

**“IDENTIFICACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO PRODUCIDO POR EXPOSICIÓN
A CARCINÓGENOS DEL HUMO DE BIOMASA EN UNA POBLACIÓN DE
MUJERES DE ZONAS RURALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA,
MEDIANTE EL ENSAYO CITÓMICO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE
SANGRE PERIFÉRICA”**

JOVANNA VANESSA RAMOS ANGULO

DIANA MILENA CALAPSÚ CALDÓN

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA FACULTAD DE
CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2015**

**“IDENTIFICACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO PRODUCIDO POR EXPOSICIÓN
A CARCINÓGENOS DEL HUMO DE BIOMASA EN UNA POBLACIÓN DE
MUJERES DE ZONAS RURALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA,
MEDIANTE EL ENSAYO CITÓMICO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE
SANGRE PERIFÉRICA”**

JOVANNA VANESSA RAMOS ANGULO

DIANA MILENA CALAPSÚ CALDÓN

Trabajo de grado para optar por el título de Bióloga

Director

NOHELIA CAJAS SALAZAR PhD.

Asesor

SILVIO MARINO CARVAJAL VARONA Mg.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA FACULTAD DE
CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2015**

Nota de Aceptación

Director _____

Nohelia Cajas Salazar Ph.D.

Jurado _____

Diana Milena Solarte Mg.

Jurado _____

Rosa Dueñas Ph.D.

Fecha de sustentación: Popayán, 9 de noviembre del 2015.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la sabiduría y la inteligencia para culminar esta etapa de nuestra vida.

A las familias, por su amor y apoyo incondicional a lo largo de este proceso.

A las mujeres que participaron en este proyecto de investigación, quienes voluntariamente nos brindaron su ayuda y generosidad.

A Elsa Betty Velazco, por sus enseñanzas amor y cariño para guiarnos en el desarrollo de nuestro proyecto de investigación.

A Jhon Carlos Meléndez e Ingrid Reyes, por su colaboración cariño e interés durante nuestra formación académica.

A nuestra directora la Dra. Nohelia Cajas Salazar, por dirigir nuestro trabajo de grado, sus importantes aportes, dedicación y apoyo en el fortalecimiento de nuestra formación académica y por su gran calidad humana.

A la Dra. Luz Stella Hoyos, por su gran cariño, apoyo, por su calidez como docente, sus valiosas críticas enseñanzas, su colaboración, paciencia por escucharnos y aconsejarnos.

A nuestro asesor Mg Silvio Marino Carvajal Varona, por ser un gran educador, dispuesto a colaborarnos en cualquier momento y por darnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica.

A los jóvenes investigadores del grupo de Investigación de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por brindarnos su colaboración, apoyo y cariño durante el desarrollo de nuestro proyecto de investigación.

A la Universidad del Cauca y todos los profesores que nos formaron no solo académica y científicamente sino que nos formaron de manera integral para asumir los crecientes desafíos de nuestra vida.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	19
3.1 BIOMASA, COMPONENTES Y MECANISMO DE TOXICIDAD.	19
3.2 GENOTOXICIDAD.....	20
3.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD	20
3.4 ENSAYO CITÓMICO DE MICRONÚCLEOS	21
4. ANTECEDENTES.....	23
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 OBJETIVO GENERAL	26
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
6. MARCO METODOLÓGICO	27
6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	27
6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	27
6.3 COLECCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.....	28
6.4 ENSAYO CITÓMICO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS.....	28
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
6.6 SOCIALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	31
7.2 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	32
7.3 FRECUENCIA DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE BIOMASA Y UN GRUPO REFERENTE.....	36
7.4 EFECTO DE VARIABLES DEMOGRÁFICAS, SALUD Y HáBITOS DE VIDA SOBRE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD.....	37
7.5 EFECTO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE EXPOSICIÓN EN LA FRECUENCIA DE LOS BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD.....	39
7.6 REGISTRO FOTORÁFICO.....	41

8. DISCUSIÓN.....	44
9. CONCLUSIONES	51
10. RECOMENDACIONES.....	52
11. BIBLIOGRAFÍA	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de registro de anomalías nucleares en células binucleadas.	29
Tabla 2. Características sociodemográficas de la población de estudio.	32
Tabla 3. Hábitos de vida de la población objeto de estudio.	33
Tabla 4. Caracterización del estado de salud de la población objeto de estudio.	34
Tabla 5. Características de exposición de la población objeto de estudio	35
Tabla 6. Frecuencia de biomarcadores de genotoxicidad en mujeres expuestas al humo de biomasa y un grupo referente.	37
Tabla 7. Efecto de variables demográficas, salud y hábitos de vida sobre biomarcadores de genotoxicidad.	38
Tabla 8. Efecto de las características de exposición sobre biomarcadores de genotoxicidad.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación de Mn y anomalías nucleares por acción de un agente genotóxico.	22
Figura 2. Panorámica de células binucleadas de linfocitos generadas por bloqueo de la citocinesis con Citocalasina-B, 40X.	41
Figura 3. Células binucleadas con micronúcleos (Mn).	41
Figura 4. Células binucleadas con micronúcleos (Mn), 100X.	42
Figura 5. Células binucleadas con puentes nucleoplásmicos (NPBs), 100X.	42
Figura 6. Célula binucleada con brote nuclear (NBUDs) ligado a uno de los núcleos principales con puente nucleoplásmico, 100X.	42
Figura 7. Charla educativa “Cambia la energía a tu vida, uso de energías renovables y hábitos de vida saludables” y socialización de resultados.	43
Figura 8. Formato de la encuesta en la plataforma virtual de libre acceso Limesurvey.	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado

Anexo 2. Tabla de registro de micronúcleos y anomalías nucleares.

RESUMEN

La combustión de biomasa como generador de calor y energía doméstica se ha convertido en uno de los principales factores de riesgo para la salud humana a nivel mundial. La combustión ineficiente de biomasa emite grandes cantidades de material particulado y gases tóxicos, que generan daño celular a través de alteraciones en la estructura del material genético. En consecuencia son afectados diferentes órganos como pulmones, bronquios y cavidad oral, en personas expuestas.

La prueba citómica de Micronúcleos (Mn), permite evaluar el efecto genotóxico de factores físicos, químicos o biológicos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la inestabilidad cromosómica y anomalías nucleares (puentes nucleoplásmicos (NPBs) y yemas nucleares (NBUDs)), en linfocitos de sangre periférica en un grupo de 80 mujeres expuestas al humo de combustión de biomasa y un grupo de 80 mujeres no expuestas (grupo referente), pertenecientes a zonas rurales del Departamento del Cauca, mediante el ensayo citómico de micronúcleos. Además, se evaluó la correlación entre la frecuencia de los biomarcadores analizados con las variables demográficas, de exposición y de estilo de vida.

Las muestras obtenidas fueron procesadas en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, de acuerdo al protocolo modificado de Fenech, 2007; la frecuencia de los biomarcadores fue registrada en 2000 células por individuo y reportadas en 1000 células. Los resultados obtenidos demostraron un aumento significativo de la frecuencia de Mn ($2,44 \pm 0,11$), NPBs ($0,60 \pm 0,09$) y NBUDs ($1,08 \pm 0,12$), en el grupo de mujeres expuestas al humo de biomasa con respecto a la frecuencia de Mn ($0,59 \pm 0,06$), NPBs ($0,16 \pm 0,40$) y NBUDs ($0,39 \pm 0,06$) reportados para el grupo referente ($p < 0,001$); la frecuencia

basal reportada para Mn en poblaciones humanas tiene un rango de 0.477 a 0,684, $p < 0.0001$), (Fenech, 1998). El aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en linfocitos de sangre periférica en el grupo expuesto, sugirió la ocurrencia de daños clastogénicos y/o aneugénicos atribuido a la exposición del humo de combustión de biomasa, los cuales al ser metabolizados generan especies reactivas de oxígeno (EROs) aumentando el estrés oxidativo y las lesiones al ADN.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire intradomiciliario es un factor de riesgo importante para la salud humana, convirtiéndose en la segunda causa de muerte a nivel mundial, seguido de la contaminación por aguas no tratadas (Kim & Kabir, 2011). El 50% de la población mundial y aproximadamente el 90% de la población rural en países en desarrollo, usan biomasa como fuente de energía (OMS, 2007). La combustión incompleta de biomasa genera emisiones de humo que contienen variedad de compuestos tóxicos con potencial mutagénico y carcinogénico como material particulado (MP), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NO), formaldehído, acroleína, benceno, tolueno, estireno, 1,3 - butadieno e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), como benzo(a) pireno (Zhang & Smith, 1995).

Estudios demuestran que la exposición crónica al humo de biomasa produce genotoxicidad en células directamente expuestas de las vías respiratorias, pulmones y cavidad oral (Mondal et al., 2010). Además está relacionada con enfermedades como el cáncer nasofaríngeo, laríngeo (Clifford, 1972), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Kleinerman et al., 2000), bronquitis (Perez-Padilla et al., 2001) entre otras.

Existe suficiente evidencia de los efectos nocivos de la combustión de biomasa en la salud humana a nivel mundial, sin embargo, existen pocos estudios sobre los mecanismos de toxicidad incluyendo el daño al material genético, la influencia de variables demográficas, de exposición, de estilo de vida y de condiciones socioeconómicas que permitan establecer cuál de estas variables incrementan el riesgo a desarrollar problemas de salud a largo plazo. Por tanto, el biomonitoreo de poblaciones humanas expuestas a factores de riesgo ambiental como el humo de biomasa, es una herramienta importante para evaluar la inestabilidad

cromosómica y anomalías nucleares causadas por la exposición a través de indicadores de daño citotóxico y genotóxico validados por la comunidad científica.

El presente estudio evaluó el efecto genotóxico (micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y yemas nucleares) generado por la exposición crónica al humo de biomasa en linfocitos de sangre periférica de 80 mujeres expuestas y 80 mujeres no expuestas (grupo referente), pertenecientes a zonas rurales del Departamento del Cauca, mediante el ensayo citómico de micronúcleos (con bloqueo de la citocinesis con citocalasina-B (Cyt-B)). Los resultados sirvieron de evidencia científica a la comunidad expuesta para tomar medidas de promoción y prevención contra potenciales riesgos de salud relacionados con la exposición a contaminantes del humo de biomasa.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Más de tres mil millones de personas dependen de la biomasa como leña, estiércol, residuos agrícolas y el carbón para satisfacer sus necesidades básicas de energía (Rehfuess et al., 2006; OMS 2007). Los factores que influyen el uso de combustibles sólidos, están relacionados con la demografía, el clima local, el estilo de vida, la naturaleza, disponibilidad de la biomasa y las condiciones socio-económicas de la población (Quiroz-Carranza & Orellana, 2010).

La combustión de biomasa genera altas cantidades de gases y MP debido a que la infraestructura rudimentaria de hogueras y estufas, solo permiten aprovechar del 10 al 15% de su potencial energético, lo que aumenta la contaminación del aire al interior de los hogares (Pandey et al., 1989; Rehfuess et al., 2011). La mala ventilación de los ambientes dedicados a la cocción de alimentos tienden a aumentar la concentración de contaminantes en suspensión, exposiciones crónicas y/o agudas a estos componentes afectan el sistema respiratorio, las respuestas del sistema inmune, entre otros (Vargas et al., 2008; Mukherjee et al., 2011).

La polución intradomiciliaria es causa del 2,7% de la carga mundial de enfermedad, ocasionando 4 millones de muertes/año relacionadas con enfermedades atribuibles, a la contaminación generada por el uso de combustibles sólidos. Entre estas defunciones: 13% se deben a neumonía, 34% a accidentes cerebrovasculares (aproximadamente 1,4 millones de defunciones, la mitad de las cuales corresponden a mujeres), 25% a cardiopatía isquémica, 22% a neumopatía obstructiva crónica, y 6% cáncer de pulmón (Perez-Padilla et al., 2010; OMS 2014). El Banco Mundial estima que 400 millones de niños y 700 millones de mujeres, están expuestos a elevadas concentraciones de contaminantes de humo de biomasa debido al rol que desempeñan en el hogar (BM, 2006; Quiroz-Carranza & Orellana, 2010).

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, ha catalogado la exposición al humo de la combustión de biomasa, como probable carcinógeno para los seres humanos (Kim et al., 2011; Koo et al., 2011). Los gases generados por la combustión de biomasa producen irritación de las vías respiratorias (Rinne et al., 2006), alergias y alteraciones en la función pulmonar (Viegi et al., 2004). Además fracciones tóxicas para los cilios de las células nasales y agentes coagulantes, comprometen las defensas del sistema respiratorio y aumentan el riesgo de infecciones pulmonares agudas y crónicas (Alfheim et al., 1984). Otros estudios han vinculado la exposición al humo de biomasa con asma (Mishra, 2003), tuberculosis (Diaz et al., 2006), bajo peso de neonatos, rinitis (Perez-Padilla et al., 2010) y cáncer nasofaríngeo, laríngeo y pulmonar (Pintos et al., 1998; Kleinerman et al., 2000).

