



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Genotoxicidad en linfocitos humanos de agua contaminada por hidrocarburos, del pozo 4 ubicado en aguarico Shushufindi – Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Sánchez Sánchez, Gladys Katherine

DIRECTORA: Mgtr. Ramírez Orellana, María Isabel

LOJA-ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgtr.

María Isabel Ramírez Orellana

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, Genotoxicidad en linfocitos humanos de agua contaminada por hidrocarburos, del pozo 4 ubicado en aguarico Shushufindi – Ecuador realizado por Sánchez Sánchez Gladys Katherine; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre 2017

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Gladys Katherine Sánchez Sánchez, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Genotoxicidad en linfocitos humanos de agua contaminada por hidrocarburos, del pozo 4 ubicado en aguarico Shushufindi – Ecuador, siendo la Mgtr. María Isabel Ramírez Orellana directora del presente trabajo, y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimiento y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f)

Sánchez Sánchez Gladys Katherine

C.I. 1900644855

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A mi madre, que gracias a su gran esfuerzo y apoyo incondicional he podido cumplir mis metas.

A mis hermanos Andrés y Yalena, por brindarme su apoyo incondicional.

A Pedro Daniel, por ser una parte fundamental en mi vida y por impulsarme a seguir adelante.

A todos mis amigos por su confianza y sus palabras de aliento.

Gladys Katherine Sánchez Sánchez

AGRADECIMIENTOS

A la Mgtr. María Isabel Ramírez, por ser mi guía en todo momento, por compartirme sus conocimientos y permitirme formar parte de este proyecto, gracias a su paciencia brindada desde el inicio de mi trabajo.

A Natalia Bailón PhD, por permitirme formar parte del Laboratorio de Biología Celular y Genotóxicología, por sus enseñanzas que me ayudaron a crecer profesionalmente.

A Luis Guamán PhD, por despejarme alguna duda, y sugerirme algún comentario para hacer un buen trabajo.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a su cuerpo docente de la carrera de Bioquímica y Farmacia, que gracias a sus conocimientos compartidos hoy me han permitido alcanzar mí meta.

A todos mis compañeros de laboratorio por su ayuda y sus palabras de aliento.

Gladys Katherine Sánchez Sánchez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEORICO.....	5
1.1. Petróleo.....	6
1.2. Hidrocarburos derivados del petróleo crudo.....	6
1.2.1 Composición química.....	6
1.2.2 Contaminantes del petróleo.....	8
1.3. Contaminación hídrica.....	10
1.4. Contaminación hídrica en la Amazonia del Ecuador.....	11
1.5. Toxicidad de los hidrocarburos.....	13
1.6. Distribución toxica de los (HAP) en los organismos.....	14
1.7. Efectos de los derrames de petróleo sobre el medio ambiente y salud.....	14
1.8. Genotoxicidad.....	16
1.9. Biomarcadores.....	16
1.9.1. Biomarcadores de susceptibilidad.....	17
1.9.2. Biomarcadores de efecto.....	17
1.9.3. Biomarcadores de exposición.....	17
1.9.4. Aplicaciones de los biomarcadores.....	17
1.10 Ensayo cometa.....	18
1.10.1 Factores que influyen en el ensayo cometa	18
1.10.2 Ventajas.....	19
1.10.3 Desventajas.....	19
1.10.4 Aplicaciones.....	20

1.11. Viabilidad celular.....	20
1.12. Modelo biológico.....	21
1.13 Objetivos.....	21
CAPITULO II.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 Material de estudio.....	23
2.2. Cultivo de linfocitos humanos.....	23
2.2.1. Siembra.....	23
2.2.2. Viabilidad (FDA/ BrEt).....	24
2.2.3 Ensayo cometa.....	24
2.2.3.1 Cosecha.....	24
2.2.4 Electroforesis.....	25
2.2.5 Análisis estadístico.....	25
2.2.5.1 Viabilidad por FDA- Bromuro de Etidio.....	25
2.2.5.2 Ensayo Cometa.....	25
CAPITULO III.....	26
RESULTADOS.....	26
3.1 Viabilidad por FDA- Bromuro Etidio.....	27
3.2 Actividad Genotóxica mediante ensayo cometa.....	31
CAPITULO IV.....	35
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41

RESUMEN

Ecuador es un país petrolero, que en los años sesenta entró en el mercado mundial, por el creciente ingreso producido con las exportaciones petroleras se convirtió en el principal recurso económico para el país, y a la vez siendo prácticamente la causa principal de la contaminación del suelo, el agua y el aire, a causa de la explotación desmedida de petróleo, por los impactos que se ocasionan en las fases de exploración y perforación. En la selva amazónica, se logra identificar este problema por la presencia de daños irremediables en el ecosistema y la salud de la población, generado por la mala eliminación de los residuos. En este trabajo determinamos la genotoxicidad que podría ocasionar el agua contaminada con hidrocarburos a diferentes concentraciones en linfocitos de 3 donantes sanos, mediante el ensayo cometa. Los resultados indican que el agua contaminada con estos compuestos, puede causar efectos adversos sobre la salud por que ocasiona daño genotóxico en el ADN de las células sanguíneas. Comparamos nuestros resultados entre los 3 donantes y observamos así mismo una respuesta dosis dependiente.

Palabras clave: *Ensayo cometa, agua contaminada con hidrocarburos, petróleo, genotoxicidad.*

ABSTRACT

Ecuador is an oil country that in the sixties entered the world market. Due to the increased income produced by oil exports, it became the main economic resource for the country, and at the same time being the main cause of contamination of the soil, water and air, because its excessive exploitation. In the Amazon rainforest this problem can be identified due to the presence of irremediable damage to the ecosystem and the health of the population. In this work, we determined the genotoxicity that contaminated water with hydrocarbon could cause to different concentrations in lymphocytes of 3 healthy donors, through the comet assay. The results indicate that water contaminated with these compounds can cause adverse effects on health, because it causes genotoxic damage in the DNA of blood cells. We compared the results of the 3 donors and also observed a dose-dependent response.

Keywords: *Comet Assay, water contaminated with hydrocarbons, petroleum, genotoxicity*

INTRODUCCIÓN

A mediados de los años sesenta en Ecuador surge el “boom” petrolero, específicamente en la región amazónica, la cual alberga alrededor del 5 % de la población nacional, a medida que inició la explotación petrolera trajo consigo un gran número de cambios a esta zona del país; sin embargo, lo que más preocupa a los habitantes es la contaminación ambiental derivada de la mala eliminación de residuos generados en el proceso de exploración y extracción, estos desechos en la mayor parte son vertidos directamente sobre los afluentes de ríos, cuyas aguas son utilizadas para la agricultura, uso en el hogar, y la pesca. El cantón Shushufindi ubicado en la provincia de Sucumbíos al nororiente ecuatoriano, es uno de los sectores más afectados debido a los daños graves al ecosistema que se han originado por la acumulación de metales pesados e hidrocarburos (San Sebastian, et al., 2001).

En varios estudios se han clasificado a estos compuestos como mutágenos y/o carcinógenos, con un conocido efecto nocivo sobre la salud (Pérez, et al., 2016). Los habitantes de estas zonas afectadas por lo general están en contacto con HAPs originados por las refinerías de petróleo por varias vías, tales como: digestiva, inhalación y dérmica, lo que conlleva a deteriorar la salud, como resultado de un posible proceso de inestabilidad genética, ya que estos compuestos pueden unirse con facilidad al ADN, lo cual causa interrupciones bioquímicas y daño celular en los organismos.

Así mismo, ésta exposición involucra signos y síntomas relacionados con enfermedades a la piel, problemas respiratorios, digestivos y afecciones oculares. Mujeres que residen cerca de los pozos petroleros han manifestado un incremento en el número de abortos, además se ha evidenciado un incremento de muerte por cáncer (Fontaine, 2013; San Sebastian, et al., 2001).

Hoy en día se cuenta con una amplia batería de herramientas para la detección de daño genético, como es el caso del uso de biomarcadores, que son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o indicador de la exposición a un agente tóxico; evalúan la magnitud de respuesta del organismo frente al mismo y cuantifican específicamente la exposición, el efecto biológico temprano y la susceptibilidad (Møller, 2006).

El ensayo cometa es considerado un biomarcador de exposición debido a que el efecto detectado puede ser reversible, aunque se están haciendo esfuerzos para

desarrollarla como una herramienta para medir riesgo, es decir como biomarcador de efecto (Møller, 2006; Heuser, et al., 2007).

Este ensayo se ha caracterizado por ser sensible, rápido, y económico en comparación a otras técnicas de alta sensibilidad para detectar el daño en el ADN, su realización es rápida y requiere pequeñas poblaciones de células (Ayala, et al., 2004). En este proceso la membrana celular se desintegra y el ADN migra, los fragmentos más pequeños lo hacen más rápido que los fragmentos grandes forman una cauda o cola, que antes de ser observado con el microscopio de fluorescencia el ADN es teñido con BrEt y presenta la apariencia de un cometa (Ansoar, et al., 2015). La magnitud del daño es evaluada de acuerdo al número de células afectadas, a la longitud de la cola y a la intensidad de la fluorescencia de los fragmentos (Venegas, 2009).

Es así que, a través de este estudio, se intenta evaluar el efecto genotóxico que podría ocasionar el agua contaminada con hidrocarburos en los linfocitos humanos, en función al largo de cola (migración del ADN), tratadas "*in vitro*" mediante el ensayo cometa.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

“En el Ecuador, la actividad petrolera es la fuente económica más importante del presupuesto general del estado, siendo una de las formas por la cual la economía del país se mantiene. A la vez es paradójico la producción petrolera ecuatoriana ya despojan de su riqueza a la amazonia generando muchos desastres a los ecosistemas naturales, afectando la salud de trabajadores, familias y comunidades; convirtiéndose en una de las principales causas de enfermedades” (San Sebastián, et al., 2004).

