcleos y la frecuencia de células binucleadas, lo que sugiere que durante una exposición constante, se produce un efecto adverso sobre el epitelio bucal, debido la cantidad excesiva de tóxicos presentes en el humo de biomasa, que son acumulados en los pulmones, metabolizados y posteriormente transportados por el torrente sanguíneo, e interactúan con las células basales del epitelio bucal.

Al realizar la evaluación de la genotoxicidad, los niños expuestos al humo de combustibles sólidos en este estudio tienen una frecuencia de micronúcleos 2 veces mayor y de células binucleadas 1,7 veces mayor que el grupo referente (tabla 3), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,07$, $p= 0,10$). Las causas que pudieron originar estos resultados son atribuibles a: 1) amplia variación interindividual representado en las medias y desviación estándar reportadas 2) tiempo de exposición, porque según los resultados en Mondal et al., (2010), solamente a partir de los 15 años de exposición crónica al humo de biomasa es posible observar diferencias significativas en los biomarcadores de genotoxicidad en las células del epitelio bucal, debido a que la capacidad de reparación de las células y la generación de antioxidantes se ve afectada por la edad y tiempo de exposición; 3) horas de permanencia en el hogar, ya que los niños por su rango de edad (5 – 15 años) tienen que cumplir sus labores académicas diariamente, por lo tanto no están

expuestos durante el periodo de tiempo que se encuentran en el recinto escolar (4 horas al día). Otros estudios tampoco observaron diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos en el epitelio bucal de niños expuestos a fuentes de hidrocarburos aromáticos policíclicos, aunque hubo un incremento en la frecuencia de este biomarcador (Çelik et al., 2003; Huen et al., 2006). Por otro lado, en India, Colombia y Brasil, mujeres y niños expuestos a la combustión de biomasa presentaron un incremento significativo en los biomarcadores que indican daño al ADN (micronúcleos y células binucleadas en epitelio bucal, alteraciones cromosómicas y ensayo cometa en linfocitos) (Bravo and Leon, 2008; Mondal et al., 2010; Mondal et al., 2011).

A pesar de que no se ha observado diferencias significativas para los biomarcadores de genotoxicidad entre los grupos evaluados durante este estudio, los resultados y la literatura sugieren la presencia de algún evento que trae como consecuencia el aumento de la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas en los niños expuestos. El humo producto de la combustión incompleta de los combustibles sólidos especialmente el de biomasa contienen elementos mutagenos y carcinogénicos que incluyen benzo (a) pireno, 1,3-butadieno y benceno (Zhang and Smith, 1996), que interactúan directamente con las células basales del epitelio bucal (Holland et al., 2008), o son llevados al tracto respiratorio por inhalación del material particulado. Los agentes tóxicos son transportados en el torrente sanguíneo hasta el tejido conectivo adyacente a la capa basal de la mucosa bucal, ahí interactúan con las células madre que están dividiéndose con poca frecuencia (Ceppi et al., 2010). El material particulado, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos activos generan células aneuploides (Hadnagy and Seemayer, 1986, 1988; Sjögren et al., 1996; Sram, 1999) e inflamación pulmonar y sistémica (Groopman et al., 1995), generando especies reactivas de oxígeno, que inducen el rompimiento de cadenas sencillas en la molécula de ADN (Ames et al., 1995; Danielsen et al., 2008; Lindahl and Wood, 1999; Mondal et al., 2010; Mondal et al., 2011; Schmid, 1975). Una vez se

presentan las alteraciones en el material genético de las células basales, estas expresan el daño genotóxico a través de la formación de micronúcleos (Fenech and Crott, 2002; Fenech et al., 1999) y células binucleadas (Shi and King, 2005; Thomas et al., 2009)

Aunque no hubo diferencias significativas en el grupo total de expuestos y referentes en la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas, si se observó una diferencia cuando se compararon estos biomarcadores con variables tales como la etnia, ubicación de la cocina y limpieza de paredes.

La etnia, como variable que podría estar modulando el efecto genotóxico sobre los individuos expuestos al humo de combustibles sólidos, se observó cuando la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas era significativamente más alta en niños expuestos de etnia mestiza, comparado con los niños referentes de etnia mestiza, negra y blanca, lo que indica una variabilidad en cuanto a la respuesta a los agentes genotóxicos entre estas etnias. Se sugiere que uno de los factores de variabilidad entre etnias son los polimorfismos de genes involucrados en el ciclo celular (P53) y metabolismo (CYP1A1) (Feigelson et al., 1998; Garte, 1998; Wu et al., 2002). De los pocos estudios donde se incluye a la población infantil y la susceptibilidad genética asociado a la contaminación ambiental, Sánchez-Guerra et al., (2012) encontraron que el polimorfismo CYP1A1*2C (heterocigoto y homocigoto mutante) puede afectar a las enzimas encargadas de metabolizar los hidrocarburos aromáticos policíclicos e incrementar el riesgo de los niños a sufrir daños en el ADN. Sin embargo, es importante realizar más estudios en niños que confirmen la susceptibilidad genética a los tóxicos presentes en el humo de combustibles sólidos.

Al asociar las variables de exposición, sólo el grupo de niños en cuyas viviendas la cocina se encontraba al interior del hogar y junto a la sala mostraban un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas con respecto al grupo referente, mientras que en los niños cuyas cocinas estaban ubicadas

afuera del hogar, no se halló diferencia estadística para estos biomarcadores. Los resultados muestran también que cuando en los hogares la limpieza de paredes se realizaba cada quince días, había aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos comparado con el grupo referente, en cambio, cuando la limpieza de paredes se llevaba a cabo 2 veces a la semana, no había una variación significativa. Tzintzun-Cervantes et al., (2005), encontraron que aun después de implementar estufas eficientes, las concentraciones de material particulado PM_{2.5} eran elevadas y alcanzaban el exterior de la casa. En un estudio llevado a cabo en India en mujeres expuestas a la combustión de biomasa, observaron que las altas concentraciones de material particulado estaban relacionadas con la ubicación de la cocina dentro y junto a la sala, a su vez, estas mujeres tenían una frecuencia de micronúcleos mayor comparado con otras mujeres cuyas cocinas estaban separadas de la casa (Mondal et al., 2010). El material particulado (PM₁₀ y PM_{2,5}), al ser formado inicialmente a partir de la condensación de gases producto de la combustión incompleta de material orgánico, se dispersa rápidamente y puede ser transportado a distancias largas y cortas (Masters et al., 1997; Shojaei, 1998; Squier and Kremer, 2001; Veiro and Cummins, 1994). De tal manera, que al permanecer el fogón prendido durante muchas horas, el humo sale exacerbado al exterior y es muy fácil que el material particulado pueda quedarse adherido, incluso a las superficies porosas como madera y tierra, que son el principal componente de estos hogares (Jin et al., 2005); este fenómeno sucede con mayor frecuencia en hogares donde no se hace una limpieza adecuada de la vivienda.

Características del estilo de vida también influyen en la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad, ya que, al realizar una actividad física mayor a 4 horas en los niños expuestos frente al grupo referente que hacían de 1-3 horas, se observó un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas. Aunque la actividad física puede aumentar el sistema de defensa antioxidante (Amani A R, 2010; Clarkson and Thompson, 2000), repeticiones severas y moderadas de ejercicios podrían causar un incremento en la generación

de radicales libres, debido a la toma excesiva de oxígeno (Bonilla et al., 2005). El estrés oxidativo generado, tiene tendencia a causar modificaciones oxidativas en lípidos, proteínas y el ADN; reflejándose en un aumento de la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas.

El presente estudio, indica que la dieta modula la genotoxicidad producida por el humo de combustibles sólidos, ya que las condiciones de riesgo, estar expuesto y bajo consumo de vegetales-frutas y pescado comparado con no estar expuesto y alto consumo de vegetales-frutas y pescado presentó una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas. Además, estar expuesto y tener un alto consumo de comidas ahumadas incrementa las células binucleadas en el epitelio bucal. Un estudio de biomonitorio en niños expuestos a la combustión de biomasa en Brasil, determinó que el consumo de pescado disminuyó la frecuencia de micronúcleos en células bucales (Sisenando et al., 2012). Según la revisión del HUMNxl sólo el consumo de frutas disminuye significativamente la frecuencia de micronúcleos, sin embargo, una dieta basada en pescado y vegetales influyen también en dicha disminución, pero su efecto es menos notorio y casi nulo sobre las células binucleadas (Bonassi et al., 2011). No obstante, estudios en mujeres expuestas a distintos combustibles e hidrocarburos aromáticos policíclicos, reportan que no hay asociación entre los biomarcadores de genotoxicidad, daño oxidativo y la dieta (Bravo and Leon, 2008; Musthapa et al., 2004; Raimondi et al., 2007).