Los pocos estudios realizados a nivel mundial han evaluado el potencial mutagénico del humo de biomasa a través de biomarcadores como Mn y Alteraciones Cromosómicas (AC), además de ensayos *in vitro* e *in vivo* en sistemas bacteriales y linfocitos, indicando un aumento en la frecuencia de alteraciones citogenéticas en poblaciones expuestas (de Oliveira Alves et al., 2011; Hytönen et al., 1983). No obstante, son pocos los estudios que aportan información sobre los mecanismos de toxicidad a nivel celular y del ADN como la mala segregación de los cromosomas, la amplificación de genes y la disfunción telomérica, asociados con variables demográficas y de exposición que incrementan los riesgos de salud de comunidades expuestas (Mondal et al., 2010; Mukherjee et al., 2011; Musthapa et al., 2004).

Los estudios realizados (datos no publicados) en poblaciones rurales del Departamento del Cauca, para determinar el daño al material genético usando biomarcadores genotóxicos como Mn y AC, muestran un incremento en la frecuencia de estos biomarcadores en células del epitelio bucal y en linfocitos de sangre periférica, respecto a un grupo no expuesto (Perafán & Rosero, 2013;

Bravo & León, 2008). Sin embargo, no hay estudios que utilicen biomarcadores de genotoxicidad como yemas nucleares (NBUDs) y puentes nucleoplásmicos (NPBs) que permitan identificar mecanismos de toxicidad, en poblaciones de mujeres expuestas al humo de biomasa de zonas rurales del Departamento del Cauca.

2. JUSTIFICACIÓN

La problemática de la contaminación del aire al interior de los hogares por el humo de biomasa, es de gran importancia en la actualidad debido a que se ha convertido en una de las 10 amenazas más importantes para la salud pública mundial, responsable del 5% de la tasa de mortalidad y morbilidad según datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (Kim et al., 2011; OMS, 2014). Por esta razón, está siendo ampliamente estudiada por el grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. El presente estudio se encuentra en esta línea de investigación y su objetivo fue generar información, que permitió establecer prácticas saludables para minimizar el riesgo a padecer enfermedades relacionadas con la exposición al humo de biomasa las cuales a la comunidad estudiada.

Existen pocos estudios en la literatura científica, que incluyen como población vulnerable mujeres expuestas al humo de combustibles sólidos, ubicadas en zonas rurales, donde se evalúe el daño genotóxico causado por la exposición al humo de biomasa. La viabilidad de este estudio se sustentó en que la población evaluada fue de fácil acceso y se encontró en zonas rurales del Departamento del Cauca, donde el 60% de su población, habita en estas zonas y sus condiciones socioeconómicas promueven el uso de combustibles sólidos como fuente de energía (DANE, 2005). Además se generó evidencia científica sobre algunos mecanismos de toxicidad celular, causada por la exposición a humo de biomasa y de manera importante se estableció las posibles variables de exposición que modulan su toxicidad.

El aporte científico de este estudio sirvió para alertar a la comunidad expuesta, sobre el riesgo a desarrollar enfermedades asociadas a la exposición de contaminantes ambientales presentes en el humo de biomasa, como una estrategia para minimizar los riesgos de la exposición.

El ensayo citómico de micronúcleos con el bloqueo de la citocinesis en linfocitos de sangre periférica, se ha convertido en una prueba citogenética convencional ampliamente usada en la conducción de monitoreos biológicos, debido a su fiabilidad y buena reproducibilidad. En este estudio se evaluó el biomarcador de Mn, el cual es un indicador de daño clastogénico (alteración estructural de los cromosomas) y aneugénico (alteración en el número de cromosomas), validado como predictor del riesgo a cáncer en poblaciones expuestas a diferentes contaminantes ambientales, así como otros indicadores de alteraciones cromosómicas como rearrreglos y amplificaciones génicas (Bonassi et al., 2011). El sistema biológico utilizado fue linfocitos de sangre periférica que al ser células centinela, detenidos en un estado del ciclo celular (G0) y presentar un promedio de vida de meses o incluso años, acumulan el daño producido por exposición a agentes tóxicos (Au et al., 1991; Bloom & Paul, 1981).

Uno de los intereses de esta investigación radicó en nuestra formación investigativa como proponentes del proyecto en el programa de Semilleros de Investigación de Colciencias, capacitándonos en las metodologías de trabajo con poblaciones humanas y en el desarrollo del ensayo citómico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica, con el fin de dirigir proyectos orientados hacia la promoción y prevención de enfermedades producidas por la exposición crónica a contaminantes del humo de biomasa. Esta propuesta de investigación fue de gran relevancia pues diseñó estrategias de divulgación a las comunidades objeto de estudio a través de charlas a la comunidad sobre los riesgos de salud causados por la exposición, y las diferentes alternativas que se pueden implementar para disminuir su impacto. Finalmente, se contribuyó junto a otros estudios ya realizados por el Grupo de Investigación de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, al fortalecimiento de las líneas de investigación en la conducción de monitoreos biológicos, que asocian la sensibilidad de los biomarcadores citogenéticos y los tejidos utilizados en la evaluación del riesgo de la exposición crónica al humo de la combustión de biomasa, con la influencia de

diferentes factores como la edad, estilo de vida, condiciones demográficas y etnicidad.

3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1 BIOMASA, COMPONENTES Y MECANISMO DE TOXICIDAD.

La biomasa es cualquier producto de naturaleza biológica, comúnmente utilizada como combustible domiciliario y de bajo costo (Torres-Duque et al., 2008). Dentro de la biomasa utilizada para satisfacer las necesidades básicas de energía, se encuentra la madera, residuos agrícolas y estiércol de animales, siendo la madera y el carbón vegetal los más utilizados (Salvi & Barnes, 2009). Las emisiones se caracterizan por tener una composición y distribución de tamaño multielemental (Hacon et al., 1995; de Oliveira Alves et al., 2011), que incluye compuestos orgánicos y gases como el CO, óxidos de azufre (SO), (Au et al., 1991; Bloom & Paul, 1981), NO, aldehídos, HAP, compuestos orgánicos volátiles (COV), dioxinas cloradas, radicales libres y MP (Albalak et al., 2001; Mishra, 2003). El MP, tiene la capacidad de absorber compuestos mutagénicos presentes en el medio ambiente, aumentando la toxicidad de sus compuestos. Dentro de las partículas presentes en el MP se denominan “respirables” a las de un diámetro menor a 10 μm ($\text{MP}<10$) por su capacidad de introducirse en las vías respiratorias. Las partículas finas cuyo diámetro aerodinámico es $\leq 2,5 \mu\text{m}$ alcanzan fácilmente los bronquiólos terminales y los alvéolos, donde pueden ser fagocitadas por los macrófagos alveolares y atravesar la barrera alvéolo-capilar para ser transportadas por circulación sanguínea y vías linfáticas hacia distintos tejidos, donde quedan atrapados causando variedad de enfermedades (Bruce, 2002; Erdinger et al., 2005; Oyarzún, 2010). Recientemente se han descrito las partículas “ultrafinas” cuyo diámetro es aún menor ($\leq 0,1 \mu\text{m}$) y pueden pasar directamente desde los alvéolos al torrente sanguíneo (Morales R et al., 2006).

El humo de biomasa genera radicales libres y ROS capaces de causar daño al ADN, activa los factores de transcripción nuclear, NFkappaB e incrementa la

liberación de TNF-alpha. Todos estos eventos conllevan a la interrupción de la homeostasis celular y como consecuencia, efectos en la salud de los individuos expuestos.

3.2 GENOTOXICIDAD

Los compuestos químicos son clasificados en directos o indirectos. Los compuestos directos al entrar al organismo no requieren activación metabólica por parte de los sistemas enzimáticos, debido a que al ser electrofílicos, tienen la capacidad de interactuar directamente con el ADN, a diferencia de los compuestos indirectos que si requieren una activación metabólica para causar diferentes lesiones primarias al ADN, como aductos, sitios abásicos, quiebres de cadena sencilla y doble. Estas lesiones pueden ser corregidas por compuestos enzimáticos de reparación celular, los cuales destruyen y restauran el segmento dañado del ADN. La mala reparación o no reparación de estas lesiones, después de un ciclo de división celular produce mutaciones, lo que se evidencia en el ensayo citómico como Mn, NPBs y/o NBDs (Iarmarcovai et al., 2008; Bornholdt et al., 2002; Kirsch-Volders et al., 2014). La acumulación de estas anomalías es una de las principales causas de inestabilidad genómica, que conduce al desarrollo de cáncer. Este proceso consiste en eventos de proliferación celular excesiva y la capacidad de las células para colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos.

3.3 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD

El biomonitoreo de poblaciones expuestas a sustancias químicas es útil para evaluar los efectos y la susceptibilidad de los individuos a factores ambientales y de tipo ocupacional (Manno et al., 2010). Para evaluar el efecto genotóxico de sustancias tóxicas se pueden emplear diferentes biomarcadores según su significancia toxicológica.

Los biomarcadores son definidos como alteraciones o cambios a nivel estructural, bioquímico, fisiológico o morfológico que se pueden medir en sistemas o muestras biológicas. Los biomarcadores han sido clasificados como biomarcadores de exposición, susceptibilidad y efecto. Los biomarcadores de exposición (ICH y el ensayo cometa) permiten establecer si un individuo está expuesto a agentes tóxicos y la magnitud de esta exposición. Los biomarcadores de susceptibilidad como los polimorfismos, permiten evaluar la sensibilidad individual a daños en el ADN provocados por agentes endógenos o exógenos. Los biomarcadores de efecto (AC y Mn), reflejan alteraciones en un organismo de tipo fisiológico o bioquímico que permiten medir y predecir los posibles problemas de salud que se presentan en personas expuestas a agentes genotóxicos (Au et al., 1991; Manno et al., 2010).

Los biomarcadores AC y Mn en linfocitos de sangre periférica, son los únicos biomarcadores citogenéticos validados de riesgo a cáncer que permiten identificar tanto agentes clastogénicos que causan la rotura de los cromosomas, como aneugénicos que afectan el huso mitótico (Heddle et al., 1991; Schmid, 1975). Los Mn se forman durante la anafase. Estos son cuerpos de cromatina, con un diámetro que oscila entre 1/3 y 1/16 en relación al núcleo principal, que quedan rezagados en el citoplasma de las células hijas, convirtiéndose en uno o varios núcleos secundarios (Schmid, 1975; Holland et al., 2008).

3.4 ENSAYO CITÓMICO DE MICRONÚCLEOS

El ensayo citómico de micronúcleos con bloqueo en la citocinesis, inducido con Cyt-B (M Fenech, 2000), consiste en el análisis citogenético de eventos de citotoxicidad (necrosis y apoptosis), número de ciclos de división celular (mononucleadas, binucleadas, multinucleadas) y eventos de genotoxicidad (Mn, NPBs y NBUDs) como lo indica la fig.1 (M Fenech, 2006). El bloqueo con Cyt-B permite limitar el registro específicamente de las células que han pasado por un

ciclo de división celular, reconociéndose como células binucleadas, este aspecto representa una gran ventaja debido a que impide que las anomalías nucleares sean eliminadas en la división citoplasmática.

Los NPBs, se originan cuando los centrómeros de cromosomas dicéntricos (resultantes de la mala reparación de rupturas del ADN o fusiones finales de los telómeros) se van hacia los polos opuestos de la célula durante la anafase, generando puentes antes de que se forme la membrana nuclear. Estos puentes se pueden romper para formar Mn.

Las NBUDs, son producto de la amplificación excesiva del material genético, los cuales se caracterizan por tener la morfología de un Mn que la célula trata de expulsar, por tanto se encuentran conectadas por un puente corto y su diámetro puede variar de 1/3 y 1/16 del núcleo principal (Bolognesi et al., 2013).

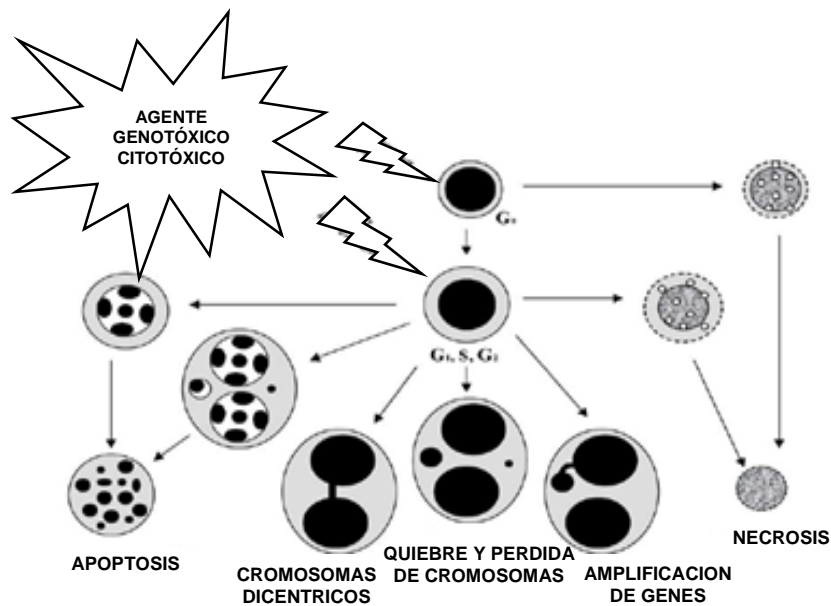


Fig. 1 Formación de Mn y anomalías nucleares por acción de un agente genotóxico. El uso de estos biomarcadores dentro del ensayo citotóxico permite medir la frecuencia de rotura de cromosomas (Mn), la pérdida del cromosoma (Mn), reordenamiento cromosómico, por ejemplo cromosomas dicéntricos (NPBs), amplificación de genes (NBUDs), necrosis y apoptosis. Modificado de Fenech, 2006.