1.1 Petróleo

Es una sustancia mineral natural insoluble en agua, que lo conforman cantidades variables de gas, agua salada, lodo y material rocoso. Está distribuido en todas las regiones conocidas con el nombre de cuencas sedimentarias. El petróleo está formado por hidrocarburos, integrados por carbono e hidrogeno y en cantidades pequeñas nitrógeno, oxígeno y azufre (Salsedo, 1992). Su origen es de tipo orgánico y sedimentario, debido a la presión y altas temperaturas se produce la descomposición de materia orgánica que se convierte en aceite y gas. En las rocas y los mantos sedimentarios es donde se lleva acabo el fenómeno natural que da lugar a la creación del petróleo y el gas. El petróleo se encuentra ocupando los espacios de rocas como areniscas y calizas (Botello, et al., 2005; Gondecki, 2011).

1.2 Hidrocarburos derivados del petróleo crudo

1.2.1 Composición química

Los principales componentes de los hidrocarburos del petróleo son carbono en 87 % y el hidrogeno en 13 % (Salsedo, 1992). A estos se suman elementos más complejos como:

- ♣ Parafínico o alcanos, son los compuestos más ricos en hidrogeno, de cadenas rectas o ramificadas de átomos de carbono. Son saturados, por lo tanto, son relativamente estables. Se distingue porque posee, una baja densidad, un elevado índice de viscosidad, baja volatilidad y un bajo poder disolvente, tienen enlaces simples entre C-H (Larriba, 2015).

- Los naftenos o cicloalcanos, son grupos de hidrocarburos de anillo saturado cíclico, constituye el 50 % del petróleo, tienen enlaces simples que se encuentran en todas las fracciones del crudo excepto en las más ligeras. Tienen estructura de cadena cerrada, cíclica o de anillo. Es uno de los componentes más tóxicos del petróleo cuya toxicidad aumenta debido a la sinergia de compuestos aromáticos como el benceno, pudiendo acumularse rápidamente y ser retenidos por periodos largos en los tejidos de algunos órganos, causando síntomas neurotóxicos, leucemia y probablemente otros tumores hematológicos (Gráfico 1) (Botello, et al., 2005; Villanueva, Fernández, 2014).

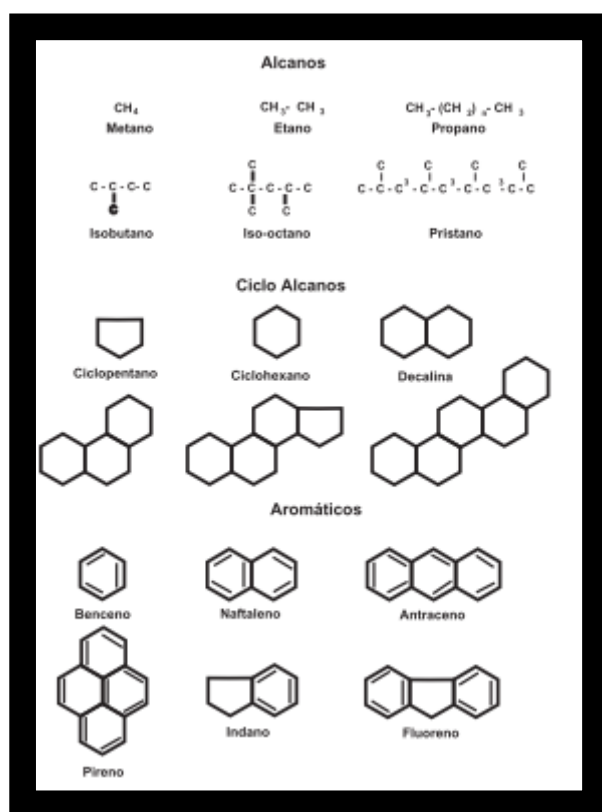


Gráfico 1. Estructura química de los principales grupos de HAPs del petróleo

Fuente: (Botello, et al., 2005).

Elaborado: Autor

El gas natural como el metano, también se origina de la descomposición de la vegetación y de organismos acuáticos comprimidos bajo el peso de la sedimentación que llenaron los huecos de roca porosa y los yacimientos subterráneos naturales, en bolsas llamadas fallas o trampas estratégicas y se acumularon en yacimientos. Este gas es un producto formado por la unión de un átomo de carbono y cuatro átomos de

hidrogeno siendo una mezcla de metano, etano, propano y butano. Asimismo se encuentra trazas de nitrógeno, vapor de agua, dióxido de carbono, ácido sulfhídrico y a veces gases inertes, como argón o helio (Kraus, 2012).

1.2.2 Contaminantes por petróleo

Dentro de los contaminantes que pueden causar efectos adversos en el ecosistema y la salud, podemos incluir los compuestos químicos propios del petróleo crudo y los químicos que se usan para facilitar su extracción durante las distintas prácticas operacionales (Salsedo, 1992).

La explotación petrolera atenta contra el medio ambiente y la biodiversidad en todos sus procesos de extracción porque es tóxico, inflamable y carcinógeno, debido a que contiene gran variedad de compuestos como son los metales pesados, que son desechos generados en la fase de perforación, los cuales se detallan en la Tabla 1 (Liu, et al., 2016).

Tabla 1. Efectos adversos en la salud de los metales pesados originados durante el proceso de perforación.

Cadmio	Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) la ingesta semanal de este metal debe ser hasta 7 µg/kg, es un micronutriente esencial, pero si sobrepasa dicho nivel tiene propiedades toxicas y puede persistir en el medio ambiente, si es absorbido por el organismo humano puede afectar por décadas, debido a que se acumula en la corteza renal y se liga a la metalotioneína. La saturación de los sitios de unión cadmio-metalotioneína incrementa el cadmio en la orina. Está clasificado como carcinógeno y genotóxico, además se relaciona con la disfunción renal, enfermedades pulmonares, cáncer de pulmón y puede provocar osteoporosis en humanos y animales (García, Cruz, 2012; Ramírez, 2002).
Plomo	Es tóxico más de 1,5 µg/dl. Se acumula en los organismos vivos por la gran capacidad que tiene para unirse fuertemente a las proteínas, se distribuye en el sistema esquelético y contiene de 80 a 90 % de la carga corporal de plomo, siendo la vida media en el hueso de 20 a 30 años, también afecta a los tejidos blandos como el de riñón, cerebro y hígado.

	Las principales vías de eliminación son la biliar y la urinaria. Es responsable de algunas alteraciones como el deterioro de la capacidad intelectual, cambios en el comportamiento, bloqueo de la hematopoyesis, toxicidad renal y neuropatía periférica (Burger, Román, 2010; Ascione, 2001).
Mercurio	Es un metal pesado altamente tóxico, posee solubilidad en lípidos, atraviesa con facilidad las membranas celulares de los eritrocitos donde es oxidado. En un 80 a 90 % es absorbido por el tracto respiratorio llegando hasta los pulmones, y se dirige al cerebro aquí es retenido y aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio lo cual causa neurotoxicidad. La mayor parte va al cerebro, hígado, riñón y se acumula en el epitelio de tiroides y páncreas. La exposición prolongada causa mercurialismo (Cano, 2001; Morales, Reyes, 2003).
Arsénico	El arsénico es absorbido por el tracto gastrointestinal en un 95 % y por la vía respiratoria depende del tamaño de las partículas inhaladas. Las partículas menores a 7 μm se absorben en un 75 a 85 %. El arsénico se une preferentemente a los grupos sulfhidrilo de las proteínas como la queratina, por lo que se deposita en el pelo y en las uñas, también se acumula en el hígado, riñón, pulmón y bazo. Ocasiona cáncer de piel, pulmón y vejiga (Castro, 2006; Albores, et al., 1997).
Cromo	El cromo III, presenta baja toxicidad por su estabilidad química y se enlaza a ligandos que contiene nitrógeno, oxígeno o radicales sulfuro formando complejos octaédricos su capacidad de absorción y penetración en las células es muy baja, además se excreta por la orina en una semana, sin embargo el cromo VI, es capaz de atravesar las membranas y permanecer en las células y tejidos durante años. El cromo es absorbido gracias a una proteína transportadora, que tiene acción sobre las reacciones celulares para mantener la homeostasis en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, y en la producción de energía. Presenta cierta influencia en el desarrollo de la diabetes mellitus y de la hipertensión arterial. Los órganos que almacena altas cantidades de cromo son el riñón, hígado, musculo, bazo, corazón, páncreas y hueso (Tejeda, et al., 2015; Gómez, Magaña, 2004).
Además, surgen en la fase de perforación los metales como: cobalto, hierro, manganeso, cobre y zinc, estos elementos son esenciales para las funciones vitales se absorbe rápidamente y se distribuye por todo el organismo; pero la exposición a	

altas concentraciones y durante mucho tiempo estos metales se acumulan en los tejidos, causando posibles efectos tóxicos como: diarrea, daño pancreático y anemia. Están caracterizados por poseer una vida media de 4 semanas y se excretan a través de la orina y las heces (Bravo, 2007; Rubio, 2005).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

La contaminación sonora por las detonaciones de explosivos que tiene lugar en zonas específicas, con el objetivo de crear temblores artificiales para la creación de pozos petroleros y el funcionamiento de las máquinas petroleras contaminan el medio ambiente.

La quema constante de materia y gas, acelera el proceso de calentamiento global, afectando a la biodiversidad y produce en el área un incremento de temperatura (Huertos, 2016; Bravo, 2007).

1.3 Contaminación hídrica

La contaminación del agua es provocada por el hombre, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, consumo animal y la vida natural, afectando la salud de cientos de personas que habitan en sitios cercanas a la industria petrolera. Esta situación amenaza el equilibrio de los organismos vivos, porque se altera la estabilidad natural, debido al deterioro del medio ambiente (Jadoon, et al., 2016).

La conservación del ecosistema es necesaria para que se lleve a cabo con normalidad el ciclo de vida, siendo el agua indispensable para la productividad de recursos naturales; por lo tanto, en la actualidad el agua es un sustento de vida y desarrollo económico (Girbau, 2002; Europa, 1968). El aumento de la actividad industrial, la explotación, transporte del petróleo y la eliminación inadecuada de los hidrocarburos provenientes de las refinerías han causado graves daños al ecosistema, debido al incrementado de la contaminación del agua; porque durante la biodegradación se consume el oxígeno del agua, cobrando la vida de muchos animales acuáticos que mueren por asfixia e intoxicación (Wang, et al., 2016).