La exposición al humo de combustibles sólidos podría disminuir la actividad enzimática antioxidante de las personas expuestas (Mondal et al., 2010). Es muy probable que el organismo no pueda defenderse 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 (Torres, 2002). También, los alimentos ahumados contienen altas concentraciones de Hidrocarburos aromáticos policíclicos adheridos a ellos (Cross and Sinha, 2004; Jagerstad and Skog, 2005) y su alto

consumo puede desencadenar en la generación de especies reactivas de oxígeno o células aneuploides.

El consumo de vegetales disminuye la actividad oxidante, ya que, no solo es un recurso de fitonutrientes, sino que también contienen compuestos químicos antioxidantes, antimutagenicas y comutagenicas (Carvalho et al., 2011). Los beneficios potenciales para la salud de frutas han sido atribuidos a las vitaminas, fibra dietética y flavonoides. De hecho la vitamina C, protege contra la oxidación *in vivo* de lípidos y el ADN en los seres humanos, en particular en las personas expuestas a estrés oxidativo (van den Berg et al., 2001). El pescado, rico en proteínas, bajo en calorías y altamente nutritivo, es una buena fuente de antioxidantes, grasas insaturadas, minerales, vitaminas y aceites esenciales. El hidroxitirosol y el omega 3, compuestos con propiedades antioxidantes, pueden actuar en la inhibición de la oxidación lipídica (Pazos et al., 2008).

De esta manera, aunque el consumo de alimentos ahumados y la dieta basada en vegetales, frutas y pescado actúan como factores de confusión en este estudio, proveen evidencia a cerca de la importancia del consumo de agentes antioxidantes, que ayudan a desactivar o reducir las especies reactivas de oxígeno, y disminuir el efecto tóxico del humo de combustibles sólidos que afectan la homeostasis celular y la salud en general (Serra-Baldrich and Tribo, 1991) de personas expuestas a estos agentes, como los niños, evaluados en este trabajo.

Al realizar la correlación entre los biomarcadores de genotoxicidad, se observa que un aumento de la frecuencia de las células binucleadas depende de la frecuencia de micronúcleos (tabla 7). Al igual que lo reportado por Celik et al., (2010), que evaluaron la contaminación por agentes genotoxicos del área de trabajo en fabricantes de alfombras, donde encontraron una correlación positiva entre la frecuencia de células binucleadas y la frecuencia de micronúcleos. De tal manera, que el mecanismo por el cual se forman los micronúcleos tras un daño acumulativo está asociado con la tasa de células binucleadas en enfermedades

neurodegenerativas y cáncer (Sjögren et al., 1996). Esta evidencia es confirmada por el incremento significativo de células binucleadas y de micronúcleos en el Síndrome de Down, enfermedad de envejecimiento acelerado y riesgo a cáncer o neurodegeneración (Thomas et al., 2008).

Los biomarcadores de muerte celular que fueron evaluados durante el desarrollo del estudio, células cariorréticas, células picnóticas, células cariolíticas y células con cromatina condensada fueron significativamente más altas en los niños expuestos que en los niños del grupo referente (tabla 4). Estos resultados corroboran lo obtenido por Bravo and Leon (2008), cuando encontraron que la exposición de mujeres al humo de leña generaba daños citotóxicos (disminución del índice mitótico), y también lo obtenido por Mondal et al., (2010), donde las anomalías nucleares en células del epitelio bucal fueron más altas en el grupo de mujeres que utilizaban biomasa como combustible. Otros autores como Calderón-Segura et al., (2004), Musthapa et al., (2004) y Barbisan et al., (1999), que evaluaron la citotoxicidad del material particulado y los Nitrohidrocarburos aromáticos policíclicos en ambientes contaminados, encontraron que tras la exposición se presentó un efecto tóxico sobre la viabilidad celular.

Las altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos podrían estar interfiriendo en la formación de los biomarcadores de citotoxicidad o muerte celular, ya que se generan aductos con el ADN y disturbios con la mitosis o la muerte celular (Barbisan et al., 1999; Talaska et al., 1996). Al formarse el aducto, la célula responde con un bloqueo en la replicación y activando mecanismos de reparación. Por ejemplo inducir respuestas apoptóticas en los casos en los que el daño genotóxico no pueda ser reparado, de tal manera que la lesión primaria no se convierta en mutación (Hernández and Menéndez, 2001). Además, los químicos presentes en el humo de combustibles sólidos, se transforman a metabolitos activos y causan la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial excitotoxicidad y apoptosis (Batista-González et al., 2006; Martínez et al., 2003; Sánchez-Rodríguez et al., 2004). De esta manera, la

inducción a la muerte celular se ve reflejada en un aumento en la frecuencia de células picnóticas, con cromatina condensada y cariorrécticas (Pindborg et al., 1980; Shklar, 1968), debido a que estas acompañan las primeras etapas de la apoptosis. A su vez, el aumento de la frecuencia de células cariolíticas, es evidente cuando se experimenta necrosis después de una lesión por agentes químicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y el material particulado, que causan perturbación del entorno celular (Wyllie, 1981).

Factores tales como, el género, la etnia, ubicación de la cocina, actividad física, y dieta, más la exposición, afectaron la frecuencia de los biomarcadores de muerte celular, de tal modo que se observó un incremento significativo (tabla 6). Estas variables podrían estar modulando el efecto citotóxico, porque al igual que en la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas, son evidencia de los mecanismos de toxicidad celular relacionadas con la exposición al humo de combustibles sólidos, como son la generación de especies reactivas de oxígeno, disminución de antioxidantes y acumulación de material particulado. Además de los polimorfismos, que como factores genéticos podrían generar susceptibilidad a los agentes tóxicos.

Hay pocos estudios en los que se utilice estos biomarcadores de muerte celular, sin embargo, se demostró que estos son sensibles para detectar efectos citotóxicos y apoptóticos que se están presentando en el epitelio bucal, durante la exposición a contaminantes (Çelik et al., 2003; Çelik et al., 2010; Diler and Çelik, 2011; Ramirez and Saldanha, 2002; Tolbert et al., 1991a). Algunos de los biomarcadores de citotoxicidad o muerte celular, al igual que en nuestro estudio han sido asociados a factores individuales y de exposición; por ejemplo, la frecuencia de células cariorrécticas es más alta en hombres con edades mayores a 18 años e individuos expuestos a pesticidas (Bonassi et al., 2011). Aumento en la aparición de células picnóticas es correlacionado con el aumento en la edad y la exposición a radiación ionizante y no ionizante (Bonassi et al., 2011).

En nuestro estudio, se encontró correlación entre algunos biomarcadores de muerte celular y células binucleadas (tabla 7). La aparición de células binucleadas está directamente relacionada con la frecuencia células cariorrécticas y cromatina condensada; debido a que estas últimas formaciones celulares podrían ser un indicador de daño genotóxico, pues la fragmentación del ADN precede a la muerte celular (Kyprianou et al., 1990). De tal manera, que el daño genotóxico por la exposición, está induciendo a la aparición de células binucleadas que poseen un daño genético irreparable, y por ende entran en estado de apoptosis, y es por eso que las células cariorrécticas y cromatina condensada se ven incrementadas. Por el contrario, las células picnóticas y células cariolíticas están inversamente asociadas con la frecuencia de células binucleadas, debido a que el estado de necrosis producto del daño en el epitelio bucal primero daña la célula y posteriormente ocurre la fragmentación del núcleo, lo que se ve reflejado en la disminución de las células binucleadas, ya que en éstas primero ocurre el daño en el ADN (aneuploidia) que impida la citocinesis (Shi and King, 2005; Thomas et al., 2008) para su formación y posteriormente la muerte celular. Una correlación positiva se encontró entre células con cromatina condensada y células cariorrécticas, y también entre células picnóticas y células cariolíticas (tabla 7). Según Thomas et al., (2008), estos resultados pueden ser explicados porque las células cariorrécticas son originadas secundariamente por las células con cromatina condensada o directamente por las células basales, y las células cariolíticas, son generadas directamente de las células con cromatina condensada o indirectamente vía células picnóticas.

Al aumentar el tiempo de exposición al humo de combustibles sólidos en los niños, la frecuencia de los biomarcadores de muerte celular disminuían (figura 5); al igual que lo reportado por Celik et al., (2010), donde las células cariolíticas y cariorrécticas tenían una correlación negativa con el tiempo de exposición a pinturas. Ramirez and Saldanha (2002), afirman que la ocurrencia de células cariolíticas y cariorrécticas se incrementa abruptamente después de la exposición,

pero disminuye de manera constante a partir de entonces, lo que estaría representando diferentes estados progresivos en la dinámica hacia la carcinogénesis, soportado por el proceso degenerativo de la homeostasis del epitelio bucal.