4. ANTECEDENTES

Tanto en países en vía de desarrollo como industrializados, la mala calidad del aire intradomiciliario, junto a otras características demográficas y de exposición como el clima, la ubicación geográfica, la infraestructura y ventilación de las cocinas, el tiempo de exposición, aumentan el riesgo a padecer infecciones respiratorias, enfermedades cardiovasculares (Oyarzún, 2010), cardiopulmonares (Pope et al., 2002), apoplejía, cataratas, ceguera, tuberculosis, asma, problemas de vejiga, artritis entre otras (Zhang & Smith, 1995; Smith et al., 2000). Además se ha encontrado que el uso de leña, carbón o cualquiera de sus derivados, predispone a contraer cáncer de pulmón (Kleinerman et al., 2000) y de cuello uterino (Velema et al., 2002). En un meta-análisis se encontró una fuerte asociación de tres patologías respiratorias como las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior en niños menores de 5 años (RR = 2,3; IC 1,9-2,7), EPOC (RR = 3,2; IC 2,3-4,8) y cáncer de pulmón (RR = 1,9; IC 1,1-3,5), relacionada con la exposición al humo de biomasa (Smith et al., 2004).

Los estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar el potencial tóxico del humo de biomasa muestran que en ensayos realizados con *Salmonella*, los extractos del humo fueron mutagénicos demostrando que la concentración de HAP tiene importancia en su actividad tóxica (Hytönen et al., 1983). Igualmente se ha comprobado que la exposición crónica al humo de biomasa en ratas y ratones induce el desarrollo de cáncer generalmente clasificado como adenocarcinoma (Cupitt et al., 1994).

Resultados de un estudio realizado en Brasil sobre la genotoxicidad y la composición del MP, demostró el potencial mutagénico y/o carcinogénico de los HAP, que hacen parte de las emisiones de gases liberados de la combustión de biomasa (de Oliveira Alves et al., 2011). Un mayor tiempo de exposición al MP, está asociado al aumento de la frecuencia de Mn en las células epiteliales bucales de niños (Sisenando et al., 2012). Estudios que evalúan la citotoxicidad en

poblaciones humanas *in vitro*, demostraron que la exposición al humo de biomasa, genera un aumento en la frecuencia de Mn, AC, daño oxidativo del ADN, cambio en la expresión de genes y aumento de roturas de la cadena de ADN en mujeres. (Musthapa et al., 2004; Pandey et al., 2005; Mondal et al., 2010). La inhalación crónica del humo de biomasa provoca estrés oxidativo y daño al ADN en diversos tipos de células, independientemente de que se encuentren o no en la ruta directa de la exposición al humo (Danielsen et al., 2008; Herrera-Portugal et al., 2009). Además un estudio en mujeres expuestas al humo de biomasa en Turquía, demostró un aumento significativo ($p < 0,05$) en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) (Sungu, 2001).

Un estudio que empleó la prueba de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV), concluyó que mujeres de la india expuestas crónicamente al humo de biomasa, presentaban un incremento significativo en los niveles de metabolitos del benceno como el ácido t,t-Mucónico (tt -MA) en la orina, relacionado con la generación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS) y un 28% de agotamiento de la superóxido dismutasa (SOD), con respecto a mujeres que hacen uso de combustibles fósiles como el gas licuado de petróleo. Además, en este estudio se realizó el ensayo cometa que demostró una relación inversamente proporcional entre el agotamiento de la SOD y el porcentaje de ADN en la cola del cometa, que influyó en la inflamación de las vías respiratorias expuestas (Mukherjee et al., 2011).

En las dos últimas décadas en Colombia y en otros países en vía de desarrollo, se ha descrito que mujeres que han cocinado con leña en recintos cerrados por muchos años, han desarrollado enfermedades respiratorias como EPOC (González et al., 2004). Además, existen registros sobre la disminución de la capacidad del feto para obtener nutrientes durante la concepción (Vinaccia & Quiceno, 2011; Naeher et al., 2007; Glinianaia et al., 2004; Maisonet et al., 2004; Bobak et al., 2005).

Resultados obtenidos en la evaluación de poblaciones del Departamento del Cauca expuestas a humo de combustibles sólidos, demostró un efecto genotóxico, citotóxico y apoptótico ($p < 0,01$) evaluados a través de diferentes biomarcadores del ensayo citómico sobre las células del epitelio nasal y bucal en mujeres del grupo expuesto con respecto al referente. Además, reporta que variables de exposición como las características de la infraestructura de las cocinas, la dieta y el tiempo de exposición, modulan la toxicidad en células directamente expuestas ($p < 0,05$) (Ramírez & Ordóñez, 2014). Un estudio previo indicó que la edad y el tiempo de exposición influyen significativamente en el incremento de la frecuencia de AC, sugiriendo que las condiciones fisiológicas propias de la edad avanzada afectan la capacidad de reparación de los daños producidos por la exposición al humo de leña (Bravo & León, 2008). Niños expuestos a la contaminación intradomiciliaria, tienen una frecuencia más alta de Mn y células binucleadas, respecto a un grupo referente. Además, se demostró que variables como la etnia, ubicación de la cocina, limpieza de paredes, actividad física y dieta, afectan significativamente la frecuencia de los biomarcadores de daño en el ADN y muerte celular (Perafán & Rosero, 2013).

La variabilidad observada en las frecuencias de los biomarcadores analizados resalta la necesidad de estudiar las variables de exposición y de susceptibilidad genética que podrían modular la toxicidad al humo de leña en la población humana.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el daño genotóxico producido por la exposición crónica al humo de biomasa en una población de mujeres expuestas, mediante el ensayo citómico de micronúcleos y anomalías nucleares (yemas nucleares y puentes nucleoplásmicos), en linfocitos de sangre periférica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.2.1.** Determinar la inestabilidad cromosómica y anomalías nucleares, producida por exposición crónica al humo de combustión de biomasa, mediante el biomarcador de micronúcleos con bloqueo de citocinesis en un grupo de mujeres expuestas y un grupo referente.
- 5.2.2.** Determinar la influencia de variables demográficas y de exposición en la genotoxicidad producida por el humo de biomasa correlacionándolas con la frecuencia de los biomarcadores analizados.
- 5.2.3.** Socializar los resultados sobre los efectos tóxicos de la exposición al humo de biomasa por medio de charlas educativas a la comunidad objeto de estudio.

6. MARCO METODOLÓGICO

Se realizó un monitoreo genético, epidemiológico molecular, descriptivo y observacional de tipo corte transversal no aleatorio, en una población expuesta crónicamente al humo de biomasa, mediante el ensayo citómico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica, empleando biomarcadores de genotoxicidad como Mn, NPBs, NBUDs.

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se escogió un grupo de 160 mujeres habitantes de zonas rurales del Departamento del Cauca, pertenecientes a los municipios de Popayán, Timbío, El Tambo y Santander de Quilichao, con edad entre los 18 y 72 años, de las cuales 80 conformaron el grupo de mujeres expuestas a humo de biomasa y 80 mujeres hicieron parte del grupo referente quienes cocinaban con gas. Luego de conocer la información sobre los objetivos, metodologías, ventajas y riesgos de participar en el estudio, cada participante seleccionado diligenció una encuesta electrónica con información sobre la demografía, estilo de vida, variables de exposición, historial de enfermedades crónicas como el cáncer y consumo de alcohol, con el fin de aplicar los criterios de inclusión y exclusión de este estudio. Según la información arrojada por las encuestas, se emparejó cada individuo del grupo expuesto con uno del grupo referente, con una diferencia de edad de ± 3 años y un estilo de vida similar, lo que disminuyó el sesgo durante el análisis estadístico. Antes de donar la muestra de sangre cada individuo firmó el consentimiento informado. El Comité de Ética de la Universidad del Cauca, aprobó el protocolo de este estudio.

6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

Los individuos que se incluyeron en este estudio fueron mujeres ubicadas en zonas rurales, con condiciones demográficas semejantes. Criterios de inclusión: mujeres entre los 18 y 72 años de edad que tuvieron un tiempo de exposición

mínimo de 10 años al humo de biomasa. Criterios de exclusión: que usaran mezcla de combustibles (biomasa y gas), fumadoras, expuestas a radiaciones, productos químicos o cigarrillo, tener antecedentes clínicos de malignidad y malformaciones genéticas.

6.3 COLECCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.

Personal calificado, extrajo 5 ml de sangre por punción intravenosa en vacutainer heparinizados teniendo en cuenta las normas de bioseguridad propias del procedimiento. Los tubos fueron marcados y rotulados con un código, que mantendría la confidencialidad de las personas participantes. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en neveras de icopor hasta el procesamiento en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca.

6.4 ENSAYO CITÓMICO DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS

Se realizó el ensayo citómico de micronúcleos utilizando la técnica de bloqueo de la citocinesis con Cyt-B, (M Fenech, 2006). Los cultivos se establecieron con sangre entera por duplicado. Se añadió 0.5 ml de sangre entera heparinizada a 4,5 ml de medio RPMI 1640, suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de antibiótico, 10% de suero bovino fetal y se agregó 2% de fitohemaglutinina a cada cultivo. Los cultivos fueron incubados a 37°C en oscuridad, a las 44h de incubación se adicionó 0.2 ml de Cyt- B a una concentración de 6µg/ml. La cosecha de las células se realizó a las 72 h de la siguiente manera: se centrifugó cada cultivo a 1000 rpm durante 8 minutos, se removió el sobrenadante y se resuspendieron las células, se agregó a los cultivos 5ml de solución hipotónica de KCl al 0,075M por 2 minutos; luego se fijaron con 5 ml de Carnoy a -20°C (metanol/ácido acético, (3:1)), inmediatamente se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos, este procedimiento se repitió 3 veces más. Las células fijadas se dejaron

caer sobre portaobjetos previamente limpios y humidificados (M Fenech, 2007). Las placas se tiñeron con el método de tinción Giemsa al 10% durante 12 minutos y posteriormente se analizaron con microscopio óptico de luz. Las células binucleadas con anomalías nucleares como Mn, NPBs y NBUDs, se observaron en objetivo de 100X, de los mejores registros se tomaron fotografías. El conteo y registro de micronúcleos se efectuó en 2000 células binucleadas por individuo, pero la frecuencia se expresó en 1000 células, teniendo en cuenta los criterios de selección para su registro establecidos por el Proyecto Humn en 2003 y el documento publicado por Bolognesi y colaboradores en 2013 sobre el mejoramiento de la evaluación y registro del ensayo citómico en linfocitos de sangre periférica, tabla 1 (Bolognesi et al., 2013; Fenech et al., 2003).

TABLA 1. CRITERIOS DE REGISTRO DE ANOMALÍAS NUCLEARES EN CÉLULAS BINUCLEADAS.

CÉLULAS BINUCLEADAS	Mn	NPBs	NBUDs
1. Dos núcleos principales dentro de una sola célula.	1. Son de forma redonda u ovalada.	1. Son un vínculo nucleoplásmico entre los núcleos de una célula binucleada.	1. Son cuerpos nucleares que están conectados al núcleo principal.
2. Los núcleos son de tamaño similar e igual intensidad de la tinción.	2. El diámetro del Mn oscila entre 1/3 y 1/16 de los núcleos principales.	2. El diámetro del puente puede variar hasta un cuarto del diámetro nuclear.	2. Tienen la misma textura e intensidad de tinción que el núcleo principal.
3. Los núcleos pueden ser separados o en contacto entre sí.	3. Igual textura e intensidad de tinción que los núcleos principales.	3. Tener igual intensidad de tinción de los núcleos principales.	3. Su diámetro oscila entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se analizaron con el software de análisis estadístico SPSS versión 11.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL). La prueba de hipótesis que comparó los grupos con respecto a las variables cuantitativas, se analizó mediante la pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov), homogeneidad de varianza (Levene) e independencia de datos (rachas). En cuanto al daño genotóxico, se compararon los grupos y las variables cuantitativas utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y U-Mann–Whitney. Se identificó la relación de dependencia entre el factor de exposición y variables cualitativas usando la prueba de Chi-cuadrado. Se evaluó el efecto modulador de las variables sociodemográficas, estilo de vida, salud y exposición sobre los biomarcadores de daño genotóxico, mediante la prueba de correlación de Spearman. Se ajustó la frecuencia de MN para las variables exposición (sí, no), consumo de pescado (alto, bajo), etnia indígena (sí, no), consumo de alcohol (gr) por medio de regresión logística binaria. La significancia usada fue $\alpha \leq 0.05$ como criterio para rechazar la hipótesis nula (H_0), con un intervalo del 95% de confianza.