Las fugas en buques o tanques de transporte, los equipos de perforación acuática y los accidentes en tierra firme conllevan a la contaminación hídrica. Durante el proceso de extracción se lleva a cabo la deforestación, debido a la construcción de las plataformas de perforación, campamentos, helipuertos, pozos, como también la construcción de carreteras y oleoductos (Huertos, 2016). La perforación también

genera desechos contaminantes, los cortes de perforación son de una mezcla heterogénea de rocas, compuestas de metales pesados, sustancias radioactivas u otros elementos que contaminan el agua (Bravo, 2007). Cuanto mayor es la profundidad que se perfora se genera mayor cantidad de desechos con alta toxicidad, durante la perforación se utiliza los lodos de perforación, que pueden ser en base a aceite o agua, que contienen una gran cantidad de aditivos químicos que se bombean al pozo para que actúe como lubricante y refrigerante, de esta manera el petróleo bruto pasa a una estación de limpieza, donde se extrae primero el metano y el gas licuado y así evitar que fluyan sin control hacia la superficie. Las capas subterráneas ricas en petróleo pueden encontrarse bajo las aguas de los mares o bajo las extensiones yermas de los desiertos y en algunas regiones cubiertas de espesas selvas tropicales (Fong, Ruiz, 2001).

El petróleo crudo se transporta desde los yacimientos hacia las refinerías por varios medios:

- ♣ Por vía terrestre: vagones-tanques del ferrocarril o camiones acoplados.
- ♣ Por vía marítima: buques petroleros, también llamados barcos cisternas o buques tanque, con bodegas de gran capacidad.
- ♣ Mecánicamente el crudo se transporta por oleoductos de 30-60 cm de diámetro con estaciones en el trayecto para bombearlo, calentándolo para disminuir su viscosidad (López, et al., 2009).

Durante el transporte del oleoducto, el medioambiente se enfrenta a constantes derrames de petróleo, afectando al medio acuático, flora y fauna acuática-terrestre. Las sustancias toxicas que contiene el crudo se acumula fácilmente y es de difícil degradación (Huertos, 2016; Duthu, Bradley, 2017).

1.4 Contaminación hídrica en la amazonia del Ecuador

La amazonia es una área de gran biodiversidad llena de recursos naturales, especialmente de hidrocarburos, los mismos que se han convertido en la fuente económica más importantes para el país, ya que son grandes los beneficios que se han obtenido a través de la industria petrolera (Jadoon, et al., 2016; San Sebastián, et al., 2004). Pero la intensa actividad, podría implicar daños en el ecosistema por el proceso de extracción de recursos naturales que conlleva a riesgo ambiental; y por ende a través de la cadena alimentaria, la salud de los habitantes de la zona se ve afectada (García, et al., 2004).

La contaminación hídrica en la amazonia del Ecuador proviene principalmente de los pozos abandonados de petróleo, según la Contraloría General del Estado (1964), fueron creadas 549 piscinas por la compañía petrolera Texaco, de la cuales 225 fueron incluidas en el Plan de Acción de Reparación Ambiental (1995); y solo 158 piscinas fueron remediadas haciéndose trabajos antiéticos, los cuales se detallan en la Tabla 2. (Perez, Silva, 2014).

Tabla 2. Se detallan las 158 piscinas que fueron remediadas haciéndose trabajos antiéticos por la compañía encargada.

Campo Petrolero	Reparación Ambiental	Campo Petrolero	Reparación Ambiental
Aguarico	5+ 1Derrame	Pin 1	1
Atacapi	2	Puma	1
Auca	6	Ron	2
Eno	3	Sacha	68 + 5 Derrames
Guanta	3+1 derrame	Shushifindi	61 +1 Derrame
Lago Agrio	3	Yuca	2
Parahuacu	1	Total	158+ 8 Derrames

Fuente: (Perez, Silva, 2014)

Elaborado: Autor

El cantón Shushufindi ubicado en la provincia de Sucumbíos al norte del oriente ecuatoriano, está afectado por los diferentes pozos abandonados, ya que solo el 69 % del daño ocasionado a estos campos petroleros fue remediado. Los demás pozos que no han sido eliminados o tratados permanecen en el ambiente cerca de las comunidades campesinas por muchos años. El pozo Aguarico 4, es uno de los pozos más grandes que genera mayor contaminación en esta área, debido a que cuenta con un diámetro de 50 por 100 metros y con una profundidad de 400 metros. En este pozo era arrojado el petróleo que provenía de 3 piscinas sin ninguna protección en el año de 1972 por la compañía de Texaco-Chevron; duro como 8 años produciendo petróleo y luego se secó. En el año 2000 se vuelve a retomar este pozo a cargo de Petro-Ecuador como inyector de agua de perforación (sales del subsuelo, agua, petróleo y gas), eliminándolas directamente en el río Aguarico (Aguirre, 2015). El deterioro del bosque húmedo tropical se debe a los pozos abandonados a la intemperie con

desechos de petróleo los mismos que generan contaminación en el campo petrolero Aguarico (Gráfico 2). También existen cientos de sitios contaminados por derrames del oleoducto como: ríos, lagunas, esteros, pantanos, y otras fuentes superficiales y subterráneas de agua que conjuntamente con la deforestación, erupción de suelo, aumentan el impacto ambiental. Además contaminaron el aire por la quema de gas (Gondecki, 2011; Fajardo, Heredia, 2009).

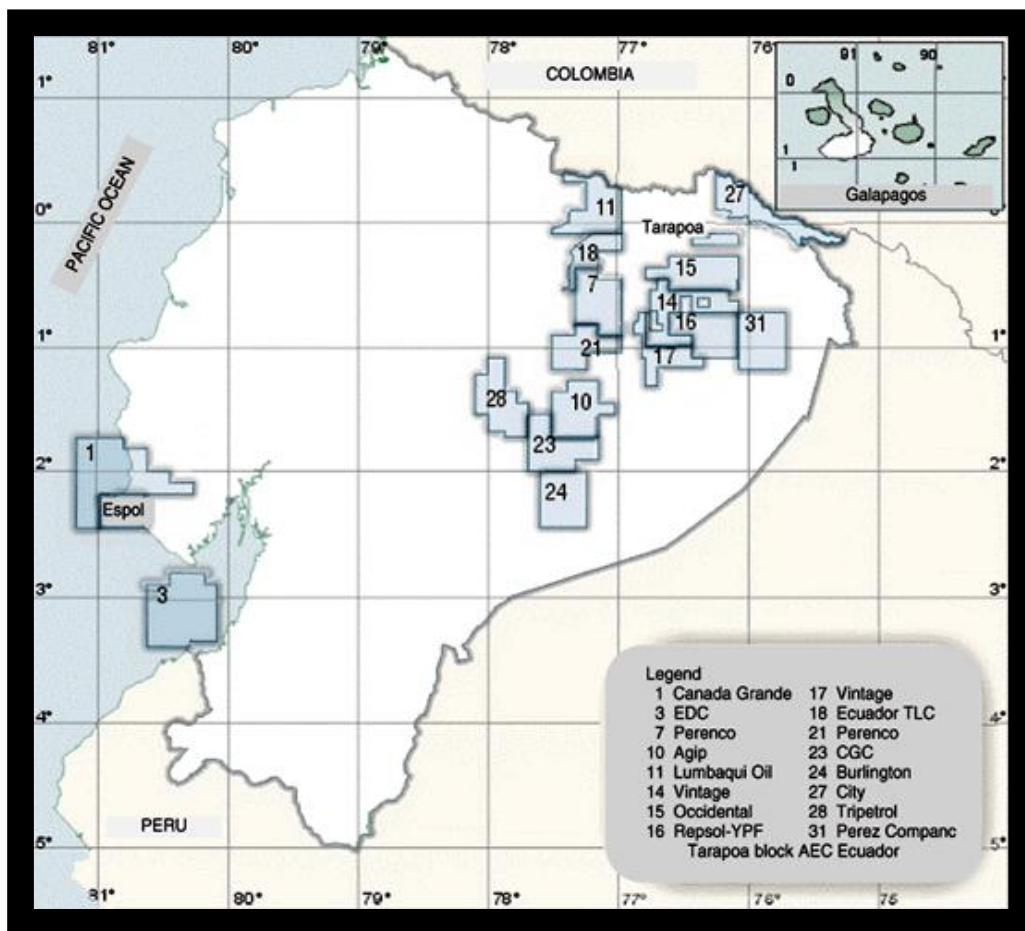


Gráfico 2. Yacimientos petroleros que existen en Ecuador, operados por compañías de Norteamérica y de Ecuador

Fuente: (San Sebastián, Hurtig, 2005)
Elaborado: Autor

1.5 Toxicidad de los hidrocarburos

La toxicidad de los hidrocarburos se da por la ingestión o inhalación directa ocasionando efectos tóxicos agudos o crónicos (Duruibe, et al., 2007). La mayoría de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) tienen una fuerte toxicidad, son carcinógenos, teratogénicos y mutágenos (Guo, Fang, 2012). Los HAPs, son metabolizados y pueden ser eliminados o excretados a través de la orina o heces si son moléculas polares, pero algunas moléculas se transforman en metabolitos muy reactivos que se unen al ADN siendo responsables de mutagenicidad y carcinogenicidad (Phillips, Arlt, 2009). En sectores afectados por la contaminación con HAPs se ha observado un aumento en la incidencia de cáncer en personas expuestas (Smith, 2010).

Los organismos se ven afectados por la acumulación de petróleo en pozos abandonados y en el fondo de los ríos, provocando efectos letales en animales y plantas vitales para el ecosistema, debido a que los compuestos tóxicos del petróleo no son solubles en el agua, los organismos acuáticos pueden sufrir taponamiento de las vías respiratorias y daños en el tracto respiratorio. La contaminación del suelo, el agua y el aire afectan a los seres humanos y animales, mediante la cadena alimenticia puede llegar a los organismos a través del consumo de animales, plantas y agua contaminada (Duruibe, et al., 2007). Los efectos graves que pueden causar los compuestos tóxicos que conforman el petróleo, son algunos tipos de enfermedades como cáncer, deformaciones, pérdida de la fertilidad en humanos y animales, en las aves se ve afectado el nivel de eclosión de huevos y la alteración en su comportamiento, derivado de la toxicidad de los HAPs (Apraiz, et al., 2009).