El índice de reparación (IR) en niños expuestos al humo de combustibles sólidos fue mayor cuando se comparó con el grupo referente, pero no se encontró significancia estadística (tabla 4). Según Ramirez and Saldanha (2002), solo cuando aparecen los estadios más avanzados del carcinoma oral en personas alcohólicas, el IR tiende a disminuir, mientras que en otras regiones de la boca sin presencia de lesiones, el IR es mayor cuando se compara con personas no alcohólicas y sin carcinomas. Nuestros resultados sugieren que los mecanismos de reparación de los niños expuestos son elevados, tal como lo reportado por Mondal et al., (2010), donde la exposición a humo de biomasa en mujeres provoca la expresión de proteínas de reparación del ADN Mre11 y Ku70 en células epiteliales y linfocitos, lo que indica estimulación excesiva de los mecanismos de reparación del ADN. En otros estudios llevados a cabo en adultos; cuya capacidad de reparación es mayor a la de los niños, se ha observado que el índice de reparación es menor en las poblaciones expuestas comparado con el grupo referente, indicando un desbalance entre el daño genético y la muerte celular (Çelik et al., 2010; Diler and Çelik, 2011).

Se determinó una correlación positiva entre el índice de reparación con la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas (tabla 7). De esta manera, la carga de metabolitos reactivos presentes en el humo de combustibles sólidos es alta y estimula la reparación, pero ésta no es eficiente, porque a pesar de que hay un incremento en el índice de reparación de niños expuestos, se siguen presentando la formación de micronúcleos y células binucleadas. Estos resultados son contradictorios a lo que se espera, ya que Diler and Celik., (2011), encontraron una correlación negativa entre estos biomarcadores, es decir, a medida que aumenta el índice de reparación la frecuencia de micronúcleos y

células binucleadas, disminuye, pues se está llevando a cabo una reparación adecuada. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, sugieren que los niños que están expuestos al humo de combustibles sólidos, presentan unos mecanismos de reparación poco eficientes, debido al estado aun en desarrollo de su metabolismo, absorción, excreción, tasa de detoxificación, procesos de reparación del ADN, y proliferación celular (Armstrong et al., 2002; Landrigan et al., 2004; Neri et al., 2006; Rehfuess et al., 2011; Wessels et al., 2003). Se ha observado que la reparación del ADN en niños se puede ver alterada ya sea disminuyendo o aumentando los mecanismos involucrados durante el proceso, por interacción con factores de crecimiento, activación e inactivación selectiva de genes y químicos, que interrumpen la secuencia de eventos que conlleva la reparación del ADN (Bearer, 1995). Van Leeuwen et al., (2006; 2008) encontraron sobreexpresión de genes involucrados en la condensación de la cromatina, metabolismo del ARN, sistema inmune, respuesta a patógenos y actividad antitumoral, en niños expuestos a contaminación del aire, con respecto a los padres; lo que sugiere el impacto de los contaminantes sobre los mecanismos de e integridad del ADN, como también la supresión del sistema inmune.

Otras variables caracterizadas y asociadas a la exposición al humo de combustibles sólidos en este estudio fueron enfermedades respiratorias, oculares y bajo peso al nacer; ya que la literatura sugiere que una exposición constante a los contaminantes, podrían estar influyendo en la aparición de estos problemas de salud en la población infantil. La contaminación al interior del hogar es una de las principales causas de enfermedades en adultos y la primera causa de muerte por infecciones respiratorias en niños (Rehfuess et al., 2011). Particularmente en este estudio se encontró que el 12,2% de los niños, presentaban infecciones respiratorias bajas (asma y neumonía) comparado con el 5,5% en referentes (tabla 2). La exposición crónica a la combustión de combustibles de biomasa produce la hiperreactividad bronquial (Jindal et al., 1996), estrechamiento de las vías respiratorias o inflamación de las mismas a través de la irritación (Behera et al.,

1991). Por lo tanto, puede aumentar el riesgo de asma bronquial o exacerbaciones de la enfermedad pre-existente. El 87,5% de los niños expuestos reportaron haber sufrido de irritación ocular (tabla 2). El humo de la combustión de biomasa puede generar estrés oxidativo, mediante la absorción y acumulación de toxinas que facilitan la oxidación. Sin embargo, los radicales libres presentes pueden atacar directamente el ojo, dañando potencialmente las proteínas del cristalino y la fibra de las membranas celulares de la lente hasta causar ceguera (McCarty et al., 2000; Mishra et al., 1999).

Los resultados respecto a la relación entre la contaminación del aire y el peso al nacer no son concluyentes. En este caso, se encontró que el grupo expuesto tuvo un peso al nacer 110g menor que el grupo referente, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En otros estudios llevados a cabo en niños expuestos antes del nacimiento a la contaminación del aire, no había asociación entre la exposición al material particulado menor a 10 micras, monóxido de carbono y el bajo peso al nacer (Bobak, 2000; Chen et al., 2002; Dugandzic R, 2006; Glinianaia et al., 2004; Lin et al., 2004; Maisonet et al., 2004; Parker et al., 2005). La posible explicación que le atribuyen a la falta de asociación, es por la aparición del efecto umbral, que se relaciona con la acumulación de altas concentraciones del material particulado (PM10) que se satura e impide o disminuye la cantidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos transportados a través del PM10 al feto en formación (Maisonet et al., 2001); en nuestro caso, la no significancia es atribuida al tamaño muestral, debido a que en los estudios en los que se realiza una asociación entre el bajo peso al nacer y la exposición al humo de combustibles sólidos, el tamaño de la población en promedio es de 1500 personas, como los trabajos hechos por Boy et al., (2002) y Mishra et al., (2004), donde los niños de las mujeres que cocinaban con leña y sin ventilación pesaban 63 gramos menos que los niños de las mujeres que cocinaban con combustibles más limpios (gas y electricidad). De esta manera, el análisis estadístico que se realizó en nuestro trabajo no tuvo la suficiente potencia para determinar la

diferencia entre los grupos de estudio. Sin embargo, se observó una disminución del peso al nacer atribuida a la exposición al humo de combustibles sólidos. Posiblemente la exposición al aire contaminado en el interior del hogar, genera perturbación por los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el sistema endocrino y nervioso (Groopman et al., 1995). El material particulado genera cambios en la viscosidad de la sangre, debido a la inflamación alveolar, que a su vez afecta la función placentaria (Groopman et al., 1995), y por último el monóxido de carbono se une a la hemoglobina e impide el transporte adecuado de oxígeno hacia el feto; todos estos factores resultan perjudicial para la toma de nutrientes, ganancia de peso y por ende crecimiento del feto (Glinianaia et al., 2004; Maisonet et al., 2004; Šram et al., 2005).

Nuestro estudio en esencia, demostró la alta sensibilidad del ensayo citoma de micronúcleos, al combinar los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad para evaluar la exposición de la población infantil a la contaminación intradomiciliaria. También permitió establecer que aunque los niños expuestos al humo de combustibles sólidos aún no presentan condiciones crónicas en su salud, los datos de genotoxicidad y citotoxicidad muestran que están en riesgo a desarrollarlas. Puesto que el daño al ADN y la muerte celular son considerados los principales mecanismos durante la carcinogénesis y las enfermedades crónicas. De esta manera, los resultados y conclusiones de este estudio fueron socializados a la población objeto de estudio como propósito a corto plazo. Además son de especial interés para los encargados de la formulación de estrategias sanitarias, y pueden ser la base en el diseño de programas de prevención y de salud pública más eficaces, con el fin de reducir el riesgo de salud en estas comunidades, asociado a la exposición intradomiciliaria a humo de combustibles sólidos.

9. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que los niños que están expuestos a contaminación intradomiciliaria al humo de combustibles sólidos, respecto al grupo de niños referente, tienen una frecuencia más alta de micronúcleos y células binucleadas, al igual que, una frecuencia más alta de células cariorréticas, picnóticas, cariolíticas y con cromatina condensada, producto del daño genotóxico y citotóxico ocasionado por los mutagenos químicos presentes en el humo de combustibles sólidos.

La combinación de micronúcleos y anomalías nucleares aumenta la sensibilidad del ensayo citoma de micronúcleos sobre las células epiteliales exfoliadas de la cavidad oral para la evaluación de la genotoxicidad.

El índice de reparación, como biomarcador de la dinámica degenerativa durante la homeostasis del epitelio bucal, fue más alto en el grupo de niños expuestos, comparado con el grupo de niños referentes, debido a la estimulación de los mecanismos de reparación por parte de los tóxicos presentes en el humo de combustibles sólidos, y al proceso ineficiente de estos mecanismos en los niños.

Dentro de las variables estudiadas que podrían estar modulando el efecto genotóxico y citotóxico del humo de combustibles sólidos, la etnia, ubicación de la cocina, limpieza de paredes, actividad física y dieta, afectaron significativamente la frecuencia de los biomarcadores de daño en el ADN y muerte celular.

Enfermedades respiratorias y oculares asociadas generalmente al humo de combustibles sólidos, se encontraron en mayor proporción en los individuos expuestos, lo que sugiere que esta población requiere más atención para implementar intervenciones y tratar de disminuir la aparición de futuras enfermedades que pueden convertirse en crónicas.