6.6 SOCIALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación mediante el análisis estadístico de la frecuencia de los biomarcadores de daño genotóxico, fueron expuestos de manera clara y concisa a la comunidad que participó voluntariamente en este estudio. Se les alertó sobre los riesgos de salud que genera una exposición prolongada al humo de biomasa y se propusieron diferentes estrategias, tales como la limpieza de paredes, el uso de tapabocas, la construcción de estufas eficientes e ingesta adecuada de alimentos, con el fin de mitigar los efectos adversos a la salud. Finalmente se le informó acerca del impacto ambiental que genera la deforestación y su influencia en la biodiversidad regional.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las mujeres objeto de estudio fueron residentes de las veredas de Santa Elena, Poblazón, Quilcacé y Cinco Días pertenecientes al municipio de Popayán, El Tambo, Timbío y Santander de Quilichao, del Departamento del Cauca. En la tabla 2, se describen las características sociodemográficas de las 80 mujeres expuestas y las 80 no expuestas a humo de biomasa que conformaron la población de estudio. La edad promedio del grupo referente fue de $40,94 \pm 14,36$ años y del grupo expuesto fue $40,51 \pm 14,20$ años. Se observó que el 100% de las mujeres referentes y expuestas tenían sobrepeso, con un índice de masa corporal (IMC) de $25,61 \pm 3,90$ Kg/cm² y $25,48 \pm 3,88$ Kg/cm² respectivamente. El tipo de combustible usado por las mujeres referentes fue el gas y de las mujeres expuestas fue biomasa exclusivamente. El 100% del grupo expuesto reside en zona rural y el 100% del grupo referente en zona urbana incluyendo las cabeceras municipales. El 100% de las mujeres en el grupo expuesto reportaron ingresos mensuales familiares, inferiores a un salario mínimo legal vigente (SMLV), mientras que la proporción en el grupo referente fue del 56,6%.

Tabla 2. Características demográficas y socioeconómicas de la población.

	Referentes n=80	Expuestos n=80	p
Edad en años (Media ± E.T)	40,94± 14,36	40,51± 14,20	0,85 ^b
Índice de masa corporal (Kg/cm ²); (Media ± E.T)	25,61 ± 3,90	25,48 ± 3,88	0,84 ^b
Etnia	n (%)	n (%)	
Indígena	25(31,3)	25(31,3)	
Negra	25(31,3)	25(31,3)	
Mestiza	30 (38,4)	30 (38,4)	1,00 ^a
Tipo de combustible para cocinar			
Leña	-	80 (100)	-
Gas	80 (100)	-	
Lugar de Vivienda			
Rural	-	80 (100)	-
Urbano	80 (100)	-	
Ingresos Mensuales			
Menos de un salario mínimo	45(56,2)	80 (100)	0,01 ^a
Más de un salario mínimo	35(43,8)	-	

n= Número de sujetos; E.T = Error típico; %, = Porcentaje

^a Prueba de Chi-Cuadrado;

^b Prueba de t-Student

7.2 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

En la tabla 3 se resumen los hábitos de vida de la población objeto de estudio. El 38,8% de las mujeres expuestas y el 47,5% de las mujeres referentes consumía alcohol al menos una vez por mes, sin embargo no presentaron diferencias significativas entre grupos. Las bebidas alcohólicas consumidas con mayor frecuencia fueron el aguardiente, ron y cerveza, las cuales se analizaron calculando la cantidad de gramos de alcohol que contenían y determinando la cantidad consumida por persona. Se encontró que la población expuesta tuvo una ingesta de alcohol en gramos significativamente más alta, cuando se comparó con el grupo referente ($p < 0,001$). El consumo de pescado mostró diferencias significativas entre el grupo expuesto y referente ($p > 0,001$), siendo mayor en referentes con un 25%. El 56,2% de mujeres expuestas y 47,5% referentes reportaron bajo consumo de verduras-vegetales, mientras que el 91,2% de mujeres referentes y expuestas tuvieron un consumo bajo de frutas, en lo anterior, no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar los grupos.

Tabla 3. Hábitos de vida de la población objeto de estudio.

	Referentes n (%)	Expuestos n (%)	p
Consumo de alcohol			
Nunca	25(31,2)	32(40)	
Ex bebedor (≥5años)	17 (21,3)	16 (20)	
Bebedor ocasional (1 vez al mes)	38 (47,5)	31 (38,8)	0,41 ^a
Bebedor habitual (diario)		1 (1,2)	
Bebidas alcohólicas (gr de alcohol)	Media ± DE	Media± DE	
Aguardiente	6,8 ± 1,6	24,9 ± 5,29	0,01 ^b
Ron	1,4 ± 0,5	8,8 ± 2,79	0,03 ^b
Cerveza	10,3 ± 4,28	21,1 ± 21,4	0,00 ^b
Dieta			
Consumo de pescado			
Alto (semanal, >150g)	20 (25)	7 (8,8)	0,00 ^a
Bajo (mensual, <150g)	60 (75)	73 (91,2)	
Consumo de Verduras-Vegetales			
Alto (diario > 400g)	42 (52,5)	35 (43,8)	
Bajo (semanal, mensual, <400g)	38 (47,5)	44 (56,2)	0,33 ^a
Consumo de Frutas			
Alto (diario > 400g)	3 (8,8)	3 (8,8)	
Bajo (semanal, mensual, <400g)	77 (91,2)	77 (91,2)	1,00 ^a

a. Prueba de Chi-Cuadrado

b. Prueba de U-Mann Whitney

Las características del estado de salud de la población objeto de estudio se muestra en la tabla 4. Se reportó un incremento significativo de la frecuencia de síntomas de alteraciones en el sistema respiratorio (67,5%), síntomas de alteraciones oculares (63,8%) y síntomas de alteraciones neurológicas (57,5%) de mujeres expuestas comparado con la frecuencia de síntomas de alteraciones en el sistema respiratorio (13,8%), síntomas de alteraciones oculares (30%) y síntomas de alteraciones neurológicas (25%) del grupo referente ($p < 0,001$). Respecto a las enfermedades diagnosticadas, se encontró que el 35,1% del grupo expuesto padecía EPOC, neumonía, asma, enfermedades cardiovasculares y enfermedades oculares como ceguera, terigio y cataratas, mientras que solo el 6,25% del grupo referente padecía de enfermedades cardiovasculares.

Tabla 4. Caracterización del estado de salud de la población objeto de estudio.

	Referentes n =80	Expuestos n= 80	p
Síntomas de alteraciones en sistema respiratorio			
Si	11 (13,8)	54 (67,5)	0,00 ^a
No	69 (86,3)	26 (32,5)	
Síntomas de alteraciones Oculares			
Si	24 (30)	51 (63,8)	0,00 ^a
No	56 (70)	29 (36,2)	
Síntomas de alteraciones neurológicas			
Si	20 (25)	46 (57,5)	0,00 ^a
No	60 (75)	34 (42,5)	
Enfermedades diagnosticadas			
EPOC	-	2 (2,5)	
Neumonía	-	2 (2,5)	
Asma	-	3 (3,8)	
Ceguera, terigio, cataratas	-	10 (12,5)	
Cardiovasculares	5 (6,25)	11(13,8)	

n= Número de sujetos; E.T = Error típico; %, = Porcentaje

a. Prueba de Chi-Cuadrado;

b. Prueba de U-Mann Whitney

Las características de la exposición e infraestructura del hogar se muestran en la tabla 5. El 42,5% de las mujeres tenían la cocina ubicada al interior de la casa, de las cuales el 35,3% la tenían ubicada junto a la sala y el 64,7% junto a las habitaciones. El 57,5% restante tenían las cocinas ubicadas al exterior de sus viviendas a una distancia de $3,26 \pm 2,88$ metros. La media del índice de exposición fue de $40,70 \pm 30,13$ horas-año. El índice de exposición individual, se calculó multiplicando el número promedio de horas dedicadas a diario para cocinar, por el número de años que ha cocinado (Ekici et al., 2005). El tiempo medio de cocción de los alimentos fue $1,27 \pm 0,59$ horas-diarias, el tiempo de exposición fue de $31,85 \pm 14,60$ años y de $4,27 \pm 3,96$ horas-diarias. Para evaluar si la cantidad de humo al que estaban expuestas las mujeres es alta o baja, se estratificó la infraestructura del fogón y la ventilación de la cocina así: ventilación alta en la cocina (chimenea, más de dos ventanas) y baja (cerrada sin ventanas), y tipo de fogón abierto, semicerrado (construido en barro, cemento, ladrillos o aluminio con aberturas) y semicerrado con chimenea (construido en barro, cemento, ladrillos o

aluminio con aberturas y una chimenea). Según lo anterior, se estima que el 71,4% de las viviendas presentaba una alta acumulación de humo por tener una baja ventilación en sus cocinas y tener un fogón abierto, semicerrado y semicerrado con chimenea, mientras que el 28,7% de los hogares tenían una baja acumulación de humo debido una alta ventilación y un fogón semicerrado con chimenea en sus cocinas. Adicionalmente, el 65% de los hogares tuvieron prendido el fogón una vez al día por más de dos horas. El 43,8% de las mujeres limpiaban diariamente su fogón para descartar las cenizas y el hollín, y solo el 8,8% lo hicieron limpiando sus paredes a diario.

Tabla 5. Características de exposición de la población objeto de estudio.

	Expuestos n=80	
	n	(%)
Ubicación de la cocina en la casa		
Interior	34	(42,5)
Junto a la sala	12	(35,3)
Junto a las habitaciones	22	(64,7)
Exterior	46	(57,5)
Distancia de la cocina a la casa en metros (Media ± E.T)	3,26 ± 2,88	
Tiempo de exposición		
Años (Media ± E.T)	31,85 ± 14,60	
Horas (Media ± E.T)	4,27 ± 3,96	
Índice de exposición (horas-años), (Media ± E.T)	40,70 ± 30,13	
Índice de exposición (horas-años), categorizado		
1 – 22,75	20	25
22,76 – 35,5	20	25
35,6 – 48	22	27,5
Mayor a 48	18	22,5
Tiempo en horas-diarias, cocción de alimentos (Media ± E.T)	1,27 ± 0,59	
Tiempo en horas-diarias, cocción de alimentos		
Menor igual a 1,14	40	(50)
Mayor 1,14	40	(50)
Ventilación – Tipo de Fogón		
Ninguna - abierto	7	(8,8)
Baja – semicerrado	43	(53,8)
Baja – semicerrado con chimenea	7	(8,8)

Tabla 5. Continuación.

	Expuestos (n)	n=80 (%)
Alta – semicerrado con chimenea	23	(28,7)
Tiempo (h) – Veces de encendido el fogón		
Menor a 2 – menor a 2 veces	8	(10)
Menor a 2 – mayor a 2 veces	5	(6,3)
Mayor a 2 – menor a 2 veces	52	(65)
Mayor a 2 – mayor a 2 veces	15	(18,8)
Limpieza del fogón, n (%)		
Nunca	8	(10)
Diario	35	(43,8)
Dos veces semana	12	(15)
Semanal	17	(21,3)
Quincenal	8	(10)
Frecuencia de limpieza de paredes de la cocina		
Diario	7	(8,8)
Dos veces a la semana	11	(2,5)
Semanal	14	(17,5)
Quincenal	23	(28,7)
Nunca	25	(31,3)

n= Número de sujetos; E.T =Error típico; %, = Porcentaje

7.3 FRECUENCIA DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE BIOMASA Y UN GRUPO REFERENTE.

En la tabla 6, se describen las frecuencias de los biomarcadores de genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica del grupo expuesto y el grupo referente. La frecuencia de micronúcleos ($2,44 \pm 0,11$), puentes nucleoplásmicos ($0,60 \pm 0,09$) y yemas nucleares ($1,08 \pm 0,12$) en las mujeres expuestas fue significativamente más alta ($p < 0,001$), comparada con la frecuencia de micronúcleos ($0,59 \pm 0,06$), puentes nucleoplásmicos ($0,16 \pm 0,40$) y yemas nucleares ($0,39 \pm 0,06$) reportada para el grupo referente.

Tabla 6. Frecuencia de biomarcadores de genotoxicidad en mujeres expuestas al humo de biomasa y un grupo referente.

Biomarcadores	Referentes n=80	Expuestos n=80
Micronúcleos (1000 binucleadas/individuo)	0,59 ± 0,06	2,44 ± 0,11 ^a
Puentes nucleoplásmicos (500 binucleadas/individuo)	0,16 ± 0,40	0,60 ± 0,09 ^a
Yemas nucleares (500 binucleadas/individuo)	0,39 ± 0,06	1,08 ± 0,12 ^a

Resultados son expresados como Media ± Error típico

^a p<0,001, comparado con referentes, prueba estadística de Kruskal – Wallis

7.4 EFECTO DE VARIABLES DEMOGRÁFICAS, SALUD Y HáBITOS DE VIDA SOBRE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD.