1.6 Distribución tóxica de los HAPs, en los organismos

Sobre el suelo, el petróleo derramado se adhiere y penetra de tal manera que permanece por más tiempo en el ambiente, afectando a las plantas, mediante la absorción de HAPs por las raíces; en la flora, el derrame de petróleo se adhiere a las hojas y tallos de las plantas impidiendo la respiración y fotosíntesis. El efecto tóxico en la fauna podría ocasionar que los animales manchados con petróleo mueran por intoxicación de estos hidrocarburos (Pérez, et al., 2016).

A través del aire, que constituye la principal fuente de contaminación atmosférica, la generación de gas afecta la vía inhalatoria a través de la respiración (Canario, 2014).

La exposición a las fuentes de agua contaminada afecta a la vida acuática y los organismos son más sensibles a la contaminación. El agua contaminada con HAPs al

ser consumida podría llegar a causar graves daños en el hombre, animales y plantas, al entrar en contacto con la piel, penetra los tejidos e irritar la piel, además ante la exposición a sus vapores puede producir náusea, vértigo, dolores de cabeza o mareos, pero el más destacable es el aumento de daño en el ADN (Apraiz, et al., 2009; Canario, 2014).

1.7 Efectos de los derrames de petróleo sobre el ambiente y la salud

Los hidrocarburos presentes en el agua contaminada con petróleo son tóxicos y presentan graves riesgos para el medio ambiente y la salud debido a que son absorbidos y distribuidos en el organismo incluso puede atravesar la barrera placentaria, causando daño en las células del feto, debido a que son compuestos genotóxicos, mutágenos o cancerígenos (Pérez, et al., 2016). Todas las actividades relacionadas con la industria petrolera son los principales contribuyentes a la contaminación y degradación ambiental. Los animales como peces, aves y mamíferos se ven afectados gravemente, incluso llegan a morir por la exposición e ingestión de petróleo crudo, agua salada, metales pesados y químicos, provocando intoxicación hasta llegar a causar infecciones en distintos órganos, cáncer, defectos en la reproducción e incluso la muerte (San Sebastián, et al., 2004). Se cree que el desastre petrolero en la amazonia ecuatoriana es 30 veces mayor en comparación a otros desastres provocados por las petroleras (Moriño, et al., 2008). La petrolera PEMEX, ubicada al sur del Golfo de México, actualmente genera el 82 % de la producción, y cerca de esta petrolera se encuentran industrias pesqueras que se ven afectadas por la extracción de petróleo, produciendo daños que repercuten el desarrollo normal de los animales marinos como; la reducción en el crecimiento, eclosión prematura o tardía y anomalías celulares (García, et al., 2004). Los efectos producidos son a largo plazo, ya que la degradación de hidrocarburos dura décadas, según un estudio de la organización ambiental Greenpeace, el derrame provocado por la petrolera Exxon Valdez en Alaska, durante el año de 1989, se enfrentó a este desastre ecológico y después de 10 años se demostró que los peces y mejillones que se distribuían cerca de este derrame todavía estaban expuestos a hidrocarburos residuales en el ambiente (Apraiz, et al., 2009; Moriño, et al., 2008).

Desde el inicio de la explotación petrolera, las poblaciones ubicadas en los campos petrolíferos han expresado su preocupación ante la contaminación. En la amazonia, debido a que la actividad petrolera en cada fase produce efectos adversos en el medio ambiente y en las poblaciones ya que los desechos tóxicos generados han sido

eliminados de manera inadecuada, afectan principalmente la vida acuática, también se registra habitualmente muerte de ganado por beber esta agua, y las personas cercanas a estas fuentes con frecuencia presenta una mayor tasa de mortalidad por cáncer (San Sebastian, et al., 2001). Los habitantes de comunidades expuestas a dosis altas podrían presentar efectos crónicos como: infecciones a la piel, picores, sarpullidos, irritación y dermatitis, pérdida de consciencia y depresión respiratoria (tos y dolor de garganta), también puede causar mal nutrición que conlleva al desarrollo de anemia aplásica y pancitopenia reversible, como también síntomas cardiovasculares, neuropatía y hepatotoxicidad (San Sebastian, et al., 2001; San Sebastián, Hurtig, 2005). A lo largo de la vida llegan a adquirir algún tipo de cáncer entre los más comunes que presentan los hombres son: cáncer de estómago, de pulmón, piel, hígado y leucemia; en las mujeres cáncer de útero, de estómago y leucemia se observó además un aumento en los cánceres hematopoyéticos en niños hasta producir la muerte (Botello, et al., 2005). La función endocrina se ve afectada por el bloqueo de la síntesis de sustancias química, causantes de efectos tóxicos con actividad mutágena y carcinogénica también están relacionados con anomalías reproductivas, infertilidad, reducción de la producción de espermatozoides y con frecuencia presentan abortos (Morcillo, et al., 2013; Serrano, Osornio, 2007).

1.8 Genotoxicidad

Genotoxicidad significa, “toxicidad en el genoma” (Paz, López, 2014). El efecto genotóxico de algunos factores o agentes se define como daño sobre el material genético humano inducido por potenciales tóxicos que pueden conducir a una transformación celular, siendo estos agentes los responsables de alteraciones genéticas como: cambios en el número de cromosomas, deleciones e inserciones, reordenamientos, mutaciones y amplificaciones de genes, ya que estos agentes actúan directamente sobre el ADN y ARN de células tanto somáticas como germinales; así mismo pueden ejercer acción nociva durante el desarrollo embrionario siendo un proceso irreversible (Paz, et al., 2001).

La mayoría de productos químicos propios del petróleo y originados durante la extracción como los HAPs han sido clasificados como genotóxicos por la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer (IARC). La exposición y las concentraciones altas a agentes tóxicos presentan una relación dosis-respuesta, dando inicio a los mecanismos de carcinogénesis (Phillips, Arlt, 2009; ATSDR, 1999).

Mediante pruebas de genotoxicidad se puede evaluar el estado de un organismo para evidenciar la existencia de una alteración en el ADN, además se puede identificar la

acción sea mutàgena o cancerígena y como consecuencia se ve alterada la tasa de división celular (Castro, et al., 2017).

1.9 Biomacadores

Los biomarcadores son huellas características que persisten a través del tiempo, generan información de gran importancia para investigaciones y monitorean el proceso de degradación de los organismos vivos, cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o indicador de la exposición a un agente tóxico, proporcionando una estrategia para la investigación y verificar la relación dosis-efecto (Gil, 2000; Arango, 2012).

Los xenobiótico son cualquier químico no sintetizado por el organismo afectado, bien sea natural o artificial, incluyendo tanto a los medicamentos como a los tóxicos ya que los xenobióticos pueden inhibir ciertas enzimas en su sitio de acción, bien sea de manera reversible o no reversible (Hernandez, 2010).

1.9.1 Biomarcadores de susceptibilidad

Es un indicador de la capacidad hereditaria o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia toxica o grupos tóxicos (Arango, 2012; Ramírez, 2006).

La toxicidad de los agentes xenobióticos ocasionan lesiones en el ADN de los cromosomas y es poco probable que la capacidad de reparación y susceptibilidad de un organismo pueda responder a los daños en el ADN y revertirlos (Martins, et al., 2016; Ramadass, et al., 2016).

1.9.2 Biomarcadores de efecto

Determinan la alteración bioquímica, fisiológica o genética producida en el organismo tras la exposición a un xenobiótico que puede estar asociada con una enfermedad (Gil, 2000). El efecto genotóxico de diversos contaminantes ambientales, ocasiona alteraciones bioquímicas, fisiológicas y riegos de inestabilidad genética ya que estos compuestos puede unirse con facilidad al ADN (Ramírez, 2006).

1.9.3 Biomarcadores de exposición

Evalúan la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico y una molécula o célula diana que, permite medir en la dosis interna mediante el análisis químico del compuesto tóxico o un

metabolito del mismo en fluidos biológicos como: orina, sangre y tejidos (Gil, 2000; Arango, 2012). El tiempo de exposición puede aumentar la concentración de un xenobiótico en el organismo y causar daños irreversibles en la salud, ya que no se degradan ni se destruyen pero se puede modificar con el metabolismo, pudiendo durar cientos de años (Arango, 2012; Ramírez, 2006).

1.9.4 Aplicaciones de los biomarcadores

Con lo expuesto anteriormente, los biomarcadores pueden tener las siguientes aplicaciones en el estudio de xenobióticos (Arango, 2012; Ramírez, 2006).

- ♣ Monitorizar los niveles de exposición a agentes causantes de enfermedades o de factores protectores.
- ♣ Determinar las consecuencias biológicas de la exposición a bajas concentraciones de diferentes materiales y los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico.
- ♣ Proporcionar información relacionada con el genotipo.
- ♣ Determinación de la respuesta a la exposición y susceptibilidad en individuos sensibles a diferentes sustancias químicas de una población.
- ♣ Diferenciación entre organismos expuestos y no expuestos (Venegas, 2009; Arango, 2012).

1.10 Ensayo cometa

Cada vez más las sustancias tóxicas se extienden en el medio ambiente provocando contaminación en los ecosistemas, así como el deterioro del aire, el agua y la calidad del suelo, poniendo en peligro la supervivencia de las especies en un hábitat y la presencia de enfermedades irreversibles en los seres humanos (Dhawan, et al., 2009). La contaminación del ambiente conlleva a diferentes mecanismos de toxicidad, daños al material genético, deleciones en células germinales o somáticas y los procesos metabólicos a través del ADN. Mediante el ensayo cometa se puede establecer el nivel de daño del ADN, es un indicador de la roturas de cadena de ADN y sitios lábiles alcalinos en células individuales, además es considerado como un biomarcador de exposición y susceptibilidad (Martínez, et al., 2013; Møller, et al., 2000). El ensayo cometa es útil para vigilancia medioambiental y la ecotoxicología genética, conocida por ser una herramienta sencilla, sensible, rápida y valiosa en la monitorización humana y en pruebas de genotoxicidad (Mitchellmore, Chipman, 1998; Martínez, et al., 2013). Permite identificar efectos adversos de la contaminación, evaluar el potencial genotóxico de los productos químicos generados durante los procesos de explotación

que afectan negativamente a diferentes tipos de organismos en exposiciones “*in vivo*” e “*in vitro*” de agua contaminada. Esto ha implicado roturas de cadena de ADN como indicador de la exposición a agentes tóxicos, de tal manera que proporciona información para prevenir o reducir los efectos nocivos (Dhawan, et al., 2009; Collins, 2014; Møller, et al., 2000).