La medida del peso al nacer de los niños expuestos fue 110g menor que en el grupo referente, lo que indica que la exposición prolongada a los tóxicos durante la concepción podría estar disminuyendo la capacidad del feto para obtener nutrientes.

De acuerdo con los resultados, la población de niños con exposición intradomiciliaria al humo de combustibles sólidos, se encuentra en un potencial riesgo para su salud, respecto a la población de niños referente, ya que, las altas frecuencias de los biomarcadores evaluados son predictivos de riesgo a padecer envejecimiento acelerado, cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

Los resultados de la presente investigación contribuyen al conocimiento científico regional, nacional e internacional, pues, evidencian el indispensable uso de los biomarcadores citogenéticos como detectores tempranos de efectos potencialmente adversos en la salud de los niños expuestos, pertenecientes a zonas rurales del departamento del Cauca

El estudio de biomonitorio arrojó diferencias entre el grupo de niños expuestos respecto al 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 sólidos.

10. RECOMENDACIONES

Determinar las concentraciones de tóxicos presentes en el humo de combustibles sólidos durante la cocción de los alimentos y en los hogares; de esta manera al asociarlos con la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad en los niños, se podría observar con mayor precisión el daño que se está presentando en la población.

Identificar la susceptibilidad genética de los niños a los tóxicos presentes en humo de combustibles sólidos, a través de polimorfismos, ya sea genes de reparación o del metabolismo, que son ampliamente utilizados; para identificar como éstos pueden estar modulando el daño a nivel del ADN y sobre el mecanismo de muerte celular.

Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad por la exposición al humo de combustibles sólidos en niños con edades entre 1 y 5 años, debido a que estos estarían más expuestos, ya que están permanentemente junto a las madres cuando cocinan y tienen una mayor tendencia a desarrollar enfermedades respiratorias bajas.

Durante el desarrollo de este estudio se determinó que la población la cual fue objeto de estudio y que está expuesta al humo de combustibles sólidos está en riesgo de presentar problemas de salud crónica; por ende es preciso que se tomen medidas adecuadas como implementar cocinas más eficientes o el uso de combustibles más limpios para disminuir la exposición a los contaminantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Albalak, R., Frisancho, A.R., and Keeler, G.J. (1999). Domestic biomass fuel combustion and chronic bronchitis in two rural Bolivian villages. *Thorax* 54, 1004-1008.
- Alfheim, I., and Ramdahl, T. (1984). Contribution of wood combustion to indoor air pollution as measured by mutagenicity in *Salmonella* and polycyclic aromatic hydrocarbon concentration. *Environmental mutagenesis* 6, 121-130.
- Amani A R, S.M.N., Konting M M B (2010). Vitamin E and curcumin intervention on lipid-peroxidation and antioxidant defense system. *Journal of American Science* 6.
- Ames, B.N., Gold, L.S., and Willett, W.C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 5258-5265.
- Armstrong, T., Zaleski, R., Konkel, W., and Parkerton, T. (2002). A tiered approach to assessing children's exposure: a review of methods and data. *Toxicology letters* 127, 111-119.
- Asita, A., Matsui, M., Nohmi, T., Matsuoka, A., Hayashi, M., Ishidate, M., Sofuni, T., Koyano, M., and Matsushita, H. (1991). Mutagenicity of wood smoke condensates in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research Letters* 264, 7-14.
- Baier, G., Stopper, H., Kopp, C., Winkler, U., and Zwirner-Baier, I. (2002). Respiratory diseases and genotoxicity in tobacco smoke exposed children. *Laryngorhinootologie* 81, 217-225.
- Barbisan, L.F., Mello, M.L.S., Russo, J., and de Campos Vidal, B. (1999). Apoptosis and catastrophic cell death in benzo [*a*]pyrene-transformed human breast epithelial cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 431, 133-139.
- Batista-González, C.M., Corona-Rivera, J.R., Gómez-Meda, B.C., Zamora-Pérez, A.L., Ramos-Ibarra, M.L., and Zúñiga-González, G. (2006). Micronucleated erythrocytes in preterm newborns in relation to maternal pathology. *Rev Biomed* 17, 11-16.
- Bearer, C.F. (1995). How are children different from adults? *Environmental Health Perspectives* 103, 7.
- Behera, D., Dash, S., and Yadav, S. (1991). Carboxyhaemoglobin in women exposed to different cooking fuels. *Thorax* 46, 344-346.
- Black, R.E., Morris, S.S., and Bryce, J. (2003). Where and why are 10 million children dying every year? *The Lancet* 361, 2226-2234.
- Bobak, M. (2000). Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environmental Health Perspectives* 108, 173.
- Bohr, V.A., and Michael Anson, R. (1995). DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutation Research/DNAging* 338, 25-34.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalpra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., and Lando, C. (1997). Age-related increase of baseline frequencies of sister

chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 6, 249-256.

Bølling, A.K., Pagels, J., Yttri, K.E., Barregard, L., Sallsten, G., Schwarze, P.E., and Boman, C. (2009). Health effects of residential wood smoke particles: the importance of combustion conditions and physicochemical particle properties. *Particle and fibre toxicology* 6, 29.

Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., *et al.* (2011). The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 728, 88-97.

Bonassi, S., Fontana, V., Ceppi, M., Barale, R., and Biggeri, A. (1999). Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of high sister chromatid exchange frequency cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 438, 13-21.

Bonilla, J.F., Narváez, R., and Chuairé, L. (2005). Sports as a cause of oxidative stress and hemolysis. *Colombia Médica* 36, 275-280.

Boy, E., Bruce, N., and Delgado, H. (2002). Birth weight and exposure to kitchen wood smoke during pregnancy in rural Guatemala. *Environmental Health Perspectives* 110, 109.

Bravo, C., and Leon, C. (2008). frecuencia de alteraciones cromosomicas asociadas con la exposicion cronica al humo de leña como un factor de riesgo en la salud de mujeres expuestas, pertenecientes a areas rurales aledañas al municipio de Popayan (Cauca). trabajo de grado (Biologo) Universidad del Cauca Facultad de Ciencias Naturales y de la Educacion Departamento de Biologia Popayan.

Bruce, N., Perez-Padilla, R., and Albalak, R. (2000). Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 1078-1092.

Calderón-Garcidueñas, L., Wen-Wang, L., Zhang, Y.J., Rodríguez-Alcaraz, A., Osnaya, N., Villarreal-Calderón, A., and Santella, R.M. (1999). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environmental Health Perspectives* 107, 469.

Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Butterworth, F.M., and Amador-Muñoz, O. (2004). The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in México City. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 558, 7-17.

Carvalho, I., Cavalcante, A.A.M., Dantas, A.F., Pereira, D.L.A., Rocha, F.C.C., de Oliveira, F.M., and Da Silva, J. (2011). Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. *Chemosphere* 82, 1056-1061.

Çelik, A., Çavaş, T., and Ergene-Gözükara, S. (2003). Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis* 18, 417-421.

Çelik, A., Diler, S.B., and Eke, D. (2010). Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA and Cell Biology* 29, 277-284.

Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., and Bonassi, S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705, 11-19.

Clarkson, P.M., and Thompson, H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition* 72, 637s-646s.

Collins, A.R. (1998). Molecular epidemiology in cancer research. *Molecular Aspects of Medicine* 19, 359-432.

Constituyente, A.N. (1991). Constitución política de Colombia. Consejería para la Modernización del Estado.

Core, J., Cooper, J., and Neulicht, R. (1984). Current and projected impacts of residential wood combustion on Pacific Northwest air quality. *J Air Pollut Control Assoc;(United States)* 34.

Craig, L., Brook, J.R., Chiotti, Q., Croes, B., Gower, S., Hedley, A., Krewski, D., Krupnick, A., Krzyzanowski, M., and Moran, M.D. (2008). Air pollution and public health: a guidance document for risk managers. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 71, 588-698.

Cross, A.J., and Sinha, R. (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and molecular mutagenesis* 44, 44-55.

Cupitt, L.T., Glen, W.G., and Lewtas, J. (1994). Exposure and risk from ambient particle-bound pollution in an airshed dominated by residential wood combustion and mobile sources. *Environmental Health Perspectives* 102, 75.

Chen, C., Arjomandi, M., Qin, H., Balmes, J., Tager, I., and Holland, N. (2006). Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis* 21, 131.

Chen, L., Yang, W., Jennison, B.L., Goodrich, A., and Omaye, S.T. (2002). Air pollution and birth weight in northern Nevada, 1991-1999. *Inhalation Toxicology* 14, 141-157.

DANE (2005). Censo General 2005: Nivel nacional. Censo General 2005: Nivel nacional.

Danielsen, P.H., Bräuner, E.V., Barregard, L., Sällsten, G., Wallin, M., Olinski, R., Rozalski, R., Møller, P., and Loft, S. (2008). Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 642, 37-42.