La Tabla 7 muestra el efecto de las variables demográficas, salud y hábitos de vida, sobre los biomarcadores estudiados. La frecuencia de Mn fue modulada por la edad y tuvo un efecto significativamente mayor en el grupo expuesto comparado con el grupo referente (p<0,001). La prueba estadística de Kruskal-Wallis sugiere que edades entre 28-45 años aumentó la frecuencia de los PBNs (p<0,05) y para los NBUDs aumentó en edades menores a 27 años (p<0,05). La etnia afrodescendiente del grupo expuesto presentó una mayor frecuencia de Mn en comparación con la etnia indígena y mestiza (p<0,05).

En mujeres expuestas al humo de biomasa con síntomas de alteraciones neurológicas (dolor de cabeza, mareos), se incrementó significativamente la frecuencia de Mn, comparado con mujeres del mismo grupo que no padecían estos síntomas (p<0,05). Se observó un aumento de la frecuencia de Mn, NPBs y NBUDs en mujeres expuestas con bajo consumo de pescado y frutas, comparado con un alto consumo de estos alimentos en el mismo grupo, sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 7. Efecto de variables demográficas, salud y hábitos de vida sobre biomarcadores de genotoxicidad.

Variables	Referente (N=80)			Expuesto (N=80)				
	n	MN Media ± E.T	PNBs Media ± E.T	NBUDs Media ± E.T	n	MN Media ± E.T	NPBs Media ± E.T	NBUDs Media ± E.T
Edad								
<27	17	0,33 ± 0,13	0,20 ± 0,10	0,27 ± 0,12	17	2,12 ± 0,21*	0,82 ± 0,23	1,35 ± 0,28*
28 - 35	17	0,69 ± 0,15	0,06 ± 0,06	0,38 ± 0,12	17	2,82 ± 0,2*	0,65 ± 0,21*	0,94 ± 0,23
36 – 45	15	0,59 ± 0,12	0,12 ± 0,08	0,53 ± 0,15	15	2,53 ± 0,36*	0,73 ± 0,18*	1,00 ± 0,29
46 -55	19	0,63 ± 0,11	0,16 ± 0,09	0,32 ± 0,11	19	2,26 ± 0,12*	0,42 ± 0,14	1,06 ± 0,27
> 55	12	0,75 ± 0,18	0,33 ± 0,19	0,50 ± 0,15	12	2,50 ± 0,29*	0,33 ± 0,14	1,00 ± 0,30
Etnia								
Indígena	25	0,63 ± 0,12	0,04 ± 0,04	0,29 ± 0,09	25	2,36 ± 0,19*	0,92 ± 0,20*	1,08 ± 0,20*
Negra	25	0,56 ± 0,12	0,24 ± 0,10	0,40 ± 0,10	25	2,48 ± 0,22* ^b	0,44 ± 0,12	1,04 ± 0,23*
Mestiza	30	0,60 ± 0,09	0,20 ± 0,07	0,47 ± 0,10	30	2,47 ± 0,16*	0,47 ± 0,10*	1,10 ± 0,21*
Síntomas de alteraciones respiratorias								
Si	11	0,36 ± 0,15	0,36 ± 0,20	0,90 ± 0,09 ^b	37	2,47 ± 0,16 ^c	0,65 ± 0,13	1,16 ± 0,18 ^c
No	69	0,63 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,44 ± 0,06	43	2,41 ± 0,14	0,56 ± 0,11	1,00 ± 0,17
Síntomas de alteraciones neurológicas								
Si	20	0,60 ± 0,11	0,20 ± 0,12	0,20 ± 0,09	46	2,70 ± 0,13 ^{bc}	0,61 ± 0,12 ^c	1,16 ± 0,17 ^c
No	60	0,59 ± 0,07	0,15 ± 0,05	0,46 ± 0,07	34	2,09 ± 0,17	0,59 ± 0,12	0,97 ± 0,17
Dieta								
Consumo de Pescado								
Alto (diario, semanal)	20	0,53 ± 0,14	0,05 ± 0,05	0,37 ± 0,11	7	2,40 ± 0,11	0,43 ± 0,20	1,06 ± 0,12 ^a
Bajo (mensual)	60	0,62 ± 0,07	0,20 ± 0,05	0,40 ± 0,07	73	2,86 ± 0,34 ^a	0,62 ± 0,09 ^a	1,29 ± 0,56
Consumo de Vegetales - Verduras								
Alto (diario)	42	0,56 ± 0,09	0,20 ± 0,06	0,46 ± 0,09	35	2,43 ± 0,16	0,69 ± 0,15	1,14 ± 0,16
Bajo (semanal, mensual)	38	0,63 ± 0,09	0,13 ± 0,07	0,32 ± 0,08	45	2,43 ± 0,15	0,52 ± 0,10	1,02 ± 0,18
Consumo de frutas								
Alto	3	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3	2,00 ± 0,00	0,58 ± 0,08	1,00 ± 0,57
Bajo	77	0,58 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,40 ± 0,06	77	2,45 ± 0,11	1,00 ± 1,00	1,08 ± 0,12

N= número de sujetos; E. T= error típico; MN= Micronúcleos; NPBs = Puentes nucleoplásmicos; NBUDs= Yemas nucleares.

* p<0,001 Referente vs expuesto

a. p<0,05 Comparación referente alto vs expuesto bajo

b. p<0,05 Dentro del grupo para la variable de agrupación

c. Expuesto con síntomas de alteraciones respiratorias, neurológicas vs controles sanos

Prueba estadística U-Mann Whitney

7.5 EFECTO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE EXPOSICIÓN EN LA FRECUENCIA DE LOS BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD.

Las características de exposición que afectaron la frecuencia de Mn, NPBs y NBUDs se describen en la tabla 8. Las cocinas ubicadas al interior de la casa de mujeres expuestas incrementó la frecuencia de Mn ($2,52 \pm 0,14$) y NBUDs ($1,09 \pm 0,17$), en comparación con la frecuencia de Mn ($2,32 \pm 1,16$) y NBUDs ($1,07 \pm 0,18$), de mujeres del mismo grupo que tenían las cocinas al exterior del hogar, pero no se encontró una diferencia significativa. Igualmente, cuando la cocina estaba junto a las habitaciones, aumentó significativamente la frecuencia de NPBs ($0,64 \pm 0,16$) y NBUDs ($1,14 \pm 0,20$) a excepción de los Mn ($2,23 \pm 0,18$), comparado con las mujeres que tenían la cocina ubicada al lado de la sala donde la frecuencia de NPBs fue de $0,50 \pm 0,23$; de los NBUDs fue de $1,00 \pm 0,30$ y la frecuencia de Mn fue de $2,50 \pm 0,15$.

En el grupo expuesto, no se encontró una diferencia significativa en los biomarcadores de genotoxicidad evaluados, para las variables de ventilación-tipo de fogón y número de veces de encendido el fogón (horas-diarias) que fueron agrupadas bajo el criterio de mayor a menor acumulación de humo en la vivienda. Sin embargo, la frecuencia de estos biomarcadores aumentó en el grupo de usuarias de biomasa con respecto al grupo referente.

Tabla 8. Efecto de las características de exposición sobre biomarcadores de genotoxicidad.

Variables	n	MN Media ± E.T	PBNs Media ± E.T	NBUDs Media ± E.T
Individuos referentes	80	0,59 ± 0,06	0,16 ± 0,05	0,39 ± 0,06
Individuos expuestos	80			
Tiempo en horas, cocción de alimentos				
Menor o igual a 1,14	40	2,25 ± 1,00	0,58 ± 0,10	1,15 ± 0,17
Mayor a 1,14	40	2,62 ± 0,86*	0,62 ± 0,13*	1,16 ± 0,16*
Ubicación de la cocina en la casa				
Interior	34	2,52 ± 0,14*	0,59 ± 0,13*	1,09 ± 0,17*
Junto a la sala	12	2,50 ± 0,15*	0,50 ± 0,23	1,00 ± 0,30*
Junto a las habitaciones	22	2,23 ± 0,18*	0,64 ± 0,16 ^a	1,14 ± 0,20 ^a
Exterior	46	2,32 ± 1,16	7,61 ± 0,90	1,07 ± 0,18
Ventilación - Tipo de fogón				
Ninguna – Abierto	7	2,86 ± 0,34	0,71 ± 0,36	1,43 ± 0,61
Baja – Semicerrado	43	2,43 ± 0,20	0,63 ± 0,10	1,09 ± 0,16
Baja – Semicerrado con chimenea	7	2,43 ± 0,17	0,61 ± 0,18	1,00 ± 0,21
Alta – Semicerrado con chimenea	23	2,37 ± 0,16	0,29 ± 0,18	0,86 ± 0,34
Nº Veces – tiempo (horas-diarias) de encendido el fogón				
Menor a 2 – Menor a 2h	8	1,80 ± 0,49	0,40 ± 0,24	0,80 ± 0,58
Menor a 2 – Mayor a 2h	5	2,44 ± 1,14	0,56 ± 0,90	1,00 ± 0,23
Mayor a 2 – Menor a 2h	52	2,53 ± 0,19	0,63 ± 0,37	1,12 ± 0,16
Mayor a 2 – Mayor a 2h	15	2,63 ± 0,26	0,80 ± 0,22	1,13 ± 0,35

* p<0,001 Referente vs expuesto, U Mann-Withney

a. Diferencias significativas en el mismo grupo

7.6 REGISTRO FOTORÁFICO

El análisis citogenético de Mn y anomalías nucleares en las placas se realizaron bajo objetivo de 40X y 100X, teniendo en cuenta los mejores campos para el conteo y el registro fotográfico.

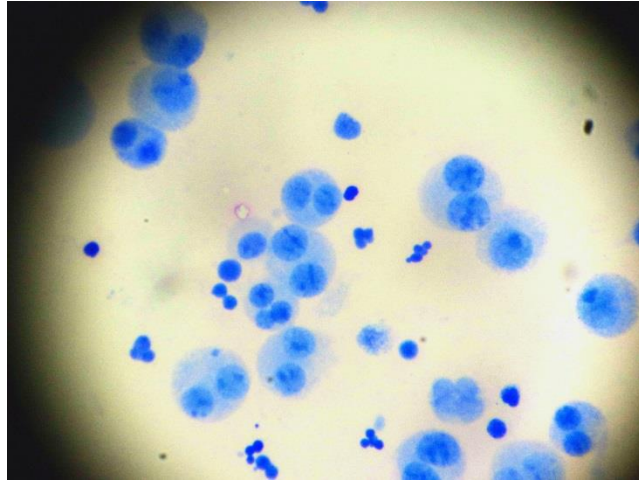


Figura 2. Panorámica de células binucleadas de linfocitos generadas por bloqueo de la citocinesis con Citocalasina-B, 40X.

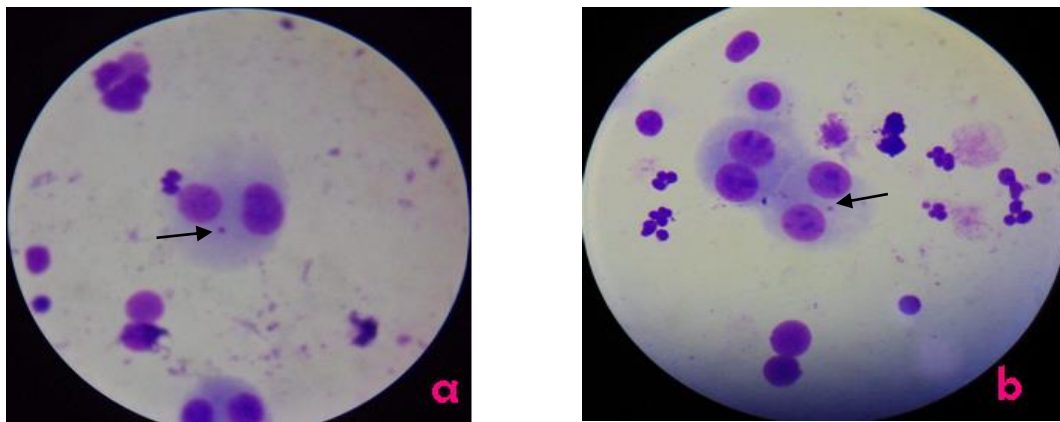


Figura 3. Células binucleadas con micronúcleos (Mn). **a).** Célula binucleada con un micronúcleos; tanto la célula como el micronúcleo cumple los criterios de selección definidos por el Comité Internacional de Micronúcleos Humanos. **b).** Células Binucleadas inducidas con Citocalasina B, con y sin micronúcleo. Vista en 40X

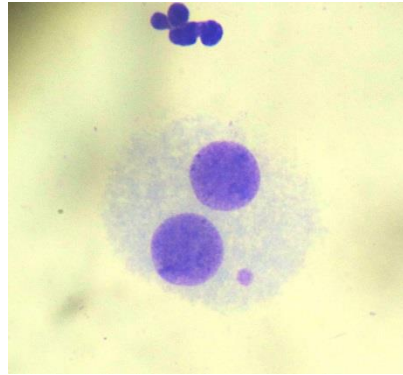


Figura 4. Células binucleadas con micronúcleos (Mn), 100X

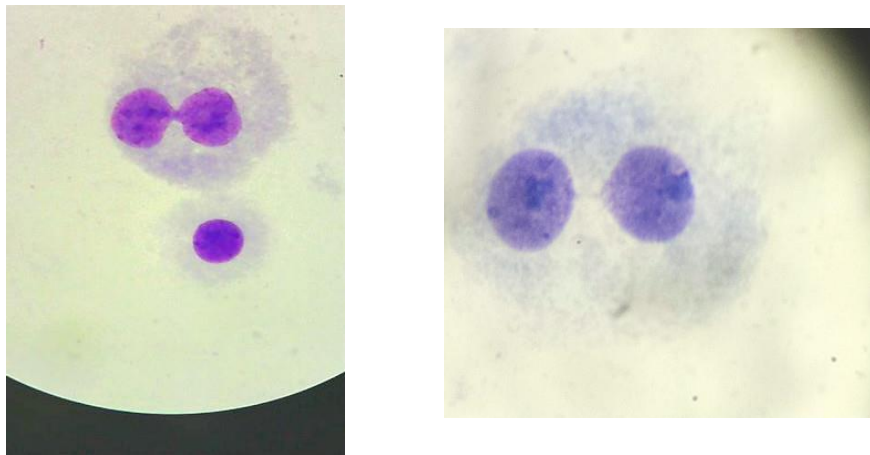


Figura 5. Células binucleadas con puentes nucleoplásmicos (NPBs), 100X.