1.10.1 Factores que influyen en el ensayo cometa

El ensayo cometa es un proceso delicado que requiere ser realizado en ambientes oscuros debido a que se usan reactivos como el bromuro de etidio (BrEt) y diacetato de fluoresceína (FDA) que son fotosensibles (Robinson, et al., 2017; Immunocor, 2016).

Para el proceso de desnaturalización de la muestra y electroforesis, es necesario que el buffer tenga un pH13 alcalino, así permite el desenrollamiento de las hebras de ADN e incrementa la sensibilidad en la detección del daño, identificándose las roturas de cadena doble y simple que resultan en fragmentos de ADN.

Las placas portaobjetos, en donde se montan las muestras, deben ser colocadas en una misma orientación en la cubeta de electroforesis, teniendo en cuenta que el ADN, al tener carga negativa, migra hacia el polo positivo.

En el proceso de neutralización y fijación de la muestra, los restos de detergentes son eliminados, ya que podrían interferir en el proceso de tinción y en la visualización.

La deshidratación con metanol permite guardar las placas antes de su recuento (Collins, 2004; Venegas, 2009).

1.10.2 Ventajas

El ensayo cometa provee ventajas en comparación a otras pruebas que evalúan el daño genotóxico. Se establece el nivel de daño del ADN en células individuales, se requiere pequeñas poblaciones de células, es un método de bajo costo, rápido y de mayor sensibilidad para detección y monitoreo de las rupturas de la cadena de ADN. En comparación con otras pruebas de citogenética clásica, provee información del daño en el ADN celular expuestos a bajas concentraciones del xenobiótico (Langie, et al., 2015; Collins, 2014; Gaivão, Sierra, 2014). Además es posible evaluar el daño en células no proliferativas, en comparación a otras técnicas que si lo requieren (Vergara, 2010).

1.10.3 Desventajas

Aunque el ensayo cometa presenta grandes beneficios para la investigación, puede estar asociado a varias limitaciones, ya sea por las muestras, reactivas que se usan o el protocolo en general. Durante la lisis de la muestra y la electroforesis se pierden pequeños fragmentos de ADN y no son evaluados. En la preparación de los reactivos se debe tener un control continuo, pues cualquier alteración en la concentración, el estado de distintas soluciones de trabajo, el pH, la temperatura, y los tiempos de cada paso, puede afectar radicalmente los resultados ya que es una prueba de alta sensibilidad. Otra de las desventajas es la imposibilidad de detectar el efecto que causan los agentes aneugénicos, que participan en el proceso de carcinogénesis. Además, la falla en la detección del daño en el ADN mitocondrial, es una técnica sensible que está ligada al ensayo de viabilidad y es necesario hacerlo por repeticiones (Fang, et al., 2015). La falta de estandarización de los resultados no permiten la comparación entre los diferentes laboratorios ya que muchos investigadores proponen constantemente nuevas formas de valoración de los datos obtenidos en los estudios (Vergara, 2010).

1.10.4 Aplicaciones

Se puede establecer mediante el ensayo cometa el daño en el ADN. Además es caracterizado por ser un biomarcador de exposición y susceptibilidad (Morcillo, et al., 2013).

- ♣ Evaluación del daño a nivel genético en especies que viven en ambientes contaminados, siendo la técnica más empleada por ser económica, rápida en analizar exposiciones medio ambientales y ocupacionales de poblaciones humanas.
- ♣ Se han realizado estudios del impacto genotóxico por productos químicos en modelos biológicos, tanto "*in vivo*" e "*in vitro*" como: las lombrices de tierra que viven en ambientes contaminados y que son útiles para los estudios ecotoxicológicos. En medios acuáticos son usados como modelo biológico distintas especies de peces para la evaluación de aguas de ríos contaminadas. Los mamíferos silvestres, son una buena elección en estudios de ecosistemas marinos y terrestres ya que asimilan contaminantes a lo largo del tiempo.
- ♣ Se puede aplicar en estudios farmacológicos, es útil para la evaluación de nuevas drogas, mostrando un alto grado de valor predictivo de los productos químicos para evaluar la seguridad de los agentes y el potencial genotóxico.

- ♣ A nivel clínico, los mecanismos de acción de los tratamientos oncológicos y el proceso de evolución de los tumores, tanto “*in vivo*” e “*in vitro*” utilizados para la regulación de nuevos fármacos, así como, la evaluación de la capacidad de reparación y defensa frente a la susceptibilidad de un agente xenobiótico.
- ♣ En la biomonitorización se usa para evaluar el riesgo del habita expuesta a contaminantes presentes en el ecosistema que los rodea (Vergara, 2010; Ansoar, et al., 2015; Venegas, 2009).

1.11 Viabilidad celular

La viabilidad celular se debe a diferentes parámetros como: la integridad de la membrana de la célula y el estado fisiológico ya que se basa en la capacidad que tienen las células para excluir sustancias impermeables (Engel, 2016). El uso simultaneo de la coloración con diacetato de fluoresceína (FDA) y el bromuro de etidio (BrEt), ayuda a diferenciar las células vivas de las células muertas después de la exposición a un agente tóxico mediante de un proceso “*in vitro*” donde se produce un aumento incontrolado de la permeabilidad de la membrana lo cual influye en la proliferación celular y supervivencia (Robinson, et al., 2017). Las modificaciones producidas en la estructura de la membrana celular permiten determinar y cuantificar la proporción de células que, después del tratamiento aplicado, se mantienen intactas. Gracias a estos ensayos se puede evaluar compuestos citotóxicos o genotóxico (Barrett, et al., 2017).

1.12 Modelo biológico

Los linfocitos pueden revelar niveles altos de genotoxicidad del daño en el ADN asociados a la contaminación hídrica residual, ya que son fáciles de obtener, están en contacto con compuestos tóxicos, son sensibles para evaluar daño genético, son células de memoria ya que podrían guardar información de exposiciones ocurridas en el pasado (Venegas, 2009).

1.13 Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico que pueda presentar el agua contaminada con hidrocarburos.

1.13.1 objetivo específico

- ♣ Establecer el efecto citotóxico del agua contaminada obtenida del pozo 4 ubicado en Aguarico Shushufindi- Ecuador, mediante el ensayo de FDA/BrEt.
- ♣ Determinar el posible efecto genotóxico en los linfocitos humanos, en función al largo de cola (migración del ADN) tratadas "*in vitro*" mediante el ensayo cometa.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material de estudio

Agua contaminada posiblemente con hidrocarburos debido a que pertenece al pozo petrolero Aguarico ubicado en Shushufindi en la amazonia de Ecuador, la misma que fue recolectada por la Mgtr. María Isabel Ramírez, docente de la UTPL. Se planteó exponer linfocitos humanos a 5 diferentes concentraciones, detalladas en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de agua contaminada con HAPs.

Concentraciones	Volúmenes de tratamientos	Medio RPMI suplementado
2 %	400 µL	600 µL
1,5 %	300 µL	700 µL
1 %	200 µL	800 µL
0,5 %	100 µL	900 µL
0,1 %	20 µL	980 µL
Control positivo (EMS) (250µM)	2,5 µL	997 µL
Control negativo	=	1000 µL

Fuente: Autor
Elaborado: Autor

2.2. Cultivo de linfocitos humano

2.2.1 Siembra

Las muestras para el ensayo fueron obtenidas de tres donantes sanos, que no se encontraban medicados y que no presentaban hábitos de fumar ni de ingerir bebidas alcohólicas ya que esto podría alterar los resultados. La extracción de la sangre se hizo en tubos de heparina.

Las células linfocitarias fueron cultivadas en medio RPMI (GIBCO), suplementado con 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1% de antibiótico antimicótico (GIBCO). Se aplicó tratamiento con agua posiblemente contaminada con HAPs. Para el control positivo se utilizó Etilmetanosulfonato (EMS) (SIGMA) a la concentración de 250 μ M y como control negativo se utilizó medio RPMI suplementado.

Se incubo por 3 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5 % de CO₂.

Después de las 3 horas de incubación, las muestras fueron centrifugados durante 2 minutos a 4°C: a 10000 rpm. Para continuar con el proceso de cosecha y viabilidad celular.

2.2.2 Viabilidad celular (FDA/ BrEt)

De cada uno de las muestras centrifugadas retiramos el sobrenadante, del pellet se tomó 20 μ L y pasamos a un tubo de 1,5 mL para realizar viabilidad celular. Luego se mezcló con 20 μ L de la solución de trabajo que contiene FDA/BrEt: 600 μ L PBS (8 g NaCl, 0.20 g KCl, 0.20 g Fosfato monopotásico, 1.14 g Fosfato disodico y pH 6.8 – 7.2) con 25 μ L BrEt (SIGMA) y 3,75 μ L FDA (SIGMA), se homogenizo. De esta mezcla se tomó 20 μ L y se colocó en un portaobjetos, se observó con el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con un filtro de 450 - 490 nm de excitación y 515 nm de emisión. Finalmente se contaron 200 células utilizando el objetivo 40X, observándose de color verde las células vivas y de color rojo las células muertas (Gráfico 3).

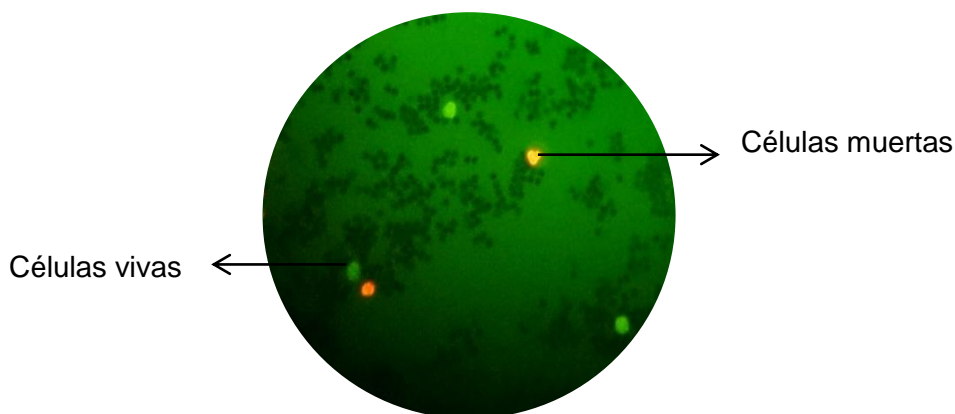


Gráfico 3. Ensayo de viabilidad por FDA/ BrEt.