Danielsen, P.H., Loft, S., Kocbach, A., Schwarze, P.E., and Møller, P. (2009). Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674, 116-122.

de Koning, H.W., Smith, K., and Last, J. (1985). Biomass fuel combustion and health. *Bulletin of the World Health Organization* 63, 11.

Dejmek, J., Selevan, S.G., Benes, I., Solanský, I., and Srám, R.J. (1999). Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 107, 475.

Delgado, J., Martinez, L.M., Sánchez, T.T., Ramirez, A., Iturria, C., and González-Avila, G. (2005). Lung Cancer Pathogenesis Associated With Wood Smoke Exposure*. *Chest* 128, 124-131.

Didenko, V.V. (2011). DNA damage detection in situ, ex vivo, and in vivo : methods and protocols (New York; London, Humana Press).

Diler, S.B., and Çelik, A. (2011). Cytogenetic biomonitoring of carpet fabric workers using micronucleus frequency, nuclear changes, and the calculation of risk assessment by repair index in exfoliated mucosa cells. *DNA and Cell Biology* 30, 821-827.

Dugandzic R, D.L., Stieb D, Smith-Doiron M (2006). The association between low level exposures to ambient air pollution and term low birth weight: a retrospective. *Environ Health*; doi:10.1186/1476-069X5-3.

Feigelson, H.S., Ross, R.K., Yu, M.C., Coetzee, G.A., Reichardt, J.K.V., and Henderson, B.E. (1998). Genetic susceptibility to cancer from exogenous and endogenous exposures. *Journal of Cellular Biochemistry* 63, 15-22.

Fenech, M., and Crott, J.W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 504, 131-136.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., and Bonassi, S. (1999). The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 428, 271-283.

Fontes, P.C., Corrêa, G.H.M., Issa, J.S., Brandão, A.A.H., and Almeida, J.D. (2008). Comparison of exfoliative Pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head and neck pathology* 2, 157-162.

Garte, S. (1998). The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis* 19, 1329-1332.

Glinianaia, S.V., Rankin, J., Bell, R., Pless-Mulloli, T., and Howel, D. (2004). Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology* 15, 36-45.

Groopman, J.D., Kensler, T.W., and Links, J.M. (1995). Molecular epidemiology and human risk monitoring. *Toxicology letters* 82, 763-769.

Hadnagy, W., and Seemayer, N. (1986). Induction of C-type metaphases and aneuploidy in cultures of V79 cells exposed to extract of automobile exhaust particulates. *Mutagenesis* 1, 445-448.

Hadnagy, W., and Seemayer, N. (1988). Cytotoxic and genotoxic effects of extract of particulate emission from a gasoline-powered engine. *Environmental mutagenesis* 12, 385-396.

Hanawalt, P.C., Gee, P., Ho, L., Hsu, R.K., and Kane, C.J.M. (1992). Genomic heterogeneity of DNA repair. *Annals of the New York Academy of Sciences* 663, 17-25.

Hays, M.D., Geron, C.D., Linna, K.J., Smith, N.D., and Schauer, J.J. (2002). Speciation of gas-phase and fine particle emissions from burning of foliar fuels. *Environmental science & technology* 36, 2281-2295.

Hernández, M.A.R., and Menéndez, M.H. (2001). Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol* 17, 65-71.

Herrera-Portugal, C., Franco-Sánchez, G., Pelayes Cruz, M., Schlottfeldt Trujillo, Y., and Pérez Solís, B.L. (2009). Daño al ADN en mujeres expuestas al humo de la leña en Chiapas, México. *Acta toxicológica argentina* 17, 56-61.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., and Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659, 93-108.

Huen, K., Gunn, L., Duramad, P., Jeng, M., Scalf, R., and Holland, N. (2006). Application of a geographic information system to explore associations between air pollution and micronucleus frequencies in African American children and adults. *Environmental and molecular mutagenesis* 47, 236-246.

Hytonen, S., Alfheim, I., and Sorsa, M. (1983). Effect of emissions from residential wood stoves on SCE induction in CHO cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 118, 69-75.

IARC (2006). Household Use of Solid Fuels and High-temperature Frying. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 95.

Iarmarcovai, G., Ceppi, M., Botta, A., Orsiere, T., and Bonassi, S. (2008). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659, 274-283.

Jacobs, P.A., and Doll, R. (1961). Distribution of human chromosome counts in relation to age. *Nature* 191, 1178.

Jagerstad, M., and Skog, K. (2005). Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* 574.

Jin, Y., Zhou, Z., He, G., Wei, H., Liu, J., Liu, F., Tang, N., Ying, B., Liu, Y., and Hu, G. (2005). Geographical, spatial, and temporal distributions of multiple indoor air pollutants in four Chinese provinces. *Environmental science & technology* 39, 9431-9439.

Jindal, S., Gupta, D., D'souza, G., and Kalra, S. (1996). Bronchial responsiveness of non-smoking women exposed to environmental tobacco smoke or biomass fuel combustion. *The Indian journal of medical research* 104, 359.

Kamens, R., Bell, D., Dietrich, A., Perry, J., Goodman, R., Claxton, L., and Tejada, S. (1985). Mutagenic transformations of dilute wood smoke systems in the presence of ozone and nitrogen dioxide. Analysis of selected high-pressure liquid chromatography fractions from wood smoke particle extracts. *Environmental science & technology* 19, 63-69.

Kato, M., Loomis, D., Brooks, L.M., Gattas, G.F.J., Gomes, L., Carvalho, A.B., Rego, M.A.V., and DeMarini, D.M. (2004). Urinary biomarkers in charcoal workers exposed to wood smoke in Bahia State, Brazil. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13, 1005-1012.

Kleeman, M.J., Schauer, J.J., and Cass, G.R. (1999). Size and composition distribution of fine particulate matter emitted from wood burning, meat charbroiling, and cigarettes. *Environmental science & technology* 33, 3516-3523.

- Koch, D., and Hansen, J. (2005). Distant origins of Arctic black carbon: a Goddard Institute for Space Studies ModelE experiment. *J Geophys Res* 110.
- Kyprianou, N., English, H.F., and Isaacs, J.T. (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer research* 50, 3748-3753.
- Landrigan, P.J., Kimmel, C.A., Correa, A., and Eskenazi, B. (2004). Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 112, 257.
- Lewtas, J. (1993). Complex mixtures of air pollutants: characterizing the cancer risk of polycyclic organic matter. *Environmental Health Perspectives* 100, 211.
- Liang, C., Quan, N., Cao, S., He, X., and Ma, F. (1988). Natural inhalation exposure to coal smoke and wood smoke induces lung cancer in mice and rats. *Biomedical and environmental sciences: BES* 1, 42.
- Lin, C.-M., Li, C.-Y., Yang, G.-Y., and Mao, I.-F. (2004). Association between maternal exposure to elevated ambient sulfur dioxide during pregnancy and term low birth weight. *Environmental research* 96, 41.
- Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897-1905.
- Maisonet, M., Bush, T.J., Correa, A., and Jaakkola, J. (2001). Relation between ambient air pollution and low birth weight in the Northeastern United States. *Environmental Health Perspectives* 109, 351.
- Maisonet, M., Correa, A., Misra, D., and Jaakkola, J.J. (2004). A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environmental research* 95, 106-115.
- Majer, B.J., Laky, B., Knasmüller, S., and Kassie, F. (2001). Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 489, 147-172.
- Martínez, C.D., Vargas, C.R., and Arancibia, S.R. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración.
- Masters, B., Gonnord, G., and Corcuff, P. (1997). Three-dimensional microscopic biopsy of in vivo human skin: a new technique based on a flexible confocal microscope. *Journal of microscopy* 185, 329-338.
- Mavalankar, D., Trivedi, C., and Gray, R. (1991). Levels and risk factors for perinatal mortality in Ahmedabad, India. *Bulletin of the World Health Organization* 69, 435.
- McCarty, C.A., Nanjan, M.B., and Taylor, H.R. (2000). Attributable risk estimates for cataract to prioritize medical and public health action. *Investigative ophthalmology & visual science* 41, 3720-3725.
- Michael, J.A.B.D.W. (1998). Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 54, 579-591.

Mishra, V., Dai, X., Smith, K.R., and Mika, L. (2004). Maternal exposure to biomass smoke and reduced birth weight in Zimbabwe. *Annals of epidemiology* 14, 740-747.

Mishra, V.K., Retherford, R.D., and Smith, K.R. (1999). Biomass cooking fuels and prevalence of tuberculosis in India. *International Journal of Infectious Diseases* 3, 119-129.

Mondal, N., Mukherjee, B., Das, D., and Ray, M.R. (2010). Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 697, 47-54.

Mondal, N.K., Bhattacharya, P., and Ray, M.R. (2011). Assessment of DNA damage by comet assay and fast halo assay in buccal epithelial cells of Indian women chronically exposed to biomass smoke. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 311-318.

Murray, C.J.L., Lopez, A.D., Mathers, C.D., and Stein, C. (2001). The Global Burden of Disease 2000 project: aims, methods and data sources (GPE Discussion Paper).