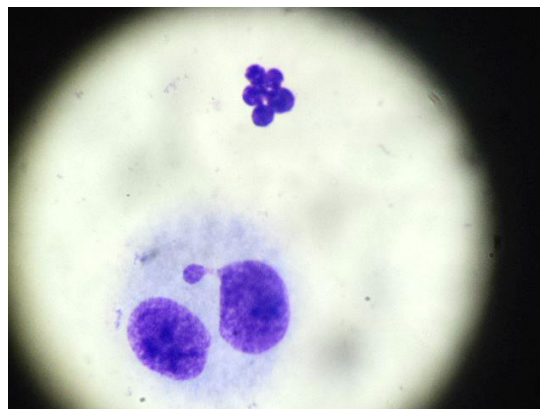


Figura 6. Célula binucleada con brote nuclear ligado a uno de los núcleos principales con un puente nucleoplásmico (NBUDs), 100X.



Figura 7. Charla educativa “Cambia la energía a tu vida, uso de energías renovables y hábitos de vida saludables” y socialización de resultados

EVALUACIÓN DE LA CITO x

localhost/limesurvey/index.php/survey/index/sid/497182/newtest/Y/lang/es

EVALUACIÓN DE LA CITOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD - HUMO DE BIOMASA - LINFOCITO DE SANGRE PERIFÉRICA - CÉLULAS EPITELIALES

Queremos Incentivar hábitos de vida saludables, optimización de infraestructura doméstica que permita menor acumulación contaminantes en el ambiente interior y en lo posible el uso de combustibles menos tóxicos.

BIENVENIDOS
Gracias por contestar a las siguientes preguntas de la encuesta
Hay 76 preguntas en esta encuesta.
Código y Fecha

FECHA

? Fecha de elaboración de la encuesta

CODIGO

? Código de la encuesta: E: Expuesto, C:Referente + el numero que corresponda: Ejemplo: E001 o C001

Figura 8. Formato de la encuesta en la plataforma virtual de libre acceso Limesurvey

8. DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud ha informado que aproximadamente el 17% de las defunciones prematuras causadas cada año por el cáncer de pulmón en adultos, son atribuibles a la exposición a carcinógenos del aire al interior de los hogares por el uso de combustibles sólidos para cocinar (OMS, 2014). La exposición al humo de biomasa se ha convertido en un factor de riesgo importante para la salud, que requiere un cambio sustancial de las políticas y estrategias de promoción y prevención a nivel mundial (Ministerio de Salud Colombia, 2013). Al no llevarse a cabo lo anterior, el número de personas que dependerán de combustibles sólidos permanecerá sin cambios hasta 2030 según una estimación del Banco Mundial en el 2010, lo que puede aumentar significativamente la cantidad de personas afectadas.

El DANE reporta que en el área rural de Colombia el 62% de la población, aproximadamente más de 15 millones de personas, hacen uso de materiales de biomasa principalmente la leña, como combustible para cocinar (DANE, 2005; Rehfuess, 2007). Esta exposición crónica al humo de leña se ha asociado con el desarrollo de diferentes enfermedades como bronquitis, asma, EPOC, ceguera, enfermedades cardiovasculares entre otras, que han sido una causa importante de consulta médica y de hospitalización (González et al., 2004). Con relación a las enfermedades atribuibles a la polución intradomiciliaria, el gobierno Colombiano sugiere por medio del Plan de Salud Prosperidad para Todos, en el Programa de Promoción y Prevención de Enfermedades Respiratorias no Transmisibles (Ministerio de Salud Colombia, 2013), la realización de más estudios de investigación que permitan identificar factores de riesgo y garanticen una óptima atención del paciente. Nuestro estudio es un aporte que de acuerdo con el objetivo planteado anteriormente por el gobierno Colombiano.

De esta manera, nuestro estudio evaluó una población de mujeres expuestas al humo de biomasa y contribuyó a la identificación de factores de riesgo como variables demográficas, de exposición y de estilo de vida, que influyen la frecuencia de biomarcadores de daño genotóxico como Mn, NPBs y NBUDs, en linfocitos de sangre periférica, para identificar diferentes mecanismos de toxicidad en células en circulación y alertar a la población expuesta.

Este es uno de los primeros estudios a nivel mundial, donde se empleó el ensayo citómico de micronúcleos con el bloqueo de la citocinesis con Cyt-B en mujeres expuestas al humo de biomasa y de manera importante aportó información para la validación de NPBs y NBUDs, como biomarcadores sensibles que identifiquen el riesgo de una población expuesta a desarrollar enfermedades crónicas. Una de las fortalezas de nuestro estudio fue la utilización de un biomarcador sensible, validado como predictor de riesgo a cáncer como Mn (Bonassi et al., 2011), el cual es de gran relevancia para la identificación de daño clastogénico y aneugénico, con capacidad de establecer el riesgo a desarrollar cáncer en poblaciones expuestas a contaminantes ambientales. Además al registrar los Mn en 2.000 células binucleadas y reportarlos en 1.000, se confirió un mayor poder estadístico de los resultados como lo sugiere Fenech y colaboradores (2007).

En el presente estudio se tuvieron en cuenta variables de exposición (índice de exposición, ubicación de la cocina, distancia de la cocina a la casa, horas de cocción de los alimentos, tipo de ventilación y fogón), demográficas (etnia, edad), estilo de vida (dieta) y salud (síntomas de alteraciones respiratorias y neurológicas) para evaluar el papel modulador de los factores de riesgo y de confusión en la misma población. Nuestro estudio demostró que mujeres que cocinaban exclusivamente con biomasa tenían un incremento significativo en Mn y anomalías nucleares como NPBs y NBUDs comparadas con el grupo que utilizaba gas para cocinar. Este hallazgo sobre los mecanismos de daño celular observado, fue consistente con estudios en otras poblaciones donde se reportó un exceso de

daño al ADN en linfocitos (Musthapa et al., 2004; Pandey et al., 2005; Mondal et al., 2010) y células epiteliales bucales (Roychoudhury et al., 2012) de los usuarios de biomasa mencionados anteriormente.

El MP tiene la capacidad de ser inhalado, llegar hasta los alveolos y ser metabolizado a compuestos más reactivos y mutagénicos, atraviesa los pulmones y recorre libremente el torrente sanguíneo (Oberdörster et al., 2005; Pope et al., 2006), interactuando con células basales y alterando la homeostasis de un tejido normal, de esta manera causa daño directamente a la molécula del ADN, provocando lesiones primarias como la formación de aductos, sitios abásicos, quiebres de cadena sencilla y doble (Kirsch-Volders et al., 2014). Como mecanismo secundario cuando los agentes tóxicos interactúan con células directamente expuestas y/o en circulación, se activa una respuesta inflamatoria en el organismo dando lugar a la activación de los macrófagos, los cuales actúan como células diana primarias, junto con células epiteliales emitiendo grandes cantidades de ROS, que en déficit de antioxidantes como mecanismo de defensa *In vivo* genera estrés oxidativo (Mukherjee et al., 2011). Este estrés puede dar lugar a daños en el ADN, peroxidación lipídica, la modificación de proteínas, alteración de la membrana, daño mitocondrial (Zhai et al., 2002) e incremento de los niveles de daño genético en el individuo.

Fallas en los mecanismos de reparación de daño al ADN, defectos en enzimas de reparación o en genes como el BRCA1 y BRCA2 resultan en roturas de las hebras del ADN y conllevan a la fragmentación de cromosomas, el cual es principal mecanismo de formación de los MN (Fenech et al., 2011). Otro mecanismo de formación de MN es la hipometilación de citosinas (regiones pericentroméricas y centroméricas) que conduce a la mala segregación y pérdida de cromosomas (Fenech et al., 2011). Además, cuando la carga daño en el ADN supera la capacidad de reparación de la célula debido a la exposición a biomasa, se genera una mala reparación de los quiebres en cromosomas y la formación de

cromosomas dicéntricos que es uno de los mecanismos de formación de los NPBs (Bolognesi et al., 2013). Asimismo, alteraciones en el material genético incluyendo una amplificación génica generan anomalías nucleares como los NBUDs, que junto a los NPBs y MN son marcadores de inestabilidad cromosómica (Duan et al., 2009; Fenech et al., 2011)

Al analizar las variables propias de exposición en mujeres usuarias de biomasa, no se encontró una diferencia significativa entre la frecuencia de los biomarcadores con respecto a la ubicación de la cocina al exterior de la casa, pero sí se observó un incremento de los biomarcadores. Estos datos no concuerdan con estudios (Perafán & Rosero, 2013; Ramírez & Ordoñez, 2014) (datos no publicados), en los que se observó que la frecuencia de Mn es baja en niños y mujeres que tenían ubicada la cocina al exterior de las viviendas. Nuestro estudio reveló que mujeres que tenían la cocina ubicada al exterior de la casa, tenían mayor acumulación de humo en sus cocinas debido a la baja ventilación y a la ausencia de chimeneas en sus viviendas. Es importante resaltar que los estudios anteriormente mencionados, fueron realizados en células del epitelio bucal, lo que indica que el daño causado se generó por exposiciones recientes, debido a que el epitelio bucal es un tejido que tiene la capacidad de proliferar y estar en continua renovación, mientras que en nuestro estudio se utilizaron linfocitos de sangre periférica, lo que identificó el daño acumulado del ADN, debido a que estas células son considerados células centinelas para la identificación de efectos genotóxicos y tienen la habilidad de acumular daños por largos periodos de tiempo (Sasaki & Norman, 1967; Bloom & Paul, 1981).

De igual manera, cuando la cocina carecía de ventilación y el diseño del fogón era abierto, semicerrado o semicerrado con chimenea poco eficiente para liberar el humo hacia el exterior, ocurría también un aumento no significativo de la frecuencia de los biomarcadores (tabla 8). Se ha asociado que una mejora en la ventilación, con puertas y ventanas tienen un gran impacto en la reducción de los

niveles de monóxido de carbono y material particulado que afectan la salud de una población expuesta (Begum et al., 2009; Grabow & Bentson, 2013), este conocimiento fue socializado a la población objeto de estudio para influenciar en el cambio de estilo de vida.

Las mujeres usuarias de biomasa tenían un incremento significativo en la frecuencia de síntomas de alteraciones en el sistema respiratorio, en las que se incluye la tos, flema, disnea y ardor de la garganta. Se sabe, que el material particulado presente en el humo de biomasa, puede causar inflamación de las vías respiratorias y deteriorar la respuesta inmunitaria (Yassi et al., 2002). Los resultados anteriores están de acuerdo con estudios, en los que se encontró una alta frecuencia de síntomas de alteraciones respiratorias en mujeres expuestas, producto del daño estructural y funcional que sufren las células en contacto con agentes genotóxicos presentes en el humo de biomasa (Dasch, 1982; Perez-Padilla et al., 2010; Perez-Padilla et al., 1999). De acuerdo con la información suministrada en las encuestas por los grupos referente y expuesto, encontramos que el 63,8% y el 57,5% de la población expuesta de nuestro estudio, padecía síntomas de alteraciones oculares y neurológicas respectivamente, lo que se ve influenciado por el MP presente en las emisiones de humo de biomasa que al entrar en contacto con la sangre, produce la transformación de la hemoglobina en carboxihemoglobina, impidiendo el aporte de oxígeno al cerebro y demás órganos del cuerpo (Öztürk et al., 2002; Barregard et al., 2006). Así mismo, las alteraciones neurológicas y respiratorias pueden surgir como efecto de una respuesta sistémica del cuerpo frente a la contaminación del aire, tal como lo evidencia Dutta y colaboradores (2012) con cambios en las células del sistema inmune.