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

2.2.3 Ensayo cometa

Antes de realizar el ensayo, se prepararon los portaobjetos para la lectura con 150 μ L de agarosa de normal punto de fusión 1% (INVITROGEN).

2.2.3.1 Cosecha

Se añadió al pellet 500 μ L de medio RPMI suplementado. Homogenizamos 35 veces y centrifugamos durante 2 minutos a 4°C: a 10000 rpm. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se mezcló con 150 μ L de agarosa de bajo punto de fusión 1% (Sigma), de esta mezcla se tomó 75 μ L y se colocó en los portaobjetos previamente preparados se cubrió inmediatamente con un cubreobjetos y se las llevó a refrigeración durante 5 minutos, posteriormente se retiró los cubreobjetos, se adicionó 130 μ L de agarosa de bajo punto de fusión, nuevamente colocamos inmediatamente un cubreobjetos y refrigeramos por 10 minutos, transcurrido el tiempo se retiró los cubreobjetos. Seguidamente se introdujo las placas en la solución de lisis: 10 % de DMSO (SIGMA), 1 % tritón X-100 (SIGMA), 2.5 M NaCl (MERCK), 100 mM EDTA (INVITROGEN), 10 mM Tris (INVITROGEN) y pH 10, protegidas de la luz y a 4°C, por un lapso de mínimo 1 hora hasta máximo 15 días.

2.2.4 Electroforesis

Antes de comenzar la corrida electroforética las muestras fueron sumergidas durante 20 minutos en el buffer de electroforesis: 300 mM NaOH (MERCK), 1 mM EDTA (INVITROGEN) y pH 13, en condiciones de 25 V, 300 mA y 20 minutos. Terminada la corrida electroforética se lavaron las placas sucesivamente con el buffer de

neutralización (9.7 g Tris y pH 7.5) (INVITROGEN) y se las deshidrato con metanol frío para su posterior análisis.

Para observar el daño en el ADN, las muestras se hidrataron con agua desionizada fría y se tiñó con 60 µL de BrEt (30 µg/ml). Para el análisis tomamos en cuenta los resultados de la longitud de cola de los cometas, que se observó con ayuda del microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con el objetivo 40X y un filtro de 510-560 nm de excitación y 590 nm de emisión. Finalmente se contaron 100 cometas por placa y en una computadora con el Software Comet Assay IV.

2.2.5 Análisis estadístico

2.2.5.1 Viabilidad por FDA/BrE

Para determinar si existió diferencia significativa entre diferentes concentraciones de agua contaminada con HAPs y el control negativo se utilizó el software estadístico GraphPad Prism 5, aplicando el test paramétrico ANOVA y el test de Tukey para determinar diferencias entre cada concentración.

2.2.5.2 Ensayo del Cometa

El análisis de los resultados se realizó así mismo con la ayuda del software GraphPad Prism 5. El efecto que ocasiona las diferentes concentraciones de agua contaminada con HAPs sobre los linfocitos se evaluó mediante el parámetro de longitud de cola de cada cometa. Para evaluar si los datos tienen distribución normal se empleó el test de Shapiro Wilk y para comprar entre las columnas de las 5 concentraciones aplicadas (0,1 %; 1,5 %; 1 %; 1,5 % y 2 %) utilizamos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el pos test de Dunnett para comparar entre las diversas dosis versus el control negativo.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Viabilidad celular por FDA/Br Et

En la viabilidad los linfocitos expuestos a las diferentes concentraciones de agua contaminada por hidrocarburos durante tres horas, se observó que en los tratamientos aplicados de 1 %; 1,5 % y 2 %; existe diferencia significativa en comparación con el control negativo; además, presentan un alto porcentaje de viabilidad, mayor al 70 % lo cual es importante para estudios de genotoxicidad o identificación del daño celular y así evitar en el análisis errores por muerte celular que podrían dar falsos positivos. En los controles negativos no se manifestaron ningún efecto y presentaron un porcentaje de viabilidad del 99 %. En el control positivo (EMS) se observó un porcentaje de viabilidad del 90 %, en comparación con el control negativo, se observó una disminución de la viabilidad, ya que es considerado un agente potencialmente tóxico

utilizado en prueba genéticas en mamíferos. Mediante el análisis estadístico "test ANOVA" se observó que a estas concentraciones se disminuye la viabilidad en comparación con los demás tratamientos aplicados. En el Gráfico 4 podemos observar la media de los tres experimentos realizados a las muestras de tres donantes sanos, que no se encuentran medicados y que no presentan hábitos de fumar ni de ingerir bebidas alcohólicas ya que esto podría alterar los resultados.

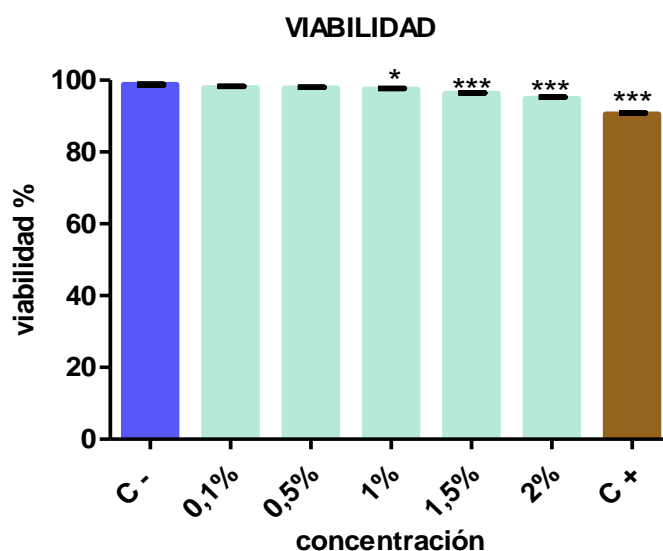


Gráfico 4. Porcentajes de viabilidad de linfocitos de tres donantes, expuestos por un periodo de 3 horas a las dosis de 0,1 %; 0,5 %; 1 %; 1,5 % y 2 % de agua contaminada con HAPs. En el análisis estadístico se observa que a partir de la dosis de 1 %, existe diferencia significativa comparada con el control negativo. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado de tres donantes e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$, *: $p < 0.05$). **Fuente:** Autor

Elaborado: Autor

3.1.1 Viabilidad del donante I expuesto a agua contaminada con HAPs

En el Gráfico 5 se puede observar la viabilidad de los linfocitos expuestos al agua contaminada con HAPs la misma que demostró mediante el análisis estadístico que no existe diferencia significativa en comparación al control negativo.

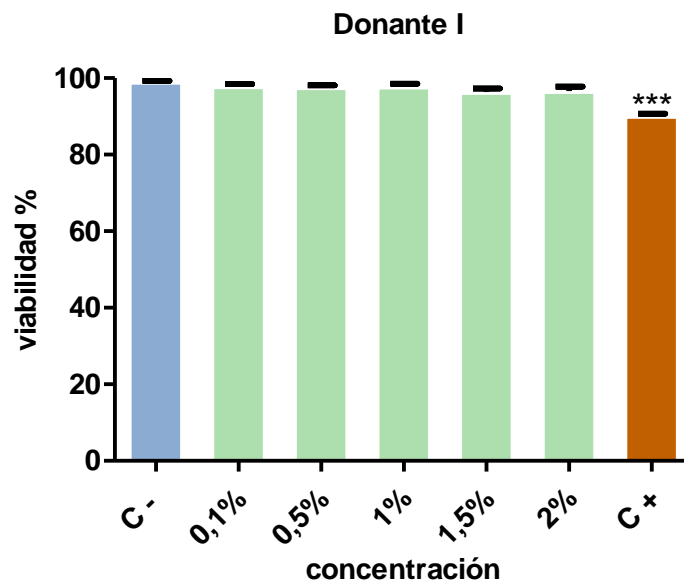


Gráfico 5. Viabilidad por FDA/BrEt, en linfocitos humanos, obtenidos de tres experimentos del donante I. En el control positivo se utilizó Etilmetanosulfonato (EMS) a 250 μ M. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

3.1.2 Viabilidad del donante II expuesto a agua contaminada con HAPs

En este Gráfico 6 se puede apreciar la viabilidad de los linfocitos del donante II, expuestos a agua contaminada con HAPs Mediante el análisis estadístico indica que

existe diferencia significativa a partir de las dosis 1,5 % y 2 % frente al control negativo.

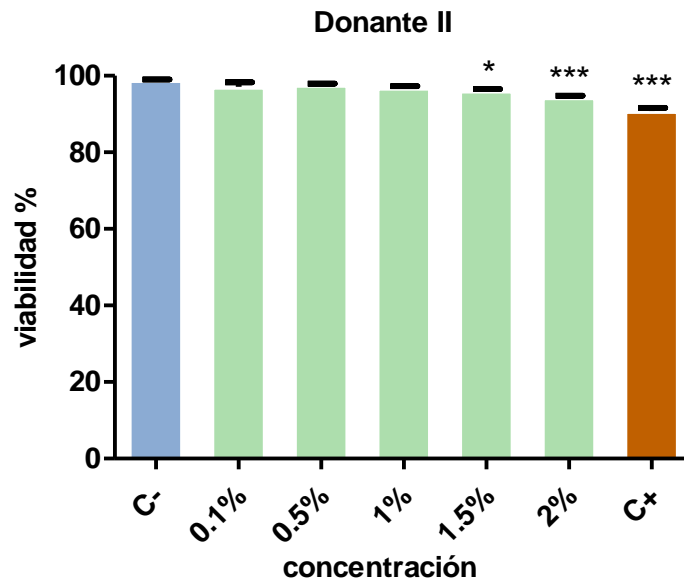


Gráfico 6. Viabilidad por FDA/BrEt, en linfocitos humanos, obtenidos de tres experimentos del donante II. En el control positivo se utilizó Etilmetanosulfonato (EMS) a 250 μ M. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$, *: $p < 0.05$).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

3.1.2 Viabilidad del donante III expuesto a agua contaminada con HAPs

En el Gráfico 7 se puede apreciar la viabilidad de los linfocitos del donante III expuestos a agua contaminada con HAPs, que demostró mediante el análisis estadístico que existe diferencia significativa a partir de las dosis 1,5 % y 2 %, frente al control negativo.