Musthapa, M.S., Lohani, M., Tiwari, S., Mathur, N., Prasad, R., and Rahman, Q. (2004). Cytogenetic biomonitoring of Indian women cooking with biofuels: micronucleus and chromosomal aberration tests in peripheral blood lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis* 43, 243-249.

N.T. Holland, A.H., L. Schumacher, L. Gunn, D., and Golden, P.D., M.T. Smith (2001). Factors affecting micronucleus frequency in exfoliated buccal and urothelial cells of adults and children. *Environ Mol Mutagen (Suppl 32)* 37.

Naeher, L.P., Brauer, M., Lipsett, M., Zelikoff, J.T., Simpson, C.D., Koenig, J.Q., and Smith, K.R. (2007). Woodsmoke health effects: a review. *Inhalation Toxicology* 19, 67-106.

Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L.E., Lando, C., Merlo, F., and Bonassi, S. (2003a). Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 243-254.

Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L.E., Lando, C., Merlo, F., and Bonassi, S. (2003b). Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutation research* 544, 243.

Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L.E., Šrám, R.J., Ceppi, M., Bocchini, V., and Merlo, D.F. (2006). Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage: II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 612, 14-39.

Nersesyan, A.K. (2005). Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutation research* 588, 64.

Neymark, J., and Judkoff, R. (2002). International Energy Agency Building Energy Simulation Test and Diagnostic Method for Heating, Ventilating, and Air-Conditioning Equipment Models (HVAC BESTEST); Volume 1: Cases E100-E200 (National Renewable Energy Lab., Golden, CO.(US)).

ONU (2003). Human Development Report 2003: Millennium development goals: a compact among nations to end human poverty (Oxford University Press).

Özkul, Y., Donmez, H., Erenmemisoglu, A., Demirtas, H., and Imamoglu, N. (1997). Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis* 12, 285.

- Parker, J.D., Woodruff, T.J., Basu, R., and Schoendorf, K.C. (2005). Air pollution and birth weight among term infants in California. *Pediatrics* 115, 121-128.
- Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I., and Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 3334-3340.
- Perera, F.P., Illman, S.M., Kinney, P.L., Whyatt, R.M., Kelvin, E.A., Shepard, P., Evans, D., Fullilove, M., Ford, J., and Miller, R.L. (2002). The challenge of preventing environmentally related disease in young children: community-based research in New York City. *Environmental Health Perspectives* 110, 197.
- Perera, F.P., and Weinstein, I.B. (2000). Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 21, 517.
- Pindborg, J., Reibel, J., Roed-Petersen, B., and Mehta, F. (1980). Tobacco-induced changes in oral leukoplakic epithelium. *Cancer* 45, 2330-2336.
- Raimondi, S., Garte, S., Sram, R.J., Binkova, B., Kalina, I., Lyubomirova, K., Taioli, E., Singh, R., and Farmer, P.B. (2007). Effects of diet on biomarkers of exposure and effects, and on oxidative damage. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 620, 93-102.
- Ramirez, A., and Saldanha, P.H. (2002). Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 1, 246-260.
- Randerath, K., Li, D., Nath, R., and Randerath, E. (1992). Exogenous and endogenous DNA modifications as monitored by ³²P-postlabeling: Relationships to cancer and aging. *Experimental gerontology* 27, 533-549.
- Rehfuess, E. (2007). *Energía doméstica y salud: Combustibles para una vida mejor* (World Health Organization).
- Rehfuess, E., Bruce, N., and Smith, K. (2011). Solid Fuel Use: Health Effect. In: Nriagu JO (ed.) *Encyclopedia of Environmental Health*, v 5, pp. 150161 Burlington: Elsevier, 2011. *Environmental Health* 5, 150161.
- Richard, F., Aurias, A., Couturier, J., Dutrillaux, A.M., Flury-Hérard, A., Gerbault-Seureau, M., Hoffschir, F., Lamoliatte, E., Lefrançois, D., and Lombard, M. (1993). Aneuploidy in human lymphocytes: an extensive study of eight individuals of various ages. *Mutation Research/DNAging* 295, 71-80.
- Rogge, W.F., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass, G.R., and Simoneit, B.R.T. (1998). Sources of fine organic aerosol. 9. Pine, oak, and synthetic log combustion in residential fireplaces. *Environmental science & technology* 32, 13-22.
- Rosin, M.P. (1992). The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 267, 265-276.
- Rössner, P., Bavorova, H., Ocadlikova, D., Svandova, E., and Sram, R. (2002). Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of children as biomarkers of environmental exposure and life style. *Toxicology letters* 134, 79-85.

Rudan, I., Tomaskovic, L., Boschi-Pinto, C., and Campbell, H. (2004). Global estimate of the incidence of clinical pneumonia among children under five years of age. *Bulletin of the World Health Organization* 82, 895-903.

Saksena, S., Thompson, L., and Smith, K. (2004). Indoor air pollution and exposure database: household measurements in developing countries. *Indoor air pollution and exposure database: household measurements in developing countries*.

Sánchez-Guerra, M., Pelallo-Martínez, N., Díaz-Barriga, F., Rothenberg, S.J., Hernández-Cadena, L., Faugeron, S., Oropeza-Hernández, L.F., Guaderrama-Díaz, M., and Quintanilla-Vega, B. (2012). Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 742, 66-71.

Sánchez-Rodríguez, M.A., Santiago-Osorio, E., Vargas, L.A., and Mendoza-Núñez, V.M. (2004). Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica* 29, 81-90.

Sarto, F., Tomanin, R., Giacomelli, L., Iannini, G., and Cupiraggi, A. (1990). The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutation Research Letters* 244, 345-351.

Schei, M.A., Hessen, J.O., Smith, K.R., Bruce, N., McCracken, J., and Lopez, V. (2004). Childhood asthma and indoor woodsmoke from cooking in Guatemala. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 14, S110-S117.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation research* 31, 9.

Serra-Baldrich, and Tribo (1991). Antioxidantes A propósito de: Vitamina A,C,E en la prevención del cancer Escuela de Nutricion, Universidad de granada Nutrición Clínica II, 34-44.

Shi, Q., and King, R.W. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, 1038-1042.

Shklar, G. (1968). Patterns of keratinization in oral leukoplakia. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery* 87, 400-404.

Shojaei, A.H. (1998). Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci* 1, 15-30.

Sisenando, H.A., de Medeiros, S.R.B., Artaxo, P., Saldiva, P.H.N., and de Souza Hacon, S. (2012). Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *BMC Oral Health* 12, 6.

Sjögren, M., Ehrenberg, L., and Rannug, U. (1996). Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 358, 97-112.

Smith, K.R. (1987). *Biofuels, air pollution, and health: a global review* (Plenum press).

Smith, K.R. (2000). National burden of disease in India from indoor air pollution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13286.

- Smith, K.R., Samet, J.M., Romieu, I., and Bruce, N. (2000). Indoor air pollution in developing countries and acute lower respiratory infections in children. *Thorax* 55, 518-532.
- Squier, C., and Brogden, K. (2011). *Human oral mucosa: development, structure and function* (Wiley-Blackwell).
- Squier, C.A., and Kremer, M.J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *JNCI Monographs* 2001, 7-15.
- Sram, R. (1999). Impact of air pollution on reproductive health. *Environmental Health Perspectives* 107, A542.
- Šram, R.J., Binková, B., Dejmek, J., and Bobak, M. (2005). Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environmental Health Perspectives* 113, 375.
- Stellman, J.M., and Finklea, J. (1999). *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones).
- Talaska, G., Jaeger, M., Reilman, R., Collins, T., and Warshawsky, D. (1996). Chronic, topical exposure to benzo [a] pyrene induces relatively high steady-state levels of DNA adducts in target tissues and alters kinetics of adduct loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 7789-7793.
- Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T., and Fenech, M. (2008). The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 638, 37-47.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., and Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols* 4, 825-837.
- Tian, L. (2006). Coal combustion emissions and lung cancer in Xuan Wei, China (University of California, Berkeley).
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., and Allen, J.W. (1991a). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *American journal of epidemiology* 134, 840-850.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., and Allen, J.W. (1991b). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *American journal of epidemiology* 134, 840.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., and Allen, J.W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 271, 69-77.
- Torres, W.H. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mens Bioquim* 26, 19-53.
- Tzintzun-Cervantes, G., Zuk, M., and Cruz, J. (2005). Evaluación de concentraciones micrambientales de partículas suspendidas en hogares rurales de Michoacan y las actividades que influyen la exposición personal. *INE-INSP Mexico DF*, 50.
- Ünal, M., Çelik, A., Ateş, N.A., Micozkadioğlu, D., Derici, E., Pata, Y.S., and Akbaş, Y. (2005). Cytogenetic biomonitoring in children with chronic tonsillitis: Micronucleus frequency in exfoliated buccal epithelium cells. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 69, 1483-1488.

van den Berg, R., van Vliet, T., Broekmans, W.M., Cnubben, N.H., Vaes, W.H., Roza, L., Haenen, G.R., Bast, A., and van den Berg, H. (2001). A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *The Journal of nutrition* 131, 1714-1722.