Se esperaba que la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad evaluados aumentara proporcionalmente con la edad como lo reportan Fenech & Bonassi, (2011); Fenech, (2007) y Dalpr y colaboradores (1997). Sin embargo, en un estudio realizado por Torres-Dosal y colaboradores (2008) donde se evaluó el

daño del ADN mediante el ensayo cometa, no se encontró diferencia significativa entre la cantidad de daño en el ADN registrado en la cola del cometa y el aumento de la edad de la población, datos que estuvieron acordes con nuestros resultados. Las mujeres expuestas en nuestro estudio tuvieron un incremento en la frecuencia de NPBs, que han sido definidos como biomarcadores sensibles asociados con cáncer de pulmón (M Fenech, 2007), lo que indica que estas mujeres tienen un mayor riesgo de padecer esta enfermedad.

La alimentación es un factor importante para garantizar un estilo de vida más saludable a la población. La ingesta de pescado, alimento bajo en calorías, rico en proteínas y altamente nutritivo, es una buena fuente de minerales, vitaminas, grasas insaturadas y antioxidantes. El Hidroxitirisol y el Omega 3 los cuales son compuestos con propiedades antioxidantes, actúan en la inhibición de la oxidación lipídica y la neutralización de los radicales libres (Pazos et al., 2008; Carrero et al., 2005) ayudando a mantener la estabilidad genómica. Según estándares de consumo de pescado establecidos por el Ministerio de Salud de Colombia (Zora et al., 1986), en nuestro estudio el grupo de mujeres expuestas al humo de biomasa, consumían baja cantidad de pescado (<150 g) con respecto al grupo referente, lo que se ve influenciado por los ingresos familiares mensuales de los participantes, que al ser tan bajos no les permite incluirlos en su canasta familiar. El bajo consumo de pescado puede explicar el aumento de la frecuencia de los biomarcadores estudiados en este grupo de mujeres. Datos reportados en la evaluación genotóxica de niños expuestos al humo de biomasa en el epitelio bucal por Sisenando y colaboradores (2012) fueron consistentes con nuestros resultados, reportando que el consumo de pescado fue 2,31 veces menor en el grupo expuesto.

Aunque nuestro estudio tuvo un tamaño muestral alto según los estándares internacionales, sugerimos aumentar el tamaño de la población para observar una mejor interacción de variables como la ingesta de verduras y pescado, con

respecto a los biomarcadores de genotoxicidad analizados, de manera que se corroboren los hallazgos reportados en este estudio. Los biomarcadores de genotoxicidad permitieron identificar diferentes mecanismos de toxicidad causados por los componentes del humo de biomasa en mujeres expuestas. Se puede concluir que estos biomarcadores, proporcionan datos eficaces, fiables y valiosos en la evaluación de los cambios en el material genético, como resultado de la exposición ambiental u ocupacional e identifica la progresión de algunas enfermedades y cáncer (M Fenech, 2006).

9. CONCLUSIONES

La exposición a compuestos presentes en el humo de biomasa provocó daño al ADN, errores en la citocinesis y aneuploidía aumentando significativamente la frecuencia de Mn, NPBs y NBUDs en linfocitos de sangre periférica.

La frecuencia en los síntomas de alteraciones del sistema respiratorio, neurológico y ocular, fue mayor en las mujeres que usaban biomasa para satisfacer sus necesidades básicas de energía.

Se identificó que la frecuencia de los biomarcadores de daño genotóxico del ensayo citómico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica del grupo expuesto fue modulado por la etnia, consumo de alcohol y por el bajo consumo de pescado.

El presente estudio sugiere que variables de exposición como ubicación de la cocina, tipo de ventilación, tiempo y número de veces de encendido del fogón, además de las horas diarias de exposición, modularon la toxicidad individual por el humo de biomasa.

Los linfocitos de sangre periférica demostraron ser un tejido sensible para identificar los daños a nivel celular producidos por la exposición al humo de biomasa.

Los resultados de esta investigación fueron divulgados a la comunidad en general, como estrategia para generar cambios en los hábitos de vida y mitigar los efectos de la exposición al humo de biomasa contribuyendo al desarrollo de un mejor estilo de vida.

10. RECOMENDACIONES

Emplear sondas de hibridación “in situ” (FISH), que permita la identificación del origen de los micronúcleos a partir de rupturas cromosómicas o de cromosomas enteros rezagados, con el fin de conocer el mecanismo por el cual los compuestos del humo de biomasa, generan toxicidad en células expuestas.

Evaluar la susceptibilidad genética de poblaciones expuestas crónicamente al humo de biomasa respecto a genes de metabolismo y reparación relacionados con el riesgo a padecer enfermedades.

Realizar estudios sobre el componente ancestral de las poblaciones Caucanas expuestas al humo de biomasa, para conocer su asociación con la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad, determinando si el pertenecer a una etnia específica confiere un mayor riesgo a desarrollar problemas de salud relacionados con la exposición.

Identificar la susceptibilidad genética de mujeres expuestas al humo de biomasa, a través de polimorfismos, en genes de reparación o del metabolismo, para determinar cómo éstos pueden modular el daño al ADN.

Cuantificar la concentración de contaminantes presentes en el humo de biomasa durante la cocción de alimentos, para evaluar su influencia en el aumento de la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad estudiados y determinar con mayor precisión el daño que se está generando en la población.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Albalak, R., Bruce, N., McCracken, J. P., Smith, K. R., & De Gallardo, T. (2001). Indoor respirable particulate matter concentrations from an open fire, improved cookstove, and LPG/open fire combination in a rural Guatemalan community. *Environmental Science & Technology*, 35(13), 2650–2655.
- Alfheim, I., Becher, G., Hongslo, J. K., & Ramdahl, T. (1984). Mutagenicity testing of high performance liquid chromatography fractions from wood stove emission samples using a modified Salmonella assay requiring smaller sample volumes. *Environmental Mutagenesis*, 6(1), 91–102.
- Au, W. W., Walker, D. M., Ward Jr, J. B., Whorton, E., Legator, M. S., & Singh, V. (1991). Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(2), 137–144.
- Barregard, L., Sällsten, G., Gustafson, P., Andersson, L., Johansson, L., Basu, S., & Stigendal, L. (2006). Experimental exposure to wood-smoke particles in healthy humans: effects on markers of inflammation, coagulation, and lipid peroxidation. *Inhalation Toxicology*, 18(11), 845–853.
- Bloom, A. D., & Paul, N. W. (1981). *Guidelines for Studies of Human Populations Exposed to Mutagenic and Reproductive Hazards: Proceedings of Conference Held January 26-27, 1981 in Washington*. March of Dimes Birth Defects Foundation.
- Bobak, M., Dejmek, J., Solansky, I., & Sram, R. J. (2005). Unfavourable birth outcomes of the Roma women in the Czech Republic and the potential explanations: a population-based study. *BMC Public Health*, 5, 106. <http://doi.org/10.1186/1471-2458-5-106>
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., & Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutation Research*, 753(2), 100–13. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002>
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., & Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93–100. <http://doi.org/10.1093/mutage/geq075>
- Bornholdt, J., Dybdahl, M., Vogel, U., Hansen, M., Loft, S., & Wallin, H. (2002). Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice.

Mutation Research, 520(1-2), 63–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297145>

- Bruce, N. (2002). The health effects of indoor air pollution exposure in developing countries.
- Clifford, P. (1972). Carcinogens in the nose and throat: nasopharyngeal carcinoma in Kenya. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 65(8), 682.
- Cupitt, L. T., Glen, W. G., & 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(Suppl 4), 75.
- Dalpr, L., Migliore, L., & Padovam, P. (1997). Age-related Increase of Baseline Frequencies Exchanges , Chromosome Aberrations , Lymphocytes of Sister Chromatid and Micronuclei. *Prevention*, 6(April), 249–256.
- Danielsen, P. H., Bräuner, E. V., Barregard, L., Sällsten, G., Wallin, M., Olinski, R., ... 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(1), 37–42.
- Dasch, J. M. (1982). Particulate and gaseous emissions from wood-burning fireplaces. *Environmental Science & Technology*, 16(10), 639–645. <http://doi.org/10.1021/es00104a003>
- De Oliveira Alves, N., Matos Loureiro, A. L., Dos Santos, F. C., Nascimento, K. H., Dallacort, R., de Castro Vasconcellos, P., ... de Medeiros, S. R. B. (2011). Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1427–33. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.007>
- Diaz, J. V, Koff, J., Gotway, M. B., Nishimura, S., & Balmes, J. R. (2006). Case report: a case of wood-smoke-related pulmonary disease. *Environmental Health Perspectives*, 759–762.
- Erdinger, L., Dürr, M., & Höpker, K.-A. (2005). Correlations between Mutagenic Activity of Organic Extracts of Airborne Particulate Matter, NOx, and Sulphur Dioxide in Southern Germany. Results of a Two-Year Study (11 pp). *Environmental Science and Pollution Research*, 12(1), 10–20.
- Fenech, M. (1998). Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - A biomarker for DNA damage

in human populations. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 404, 155–165. [http://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00109-2](http://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00109-2)

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455(1-2), 81–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911968>

Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, 600(1-2), 58–66. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028>

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–104. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>

Fenech, M., & Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43–49. <http://doi.org/10.1093/mutage/geq050>

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534(1-2), 65–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504755>

Glinianaia, S. V, Rankin, J., Bell, R., Pless-Mullooli, T., & Howel, D. (2004). Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 15(1), 36–45. <http://doi.org/10.1097/01.ede.0000101023.41844.ac>

González, Mauricio, Arrero, M. A. B., & Ogotá, D. A. M. A. B. (2004). Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) por humo de leña en mujeres Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) produced by woodsmoke in women. *Acta Medica Colombiana*, 29(571), 17–25.

Hacon, S., Artaxo, P., Gerab, F., Yamasoe, M. A., Campos, R. C., Conti, L. F., & De Lacerda, L. D. (1995). Atmospheric mercury and trace elements in the region of Alta Floresta in the Amazon basin. *Water, Air, and Soil Pollution*, 80(1-4), 273–283.

Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., ... MacGregor, J. T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic

- damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(4), 277–291.
- Herrera-Portugal, C., Franco-Sánchez, G., Pelayes Cruz, M., Schlottfeldt Trujillo, Y., & Pérez Solís, B. L. (2009). Daño al ADN en mujeres expuestas al humo de la leña en Chiapas, México. *Acta Toxicológica Argentina*, 17(2), 56–61.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & 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*, 659(1-2), 93–108. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>
- Hytönen, S., Alfheim, I., & Sorsa, M. (1983). Effect of emissions from residential wood stoves on SCE induction in CHO cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 118(1), 69–75.
- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, a, Baan, R. a, & Orsière, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research*, 658(3), 215–33. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.001>
- Kim, K.-H., Jahan, S. A., & Kabir, E. (2011). A review of diseases associated with household air pollution due to the use of biomass fuels. *Journal of Hazardous Materials*, 192(2), 425–431. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.087>
- Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Knasmueller, S., Holland, N., Bolognesi, C., & Fenech, M. F. (2014). Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-A HUMN project perspective. *Mutation Research*, 759, 49–58. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.12.001>
- Kleinerman, R. A., Wang, Z. Y., Lubin, J. H., Zhang, S. Z., Metayer, C., & Brenner, A. V. (2000). Lung cancer and indoor air pollution in rural China. *Annals of Epidemiology*, 10(7), 469.
- Koo, C. W., Gupta, N., Baliff, J. P., Hudock, K., & Haas, A. R. (2011). A tale of two sisters: Biomass fuel exposure-related lung disease. *Clinical Radiology*, 66(2), 190–193.
- Maisonet, M., Correa, A., Misra, D., & Jaakkola, J. J. K. (2004). A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environmental Research*, 95(1), 106–15. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2004.01.001>

- Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., ... Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192(1), 3–16.
- Ministerio de Salud, C. (2013). Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica - Epoc. *Minsalud*, 1, 12.
- Mishra, V. (2003). Effect of Indoor Air Pollution from Biomass Combustion on Prevalence of Asthma in the Elderly. *Environmental Health Perspectives*, 111(1), 71–77. <http://doi.org/10.1289/ehp.5559>
- Mondal, N. K., Mukherjee, B., Das, D., & 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*, 697(1-2), 47–54. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.02.006>
- Mukherjee, B., Dutta, A., Roychoudhury, S., & Ray, M. R. (2011). Chronic inhalation of biomass smoke is associated with DNA damage in airway cells: involvement of particulate pollutants and benzene. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 33(4), 281–9. <http://doi.org/10.1002/jat.1748>
- Musthapa, M. S., Lohani, M., Tiwari, S., Mathur, N., Prasad, R., & 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(4), 243–249.
- Naeher, L. P., Brauer, M., Lipsett, M., Zelikoff, J. T., Simpson, C. D., Koenig, J. Q., & Smith, K. R. (2007). Woodsmoke health effects: a review. *Inhalation Toxicology*, 19(1), 67–106.
- Oyarzún, M. (2010). Contaminación aérea y sus efectos en la salud *, 16–25.
- Öztürk, Ş., Vatansever, S., Çefle, K., Palanduz, Ş., Güler, K., Erten, N., ... Taşcıoğlu, C. (2002). Acute wood or coal exposure with carbon monoxide intoxication induces sister chromatid exchange. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 40(2), 115–120.
- Pandey, A. K., Bajpayee, M., Parmar, D., Rastogi, S. K., Mathur, N., Seth, P. K., & Dhawan, A. (2005). DNA damage in lymphocytes of rural Indian women exposed to biomass fuel smoke as assessed by the Comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(5), 435–441.