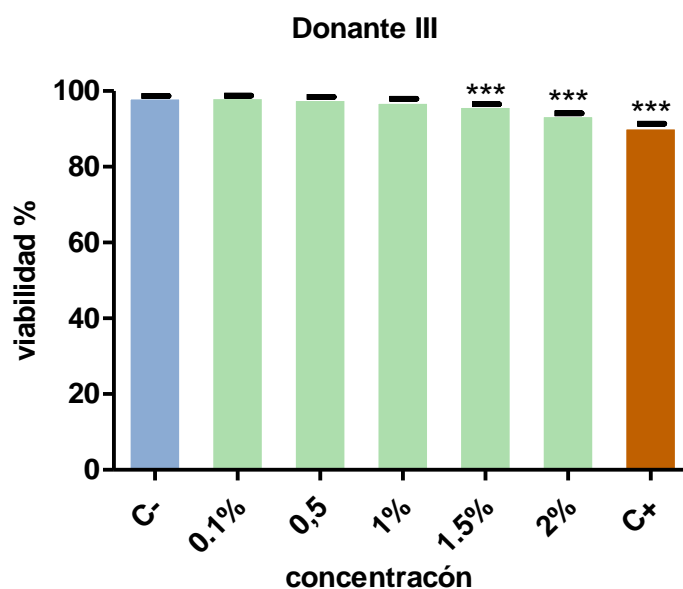


Gráfico 7. Viabilidad por FDA/BrEt, en linfocitos humanos, obtenidos de tres experimentos del donante III. En el control positivo se utilizó Etilmetanosulfonato (EMS) a 250 μ M. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

3.2 Efecto genotóxico mediante ensayo cometa

Los linfocitos expuestos al agua contaminada con HAPs, se evaluaron mediante el análisis estadístico de la longitud de cola del cometa en la cual determinamos daño genotóxico en el ADN de los linfocitos. En el Gráfico 8 podemos observar la media de la longitud de cola de tres ensayos realizados a tres donantes. En comparación con el control negativo y las 5 dosis de los tratamientos aplicados, observamos que existe diferencia significativa, incluyendo el control positivo. Por lo tanto, conforme aumenta la concentración del agua contaminada con HAPs, la actividad genotóxica también aumenta, observándose una relación de dosis - respuesta.

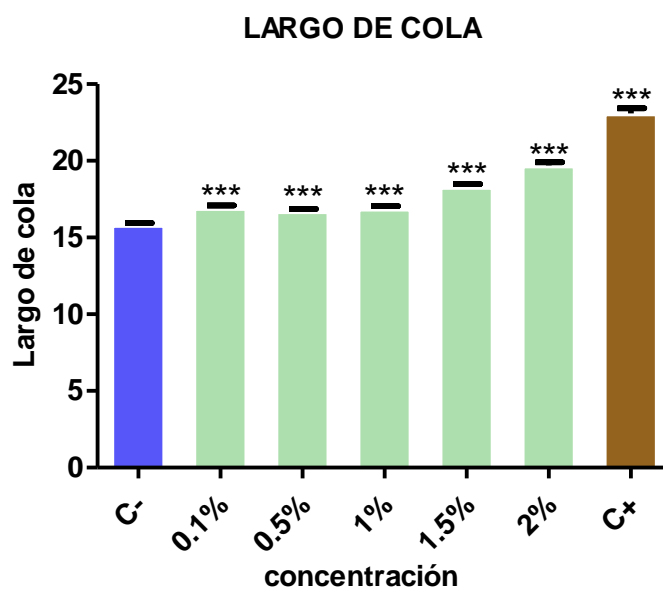


Gráfico 8. Efecto de genotoxicidad que provoca el agua contaminada con HAPs, en los linfocitos de los tres donantes. Mediante el ensayo cometa se evalúa el largo de cola. En el análisis estadístico se demuestra que hay diferencia significativa en todas las concentraciones con respecto al control negativo. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado, de los tres donantes e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

3.2.1 Lago de cola del donante I expuesto a agua contaminada con HAPs

Como podemos observar en el Gráfico 9, el análisis estadístico del parámetro longitud de cola indicó que las células linfocitarias a las dosis de 0,1 %; 1 % y 1,5 % tienen diferencia significativa con respecto al control negativo, así mismo, se observó que no está en forma de dosis - respuesta.

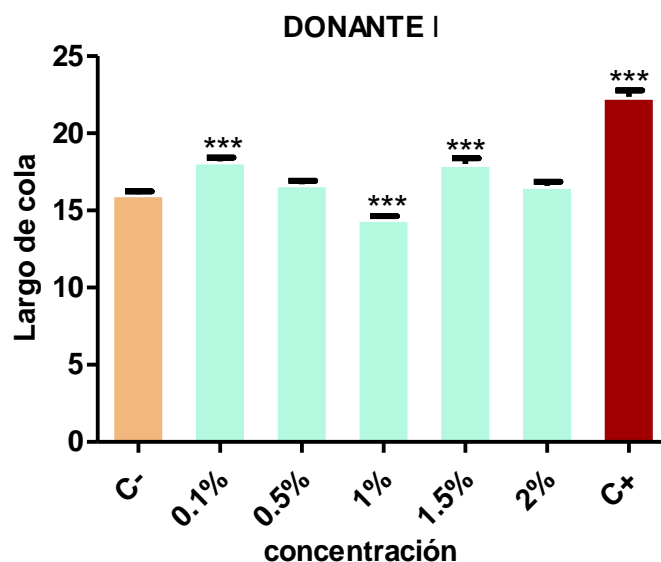


Gráfico 9. Longitud de cola de los linfocitos expuestos a 5 concentraciones diferentes de agua contaminada con HAPs durante tres horas. El control positivo: Etilmetanosulfonato (EMS) a 250 μ M. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

3.2.2 Lago de cola del donante II expuesto a agua contaminada con HAPs

En el Gráfico 10 se observa como incrementa la longitud de cola de los linfocitos expuestos al agua contaminada con HAPs en forma dosis - respuesta. Mediante el análisis estadístico se demostró que existe diferencia significativa en las concentraciones 1 %; 1,5 % y 2 % frente al control negativo.

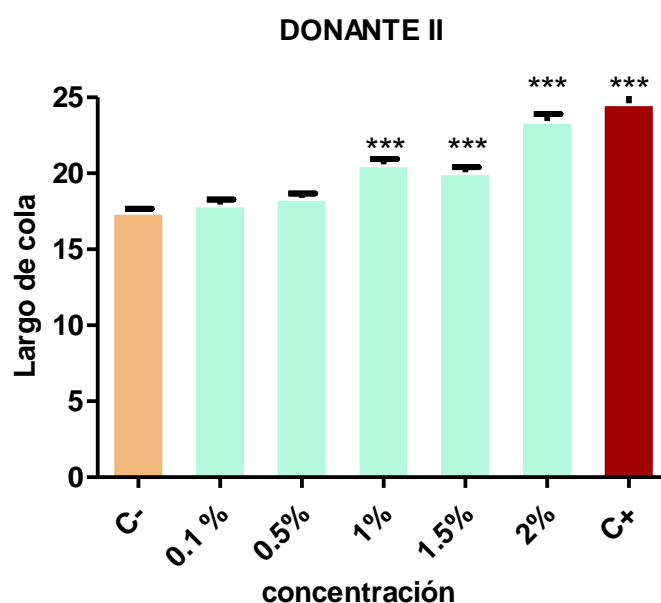


Gráfico 10. Longitud de cola de los linfocitos expuestos a 5 concentraciones diferentes de agua contaminada con HAPs durante tres horas. El control positivo: Etilmetanosulfonato (EMS) a 250 μ M. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

3.2.3 Lago de cola del donante III expuesto a agua contaminada con HAPs

En el Gráfico 11 se observa el incremento de la longitud de cola de los linfocitos expuestos al agua contaminada con HAPs en forma dosis - respuesta. Mediante el análisis estadístico se determinó diferencia significativa en las concentraciones 1 %; 1, 5 % y 2 % frente al control negativo.

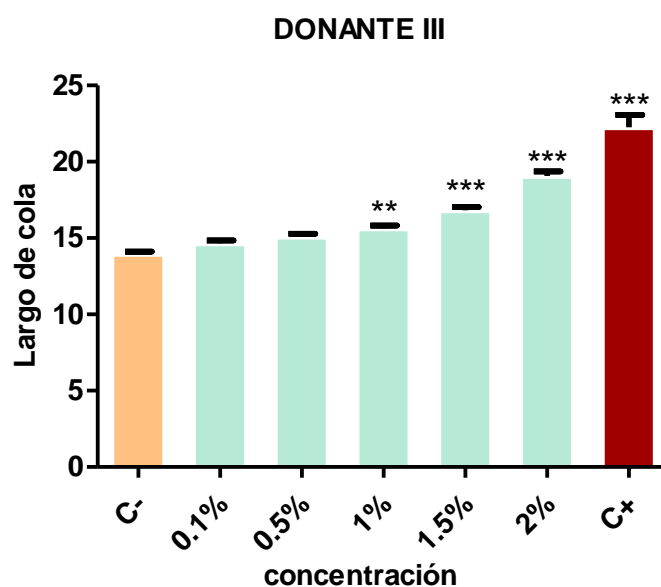


Gráfico 11. Longitud de cola de los linfocitos expuestos a 5 concentraciones diferentes de agua contaminada con HAPs durante tres horas. El control positivo: Etilmetanosulfonato (EMS) a 250 μ M. Cada barra representa la media de tres experimentos, cada uno por duplicado e indican la desviación típica; \pm EE (***: $p < 0.0001$, **: $p < 0.001$).