Van Leeuwen, D., van Herwijnen, M., Pedersen, M., Knudsen, L.E., Kirsch-Volders, M., Sram, R., Staal, Y., Bajak, E., van Delft, J., and Kleinjans, J. (2006). Genome-wide differential gene expression in children exposed to air pollution in the Czech Republic. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600, 12-22.

Van Leeuwen, D.M., Pedersen, M., Hendriksen, P.J., Boorsma, A., van Herwijnen, M.H., Gottschalk, R.W., Kirsch-Volders, M., Knudsen, L.E., Šrám, R.J., and Bajak, E. (2008). Genomic analysis suggests higher susceptibility of children to air pollution. *Carcinogenesis* 29, 977-983.

Van Lerberghe, W. (2008). *The world health report 2008: primary health care: now more than ever* (World Health Organization).

Veiro, J., and Cummins, P. (1994). Imaging of skin epidermis from various origins using confocal laser scanning microscopy. *Dermatology* 189, 16-22.

Venkataraman, C., Habib, G., Eiguren-Fernandez, A., Miguel, A., and Friedlander, S. (2005). Residential biofuels in South Asia: carbonaceous aerosol emissions and climate impacts. *Science* 307, 1454.

Wessels, D., Barr, D.B., and Mendola, P. (2003). Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. *Environmental Health Perspectives* 111, 1939.

WHO (2002). *The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life*. Geneva: WHO; 2002. World Health Organization, 72-74.

WHO (2006). *Fuel for life: household energy and health* (World Health Organization).

WHO (2009). *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks* (World Health Organization).

Wilhelm, M., Ewers, U., Wittsiepe, J., Fürst, P., Hölzer, J., Eberwein, G., Angerer, J., Marczyński, B., and Ranft, U. (2007). Human biomonitoring studies in north rhine-westphalia, germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 210, 307-318.

Wu, X., Zhao, H., Amos, C.I., Shete, S., Maken, N., Hong, W.K., Kadlubar, F.F., and Spitz, M.R. (2002). p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 681-690.

Wyllie, A. (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. *Cell death in biology and pathology*.

Zhang, J., and Smith, K.R. (1996). Hydrocarbon emissions and health risks from cookstoves in developing countries. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 6, 147.

ANEXOS

Anexo A. CONSENTIMIENTO INFORMADO

_____, con cédula de ciudadanía _____ y tutor legal del menor _____, identificado con la tarjeta de identidad _____, confirmo que he sido informado por grupo de **INVESTIGACIÓN DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA** de la Universidad del Cauca, que realizará el estudio “**evaluación del efecto citotóxico, genotóxico e índice de reparación en el epitelio bucal de niños expuestos al humo de combustibles sólidos mediante el ensayo citoma de micronúcleos**”. Se me ha solicitado como tutor legal permitir al infante que tengo a mi cargo participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO: El objetivo del estudio es evaluar el riesgo a desarrollar problemas de salud debido a la exposición crónica al humo de biomasa en una población infantil expuesta y una referente, no expuesta, mediante una técnica rápida y sencilla denominada “ensayo citoma de micronúcleos”, donde se utilizan marcadores genéticos de exposición y efecto. El propósito será evaluar cambios en las células del epitelio bucal producidos por la exposición al humo de biomasa que ayuden a detectar riesgos en la salud de las personas expuestas de manera temprana para adoptar medidas de prevención. De este modo la investigación tiene relevancia social y científica y obedece a una problemática de salud ambiental.

HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITOS, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO: En este estudio serán seleccionados 50 niños expuestos al humo de biomasa y 50 niños no expuestos como grupo referente, con el fin de conocer al momento del análisis de los resultados, los efectos genotóxicos y citotóxicos de esta exposición. El estudio se desarrollará como una estrategia en la búsqueda de mecanismos que disminuyan el impacto de la exposición crónica al humo de combustibles sólidos en la salud, el cual es el factor de riesgo número uno de polución al interior de los hogares a nivel nacional y mundial.

Sobre la competencia, formación y calidad de los investigadores es responsable la Universidad del Cauca. Los resultados del estudio son confidenciales y serán informados al grupo y para efectos de publicación los resultados se representarán en forma anónima.

REQUERIMIENTOS: en pleno uso de mis facultades mentales, libre, consiente y como tutor legal del infante, estoy de acuerdo en dar la aprobación para que el niño participe, entendiéndolo que se requiere lo siguiente: contestar un cuestionario de aproximadamente 20 minutos para suministrar información personal referente a la edad, estado de salud, estilo de vida, historia de exposición residencial y familiar. Si el niño es seleccionado para el estudio debe donar una muestra de células de epitelio bucal obtenida mediante un cepillo citológico estéril y depositado en un contenedor apropiado para tal fin y en forma aséptica para evitar complicaciones. Las muestras serán procesadas en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca para el ensayo citoma de micronúcleos.

RIESGO DE PARTICIPACIÓN. La toma de la muestra de células epiteliales de la mucosa oral no representa o incluye riesgos potenciales. Para garantizar la confiabilidad de los datos, los cuestionarios y resultados de las pruebas serán codificadas y se darán a conocer en forma grupal más no individual en un seminario.

BENEFICIOS DE PARTICIPACIÓN. Socialización voluntaria para dar a conocer los resultados grupales, de esta manera, motivar a la gente y entidades encargadas hacia la intervención que

promueva el cambio de actitud para prevenir el riesgo en la salud de los niños por la exposición crónica al humo de leña. Conocer los resultados del estudio.

COMO TUTOR ENTIENDO QUE: La participación del niño es completamente voluntaria y puedo rehusarme a responder cualquier pregunta si así lo deseo o puedo tomar libremente la decisión de finalizar la participación en este monitoreo en cualquier momento, sin que ello represente perjuicios de índole legal. La información recolectada será tratada de manera confidencial y las respuestas serán reunidas con las de otros participantes para obtener resultados grupales. La Universidad del Cauca se compromete

a vigilar que las muestras biológicas sean tomadas en un contenedor apropiado para tal fin y en forma aséptica para evitar complicaciones.

Tengo claro que por la participación voluntaria del infante, no recibiré ninguna compensación económica. Además, puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga antes, durante o después del estudio, a la Docente Nohelia Cajas Salazar de la Universidad del Cauca directora del estudio, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética en la carrera 2º No. 1ª 25 Barrio Caldas, Popayán, en los teléfonos 8209800 Ext. 2643. La firma del documento del consentimiento informado es requerida para todas las personas participantes en un estudio como éste. Los procedimientos alternativos principales incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, han sido explicados en un lenguaje claro que he podido entender.

También entiendo que como el nombre del infante no será vinculado con los resultados del estudio, la docente Nohelia Cajas Salazar y el personal a cargo del proyecto no estarán en la posibilidad de informar a ninguna persona sobre los resultados de las pruebas. Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma grupal sin que se dé a conocer el nombre del infante.

Los resultados de este proyecto de investigación no serán usados para discriminación social, cultural, económica religiosa ni de ninguna índole

He leído este consentimiento, he entendido en qué consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto dar el permiso al niño, como tutor legal para participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico **“evaluación del efecto citotóxico, genotóxico e índice de reparación en el epitelio bucal de niños expuestos al humo de combustibles sólidos mediante el ensayo citoma de micronúcleos”**

Nombre del Participante

Nombre del Tutor Legal del Participante

Firma/huella del Tutor Legal del Participante

Nombre del Testigo

Firma/huella del Testigo

Dra. Nohelia Cajas
Director del proyecto

Firmado en _____ a los _____ días del mes de _____ de 2012

Anexo B. ENCUESTA

CÓDIGO

FECHA: DD/MM/AAAA [] [] []

SECCIÓN A. INFORMACIÓN DEMOGRÁFICA

A1. DOCUMENTO DE IDENTIDAD:

A2. NOMBRES Y APELLIDOS

A3. TELÉFONOS

A4. DIRECCIÓN PERMANENTE

A5. FECHA DE NACIMIENTO:

DD/MM/AAAA [] [] []

A6. EDAD []

A7. SEXO: 1. MASCULINO

2. FEMENINO

A8. ETNIA:

1. INDIGENA 3. NEGRA 5. MULATA

2. BLANCA 4. MESTIZA

A9. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICA

ESTATURA (cm) _____ PESO (Kg) _____

A10. LUGAR DE NACIMIENTO

DEPARTAMENTO _____

MUNICIPIO _____

1. RURAL CABECERA

2. RURAL DISPERSO

VDA/ _____

A11. LUGAR DE VIVIENDA

DEPARTAMENTO _____

MUNICIPIO _____

1. RURAL CABECERA

2. RURAL DISPERSO

VDA/ _____

CUANTOS AÑOS HA VIVIDO ALLÍ ()