- Pandey, M. R., Smith, K. R., Boleij, J. S. M., & Wafula, E. M. (1989). Indoor air pollution in developing countries and acute respiratory infection in children. *The Lancet*, 333(8635), 427–429.
- Pazos, M., Alonso, A., Sanchez, I., & Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3334–3340.
- Perez-Padilla, J. R., Regalado-Pineda, J., & Moran-Mendoza, a. O. (1999). La inhalacion domestica del humo de lena y otros materiales biologicos. Un riesgo para el desarrollo de enfermedades respiratorias. *Gaceta Medica de Mexico*, 135(1), 19–29.
- Perez-Padilla, R., Perez-Guzman, C., Baez-Saldana, R., & Torres-Cruz, A. (2001). Cooking with biomass stoves and tuberculosis: a case control study. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5(5), 441–447.
- Perez-Padilla, R., Schilman, a, & Riojas-Rodriguez, H. (2010). Respiratory health effects of indoor air pollution. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 14(9), 1079–86. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709542&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Pintos, J., Franco, E. L., Kowalski, L. P., Oliveira, B. V., & Curado, M. P. (1998). Use of wood stoves and risk of cancers of the upper aero-digestive tract: a case-control study. *International Journal of Epidemiology*, 27(6), 936–940.
- Pope, A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., & Thurston, G. D. (2002). to Fine Particulate Air Pollution, 287(9).
- Quiroz-Carranza, J., & Orellana, R. (2010). Uso y manejo de leña combustible en viviendas de seis localidades de Yucatán, México. *Madera Y Bosques*, 16(2), 47–67.
- Rehfuess, E. (2007). Combustibles para una vida mejor, 28. Retrieved from http://www.who.int/indoorair/publications/fuelforlife_es.pdf?ua=1
- Rehfuess, E. A., Bruce, N. G., & Smith, K. R. (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.
- Rehfuess, E., Mehta, S., & Prüss-Üstün, A. (2006). Assessing Household Solid Fuel Use: Multiple Implications for the Millennium Development Goals.

Environmental Health Perspectives, 114(3), 373–378.
<http://doi.org/10.1289/ehp.8603>

- Rinne, S. T., Rodas, E. J., Bender, B. S., Rinne, M. L., Simpson, J. M., Galer-Unti, R., & Glickman, L. T. (2006). Relationship of pulmonary function among women and children to indoor air pollution from biomass use in rural Ecuador. *Respiratory Medicine*, 100(7), 1208–15.
<http://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.10.020>
- Roychoudhury, S., Mondal, N. K., Mukherjee, S., Dutta, A., Siddique, S., & Ray, M. R. (2012). Activation of protein kinase B (PKB/Akt) and risk of lung cancer among rural women in India who cook with biomass fuel. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 259(1), 45–53.
- Salvi, S. S., & Barnes, P. J. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, 374(9691), 733–743.
- Sasaki, M. S., & Norman, A. (1967). Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9–15.
- Sisenando, H. A., Batistuzzo de Medeiros, S. R., Artaxo, P., Saldiva, P. H. N., & Hacon, S. D. S. (2012). Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *BMC Oral Health*, 12(1), 6. <http://doi.org/10.1186/1472-6831-12-6>
- Smith, K. R., Mehta, S., & Maeusezahl-Feuz, M. (2004). Indoor air pollution from household use of solid fuels. *Comparative Quantification of Health Risks: Global and Regional Burden of Disease Attributable to Selected Major Risk Factors*, 2, 1435–1493.
- Smith, K., Samet, J. M., Romieu, I., & Bruce, N. (2000). Indoor air pollution in developing countries and acute lower respiratory infections in children. *Thorax*, 55(6), 518–32. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1745777&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Sungu, Y. S. (2001). Sister-chromatid Exchange Frequency in Women Who Exposed to Biomass in a Village of Central Anatolia, 2(2), 26–28.
- Torres-Duque, C., Maldonado, D., Pérez-Padilla, R., Ezzati, M., & Viegi, G. (2008). Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence.

Proceedings of the American Thoracic Society, 5(5), 577–90.
<http://doi.org/10.1513/pats.200707-100RP>

- Vargas, S., Onatra, W., Osorno, L., Páez, E., & Sáenz, O. (2008). Contaminación atmosférica y efectos respiratorios en niños, en mujeres embarazadas y adultos mayores. *Revista Actualidad & Divulgación Científica*, 11(1), 31–45.
- Velema, J. P. V, Ferrera, A. F., Figueroa, M. F., Bulnes, R. B., Toro, L. A. T., De Barahona, O., ... Melchers, W. J. G. M. (2002). BURNING WOOD IN THE KITCHEN INCREASES THE RISK OF CERVICAL NEOPLASIA IN HPV-INFECTED WOMEN IN HONDURAS. *International Journal of Cancer*, 541(October 2001), 536–541. <http://doi.org/10.1002/ijc.1622>
- Viegi, G., Simoni, M., Scognamiglio, A., Baldacci, S., Pistelli, F., Carrozzi, L., & Annesi-Maesano, I. (2004). Indoor air pollution and airway disease State of the Art. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(12), 1401–1415.
- Vinaccia, S., & Quiceno, J. M. (2011). Calidad de Vida Relacionada con la Salud y Factores Psicológicos: Un Estudio desde la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica - EPOC Health-Related Quality of Life and Psychological Factors: A Study from Chronic Obstructive Pulmonary Disease - COPD, 29(46), 65–75.
- World Health Organization. (2007). National Burden of Disease Estimates.
- Zhai, R., Liu, G., Ge, X., Yang, C., Huang, C., Wu, C., & Christiani, D. C. (2002). Genetic Polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in Coal Workers' Pneumoconiosis. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 44(4). Retrieved from http://journals.lww.com/joem/Fulltext/2002/04000/Genetic_Polymorphisms_of_MnSOD,_GSTM1,_GSTT1,_and.19.aspx
- Zhang, J., & Smith, K. R. (1995). Hydrocarbon emissions and health risks from cookstoves in developing countries. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 6(2), 147–161.
- Zora, J. a, Zimmerman, D., Carey, T. L., O'Connell, E. J., & Yunginger, J. W. (1986). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression after short-term, high-dose glucocorticoid therapy in children with asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 77, 9–13.

- Begum BA, Paul SK, Hossain MD, Biswas SK, Hopke PK. Indoor air pollution from particulate matter emissions in different households in rural areas of Bangladesh. *Building and Environment*. 2009;44(5):898-903.
- Alfheim, I., Becher, G., Hongslo, J. K., & Ramdahl, T. (1984). Mutagenicity testing of high performance liquid chromatography fractions from wood stove emission samples using a modified Salmonella assay requiring smaller sample volumes. *Environmental Mutagenesis*, 6(1), 91–102.
- Bravo Chaucanés, Claudia Patricia & León Annicchiarico, Clara Lucía. Frecuencia de alteraciones cromosómicas asociadas con la exposición crónica al humo de leña como un factor de riesgo en la salud de mujeres expuestas, pertenecientes a zonas rurales aledañas al municipio de Popayán, (Cauca). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Educación. Departamento de Biología. Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética. Popayán, 2008.
- Ekici, A., Ekici, M., Kurtipek, E., Akin, A., Arslan, M., Kara, T., ... Demir, S. (2005). Obstructive airway diseases in women exposed to biomass smoke. *Environmental Research*, 99(1), 93–98.
- Grabow K, Still D, Bentson S. Test Kitchen studies of indoor air pollution from biomass cookstoves. *Energy for Sustainable Development*. 2013;17(5):458-62.
- Morales, R. G. E. (2006). Contaminación atmosférica urbana: Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago. Editorial Universitaria.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*. 2005:823-39.
- Perafán Collazos, Jeyson & Rosero Caldón, Aldair Beryery. Evaluación del efecto citotóxico, genotóxico e índice de reparación en el epitelio bucal de niños expuestos al humo de combustibles sólidos, mediante el ensayo citógeno de micronúcleos. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Educación. Departamento de Biología. Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética. Popayán 2013.
- Ramirez de Valdenegro, Maria Mercedes & Ordoñez Paz, Elizabeth Cristina; Evaluación citotóxica y genotóxica de la exposición crónica al humo de biomasa mediante la prueba de micronúcleos en células de los epitelios bucal y nasal, en un grupo de mujeres expuestas pertenecientes a zonas rurales aledañas al Municipio de Popayán. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Educación. Departamento de Biología. Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética. Popayán 2013.
- Yassi, A., Kjellström, T., Kok, T. De, & Guidotti, T. L. (2002). *Alud ambiental ásica*.

SITIOS WEB

- www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/previdisexecsumsp.pdf?ua=1
- www.who.int/mediacentre/factsheets/fs292/es/
- http://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=726&catid=861:noticias-2006&itemid=900
- http://www.dane.gov.co/censo/files/presentaciones/jefes_hog
- <http://www.who.int/indoorair/publications/nationalburden/en/#>
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs292/es/>

Anexo 1. Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO MONITOREO BIOLÓGICO EN PERSONAS EXPUESTAS CRÓNICAMENTE AL HUMO DE BIOMASA

Nombre _____ con cédula de ciudadanía _____ confirmo que he sido informado por el grupo de INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA de la Universidad del Cauca, que realizará el estudio “*Identificación del daño genotóxico producido por exposición a carcinógenos del humo de biomasa en una población de mujeres de zonas rurales del Departamento del Cauca, mediante el ensayo citómico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.*” Se me ha solicitado participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO: Este estudio tiene como objetivo identificar el daño genotóxico producido por la exposición crónica al humo de biomasa en el ambiente interior y el riesgo a desarrollar cáncer en una población de mujeres expuestas, mediante el ensayo citómico de micronúcleos y anomalías nucleares (yemas nucleares y puentes nucleoplásmicos), en linfocitos de sangre periférica.

HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPOSITOS, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGIA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO: En este estudio serán seleccionadas 80 mujeres expuestas al humo de biomasa y 80 mujeres no expuestas como grupo referente, con el fin de conocer al momento del análisis de los resultados, los efectos genotóxicos 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, formulación 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 presentarán en forma anónima.

REQUERIMIENTOS: En pleno uso de mis facultades mentales, libre, consciente estoy de acuerdo en participar en este estudio, entendiéndolo que se requiere de mí lo siguiente: contestar un cuestionario de aproximadamente 20 minutos para suministrar información personal referente a mi edad, estado de salud y estilo de vida. Si soy seleccionada para el estudio debo donar 5mL de sangre tomada de la vena de mi brazo por una persona capacitada, los cuáles serán procesados en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca para el ensayo citómico de micronúcleos.

RIESGOS DE PARTICIPACIÓN: Los riesgos potenciales de participación en el estudio son formación de hematomas en el sitio de la toma de la muestra de sangre,

los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de muestras biológicas y el empleo de técnicas médicamente aceptadas y uso de implementos estériles nuevos. Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada, los resultados de las pruebas serán codificados y se darán a conocer en forma grupal más no individual en un seminario, con el propósito de hacer una reflexión, luego de hacer una serie de conferencias.

BENEFICIOS DE PARTICIPACIÓN: Atender a cursos de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud por exposición al humo de biomasa y a la reflexión y motivación hacia el cambio de actitud para la prevención de riesgos a la salud por exposición a este. Conocer los resultados del estudio.

ENTENDIENDO QUE: Mi participación 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 escéptica para evitar complicaciones.

Tengo claro que por la participación voluntaria, 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 2° No 1°-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 este. Los procedimientos alternativos principales incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, han sido explicados en un lenguaje claro que podido entender.

He leído este consentimiento, he entendido en que consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico *“Identificación del daño genotóxico producido por exposición a carcinógenos del humo de biomasa en una población de mujeres de zonas rurales del Departamento del Cauca, mediante el ensayo citómico de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.”*

Nombre del participante

Firma/huella del participante

Nombre del testigo

Firma/huella del testigo

Nohelia Cajas Salazar, Ph.D. Director del proyecto

Anexo 2. Tabla de registro de micronúcleos y anomalías nucleares.

"IDENTIFICACION DEL DANO GENOTOXICO PRODUCIDO POR EXPOSICION A CARCINOGENOS DEL HUMO DE BIOMASA EN UNA POBLACION DE MUJERES DE ZONAS RURALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA, MEDIANTE EL ENSAYO CITOMICO DE MICRONUCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA"

Fecha: _____ Registrador: _____ Microscopio: _____

Código paciente	Código Placa (ciego)	N° Células Binucleadas	N° Mn	Total Mn /2000 cél	N° NPBs	Total NPBs /2000 cél	N° NBUDs	Total NBUDs /2000 cél	Coordenadas	Observaciones