SECCIÓN B. EXPOSICIÓN

B1. ESTA USTED EXPUESTO AL HUMO DE COMBUSTIBLES SÓLIDOS

0. NO 1. SÍ CUANTAS HORAS _____

B2. TIPO DE EXPOSICIÓN

1. ANTES DE NACER 2. DESPUÉS DE NACER

3. AMBAS

B3. PESO AL NACER

PESO _____

B4. QUE COMBUSTIBLE USAN PARA COCINAR

1. LEÑA 2. CARBÓN 3. KEROSENO

4. ESTIÉRCOL

5. RASTROJOS 6. RESIDUOS DE CULTIVO

7. OTROS _____

B5. CUANTO TIEMPO ESTA PRENDIDO EL FOGÓN (horas)

1. 2h 2. 3-4h 3. Más de 4h

B6. UTILIZAN EL HUMO DEL FOGÓN

0. NO 1. SÍ

B6.1 PARA QUE UTILIZAN EL HUMO DEL FOGÓN

1. AHUYENTAR INSECTOS 2. AHUMAR

3. ALIMENTOS

4. OTROS _____

B7. APLICAN PLAGUICIDAS CERCA DE SU VIVIENDA

0. NO 1. SÍ

B8. FRECUENCIA CON LA QUE BARREN SU VIVIENDA

1. DIARIO 2. DOS VECES POR SEMANA

3. SEMANAL 4. QUINCENAL

B9. FRECUENCIA DE LIMPIEZA DE LAS PAREDES EN SU VIVIENDA

0. NUNCA 1. DIARIO 2. DOS VECES SEMANA

3. SEMANAL 4. QUINCENAL

B10. COCINA CON VENTILACION

0. NO 1. SÍ

B11. UBICACIÓN DE LA COCINA:

1. DENTRO DE LA CASA 2. FUERA DE LA CASA

B12. UBICACIÓN DE LA COCINA DENTRO DE LA CASA

1. JUNTO A LA SALA 2. JUNTO A LAS HABITACIONES

B13. EN CASA QUIEN COCINA

1. USTED 2. PADRES 3. OTRO

SECCIÓN C. CARACTERÍSTICAS DE LA VIVIENDA DONDE VIVE

C1. TIPO DE PISOS QUE PREDOMINA EN LA CASA

1. TIERRA 2. CEMENTO
3. BALDOSA 4. OTROS _____

C2. DONDE OBTIENE EL AGUA POTABLE

1. ACUEDUCTO 2. POZO O ALJIBE
3. RIO O MANANTIAL
4. OTROS _____

C3. TRATAMIENTO DEL AGUA

0. NINGUNO 2. HERVIDO 3. FILTRADO
4. FILTRADO/HERVIDO 5. OTRO

SECCIÓN D. ESTILO DE VIDA

D1. REALIZA ACTIVIDAD FISICA 0. NO 1. SI

D1.1 CUANTAS VECES A LA SEMANA

1. 1 vez 2. 2-3 veces 3. 4-5 veces 4. MAS DE 5 veces

D1.2 CUANTAS HORAS AL DÍA

1. 1h 2. 2h 3. 3h 4. MAS DE 4h

SECCIÓN E. INFORMACIÓN SOBRE EL ESTADO DE SALUD

E1. ALTERACIONES RESPIRATORIAS

1. IRRITACIÓN NASAL 6. DISNEA
7. EPISTAXIS
2. ARDOR GARGANTA 8. ASMA
9. NEUMONÍA
3. TOS SECA 10. OTRA _____
4. OBSTRUCCIÓN NASAL

5. SEQUEDAD NASAL

E2. ALTERACIONES OCULARES

1. LAGRIMEO 2. IRRITACIÓN OCULAR
3. CONJUNTIVITIS 4. OTRA _____

E3. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS

1. DOLOR DE CABEZA 2. FATIGA
3. SOMNOLENCIA 4. MAREO
5. OTRA _____

E4. HA TENIDO PROBLEMAS DE SALUD

0. NO 1. SI CUAL _____

E5. CONSUME ALGÚN TIPO DE MEDICAMENTO

0. NO 1. SI Que Medicamento:

SECCIÓN F. INFORMACIÓN SOBRE HIGIENE ORAL

F1. CUANTAS VECES AL DÍA SE CEPILLA

1. 1 2. 2-3 3. 4-5 4. MÁS DE 5

F2. QUE MARCA DE CREMA DENTAL USA _____

F3. UTILIZA ENJUAGUE BUCAL 0. NO 1. SI

F4. LE SANGRAN LAS ENCÍAS AL CEPILLARSE

0. NO 1. SI

F5. HA SUFRIDO ALGUNA AFECCIÓN EN LAS ENCÍAS

0. NO 1. SI DE QUE TIPO:

F6. HA TENIDO LESIONES EN LA MUCOSA ORAL

0. NO 1. SI CUAL _____

SECCIÓN G. INFORMACIÓN FAMILIAR

G1. NOMBRES Y APELLIDOS DE LOS PADRES

MAMÁ _____

PAPÁ _____

G3. EN CUANTO ESTIMARÍA USTED LOS INGRESOS MENSUALES

1. MENOS DE UN SALARIO MÍNIMO

2. MAS DE UN SALARIO MÍNIMO

G.4 EXISTEN PROBLEMAS DE SALUD EN SU FAMILIA

0. NO 1. SI

G4.1 CÁNCER

1. PAPA 2. MAMA

3. HERMANO(A) 4. TÍO (A) 5.

ABUELOS

G4.2 MONGOLISMO O SÍNDROME DE DOWN

1. PAPA 2. MAMA

3. HERMANO(A) 4. TÍO (A) 5.

ABUELOS

G4.3 ABORTOS ESPONTÁNEOS, NACIMIENTO DE NIÑOS MUERTOS, PARTOS PREMATUROS

1. PAPA 2. MAMA

3. HERMANO(A) 4. TÍO (A) 5.

ABUELOS

G5. ALGUNA PERSONA DENTRO DEL HOGAR CONSUME CIGARRILLOS

0. NO 1. SI
G6. ALGUNA VEZ LA MADRE, EN ESTADO DE GESTACIÓN FUMO CIGARRILLOS
0. NO 1. SI
G7. ALGUNA VEZ LA MADRE EN ESTADO DE GESTACIÓN CONSUMIÓ SUSTANCIAS PSICOACTIVAS
0. NO 1. SI
G8. ALGUNA VEZ LA MADRE EN ESTADO DE GESTACIÓN CONSUMIÓ BEBIDAS ALCOHÓLICAS
0. NO 1. SI

SECCIÓN H. HÁBITOS ALIMENTICIOS Y NUTRICIÓN

H1. CUANTAS COMIDAS CONSUME USTED AL DÍA

1. 1-2 2. 3-4 3. 4-5 4. MÁS DE 5

H2. LAVAN SUS ALIMENTOS ANTES DEL CONSUMO

0. NUNCA 1. ALGUNAS VECES
2. SIEMPRE

H3. FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS REFritos

0. NUNCA 1. ALGUNAS VECES
2. SIEMPRE

H4. COMO SUELE PRESERVAR LA CARNE Y EL PESCADO

0. NO PRESERVA 1. REFRIGERADO 2. SALADO 3. AHUMADO 4. SALADO Y AHUMADO

H.4.1 FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS AHUMADOS

1. NUNCA 2. ALGUNAS VECES
3. SIEMPRE

H.4.2 FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS AHUMADOS Y SALADOS

1. NUNCA 2. ALGUNAS VECES
3. SIEMPRE

I. FRECUENCIA DEL CONSUMO DE ALIMENTOS

ALIMENTO	NUNCA	DIARIO	1-2 VECES/SEM	1-2 VECES/MES	1-6 VECES/AÑO
PROTEÍNAS					
Res					
Pollo					
Cerdo					
Pescado					
Mariscos					
Huevos					
Leche Pasteurizada					
Leche No Pasteurizada (Carro)					
Queso Campesino					
Carne Ahumada					
Enlatados					
Embutidos					
CEREALES					
Arroz					
Maíz					
Avena					
Cebada					
Pastas					
Harina De Trigo					
Pan					
Vegetales y Verduras					
Legumbres (Granos)					
Tubérculos					
FRUTAS					
Frutas Cítricas (naranja, maracuyá, guayaba)					
Frutas No Cítricas (aguacate, banano, kiwi)					
Frutos Del Bosque (mora, fresa, uvas)					
Frutos Secos (almendras, nueces, pasas)					
GRASAS					
Manteca Animal					
Manteca Vegetal					
Margarina (Vegetal)					
Mantequilla (Animal)					
Aceite Vegetal					
CONDIMENTOS					
Ají					
Pimienta Negra					
Pimentón					
Azafrán O Achote					
Hierbas Aromáticas					
Condimento En Cubo					