Fuente: Autor

Elaborado: Autor

CAPITULO IV
DISCUSIÓN

La amazonia del Ecuador se ha visto afectada debido a la explotación petrolera, en este proceso se han generado desechos tóxicos que son eliminados directamente en el medio ambiente causando un enorme daño, tanto al ecosistema como a la salud de los habitantes observándose algunas enfermedades relacionadas a la exposición de hidrocarburos (Leifsen, 2017). En 1999, el Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria Manuel Amunárriz, analizó el agua de las corrientes fluviales de la localidad de Sucumbios y Orellana demostrando la presencia de altas concentraciones de hidrocarburos derivados del petróleo (San Sebastián, et al., 2004; San Sebastián, Hurtig, 2005). De tal manera que, en el análisis “*in vitro*” del agua contaminada con hidrocarburos realizado mediante el estudio de citotoxicidad por FDA/BrEt para determinar la proporción de células viables expuestas a tratamientos de agua contaminada posiblemente con HAPs, se observó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes más altos de los tratamientos versus el control negativo, siendo las concentraciones de 1 %; 1,5 % y 2 % que revelan una disminución en la viabilidad lo cual se atribuye a los contaminantes presentes en la muestra agua. El porcentaje mínimo de viabilidad aceptado para cultivos celulares es 70 %, los valores menores mostraría citotoxicidad (Freshney, 2005). Las células del control negativo mostraron una viabilidad del 99 % lo cual se encuentra dentro del porcentaje aceptado para cultivos celulares. En el control positivo con Etilmetanosulfonato (EMS) a una concentración de 250 μM se observó un porcentaje del 90 % de células vivas debido a que este compuesto tiene la capacidad de causar daño en el ADN y es considerado como un agente mutágeno o clastogénico que induce varios tipos de alteraciones genéticas (Paz, López, 2014).

La explotación y extracción de los hidrocarburos del petróleo son un problema grave que afecta a todos los seres vivos debido a que cada vez incrementa más la contaminación ambiental por lo tanto es muy fácil que los compuestos químicos e hidrocarburos más pesados contaminen repetitivamente las fuentes de agua, afecten la flora y la fauna por las concentraciones subterráneas de los pozos mal remediados y el potencial tóxico de los pozos abandonados (Suárez, et al., 2013). Estudios epidemiológicos realizados indican que los HAPs presentes en el agua tienen efectos carcinogénicos en los habitantes cercanos a los pozos petroleros (Delin, Herkelrath, 2017). Las mujeres que viven en comunidades rurales rodeadas de pozos petroleros en la amazonia del Ecuador, presentaron síntomas que coinciden con los síntomas de toxicidad causados por el petróleo como: los problemas de piel, irritación de las vías respiratorias, dolor en ojos y oídos, diarrea, gastritis, frecuentes abortos y algunos

tipos de cáncer (San Sebastian, et al., 2001; San Sebastián, et al., 2004; San Sebastián, Hurtig, 2005).

El ensayo cometa es considerado un biomarcador de exposición y susceptibilidad que resulta una herramienta útil para la identificación de riesgo a la salud humana y para poder desarrollar medidas de prevención y control. En nuestro estudio pudimos determinar la exposición a la contaminación ambiental y la susceptibilidad para responder a una sustancia tóxica (Menon, et al., 2017; Gueguen, et al., 2006).

Mediante el ensayo cometa pudimos evaluar el efecto genotóxico que ocasiona el agua contaminada posiblemente con HAPs, extraída del pozo 4 Aguatico ubicado al nororiente del Ecuador. Los linfocitos expuestos a diferentes tratamientos manifestaron un efecto genotóxico como podemos ver en el Gráfico 8, la media de la longitud de cola de los tres ensayos realizados a tres donantes, en el cual se puede identificar la diferencia significativa entre los tratamientos aplicados frente al control negativo observándose una relación dosis-respuesta. Actualmente la mayoría de estudios menciona que la exposición y las diferentes concentraciones de HAPs en el agua, pueden ser factor de incremento en la incidencia de cáncer y han sugerido que el daño oxidativo en el ADN aumenta el mecanismo carcinogénico (Yang, et al., 2017), debido a que la carga tóxica puede conducir a la inhibición de la expresión de las enzimas que actúan durante el mecanismo de desintoxicación, observándose una relación de dosis-respuesta (Kolarević, et al., 2016; Bianchi, et al., 2017). Así mismo se ha evidenciado que el sistema de respuesta es distinto para cada ser humano, las exposiciones a agentes tóxicos, están influenciadas por polimorfismos genéticos en los genes de susceptibilidad como es el citocromo (P-450 CYP) que actúa en la oxidación, reducción e hidrolisis y las enzimas Glutación –S transferasas (GST) que catalizan reacciones de conjugación mediante la biotransformación de sustancias xenobióticas que se da durante la fase I y fase II y puede dar como resultado moléculas muy tóxicas o inactivas polares que son eliminadas por la orina o la bilis y si estas moléculas no son eliminadas podrían causar daños en el ADN. En nuestro trabajo se pudo observar la variabilidad de susceptibilidad en cada uno de los donantes (Liska, 1998; Gueguen, et al., 2006). Es así que en los resultados mostrados por el donante I se evidencia un efecto variable, lo cual indica que el daño celular posiblemente producido por los hidrocarburos en las células linfocitarias tratadas “*in vitro*”, se puede deber a una inactividad o polimorfismo en el sistema enzimático de metabolización de compuestos extraños ya que el daño que se produjo en el ADN es variable. Por otra parte se ha manifestado que no todos los individuos pueden reaccionar de la misma forma frente a una posible exposición, ya que se ha demostrado que diversos factores como los genéticos y epigenéticos pueden influir sobre las actividades de las enzimas

encargadas de metabolizar los xenobióticos, factores como: la edad, el sexo, el estado de salud, inmunidad, nutrición y los hábitos de cada persona son otros componentes importantes al momento de considerar la respuesta frente a la posible exposición a xenobiotocos como los hidrocarburos y como resultado se observe un efecto sobre la salud (Strolin, et al., 2006).

Al analizar los resultados de los donantes II y III, se observó un daño genotóxico a partir de la dosis de 1 %; nuestro resultado comparado con estudios realizados a trabajadores de la industria petroquímica y asistentes de servicio de gasolina en Tailandia se observó, que la capacidad de reparación del ADN es significativamente inferior en los participantes en comparación con los controles (Chanvaivit, et al., 2007). De tal manera, que la expresión de las enzimas que actúan en el mecanismo de desintoxicación de las células expuesta a altas concentraciones de hidrocarburos disminuyen y esto conllevaría a una predisposición a desarrollar enfermedades como el cáncer (Gueguen, et al., 2006).

En varios estudios se menciona que los efectos nocivos de la explotación petrolera en la salud humana son los responsable de las enfermedades que presentan los habitantes cercanos a los pozos petroleros y trabajadores de las industrias petroleras (Laffon, et al., 2006; Simonsen, et al., 2010; Gottlieb, 1980).

Además, las hipótesis mundiales sugieren que mientras mayor sea la exposición a los contaminantes atmosféricos, mayormente se genera estrés oxidativo en las células. Pero cada organismo puede verse afectado de diferente manera debido a que el sistema de respuesta es distinto (Serrano, Osornio, 2007; Smith, 2010).

CONCLUSIONES

El impacto ambiental por la industria petrolera ha afectado el hábitat de la Amazonia del Ecuador, debido a la mala eliminación de residuos de petróleo lo cual, se debería evitar al máximo para conservar la vida. El daño ocasionado al medio ambiente y a la salud es irremediable. Mediante el ensayo cometa pudimos evaluar el largo de cola de los linfocitos afectados por la presencia de hidrocarburos en el agua. Los resultados obtenidos nos revelan que cada persona presenta un sistema de respuesta distinto en donde la expresión genética de las enzimas desintoxicación de cada uno de los donantes actúa de forma distinta frente al agua contaminada con HAPs. A medida que aumenta las dosis de tratamiento aplicado aumenta el daño en el ADN. La exposición frecuente a estos factores a largo plazo puede afectar la salud ocasionando principalmente cáncer y la asociación a otras enfermedades. Además, se debería plantear estrategias de concientización en las zonas afectadas para que los habitantes tomen precaución del agua que consumen debido a que no es apta para la sobrevivencia, la misma que es consumida por el organismo y causa daños irremediables en los seres vivos.

RECOMENDACIONES

Las estrategias de concientización y el cumplimiento de los reglamentos para proteger el medio ambiente y por ende la salud, se deberían cumplir para evitar efectos graves en las poblaciones del oriente amazónico que viven cerca de industrias petroquímicas.

Establecer un plan conjunto y adecuado entre las autoridades, las compañías petroleras y los habitantes que permita la eliminación de la contaminación.

Debido a las altas tasas de mortalidad por cáncer y otras enfermedades asociadas se debiera dar a conocer los factores de riesgo con el fin de establecer programas de prevención.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, C. (2015). Consecuencias del rol de la corporación petrolera nacional de China (CNPC) en el desarrollo socio ambiental de los territorios Waorani y Zápara del Ecuador.
- Ansoar, Y., Fontanetti, C. S., Christofolletti, C. A., & Díaz-Illera, C. (2015). Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica, *46*(1), 51–62.
- Apraiz, I., Leoni, G., Lindenstrand, D., Persson, J.-O., & Cristobal, S. (2009). Proteomic Analysis of Mussels Exposed to Fresh and Weathered Prestige's Oil. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, *2*(6), 255–261. <http://doi.org/10.4172/jpb.1000084>
- Arango, S. e. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, *30*, 75–82.
- Ayala, M. C., Hernandez, Y. G., Piñeiro, J. C. G., & Gonzalez, E. P. (2004). Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta en células sanguíneas humanas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, *23*(3), 277–284.
- Bao, J., & Bergman, C. J. (2004). *Starch in Food*. *Starch in Food*. Elsevier. <http://doi.org/10.1533/9781855739093.2.258>
- Barrett, D. W., Kethees, A., Thrasivoulou, C., Mata, A., Virasami, A., Sebire, N. J., ... Chowdhury, T. T. (2017). Trauma induces overexpression of Cx43 in human fetal membrane defects. *Prenatal Diagnosis*. <http://doi.org/10.1002/pd.5104>
- Botello, a. V., Rendón, J. V. O., Agraz-Hernández, C., & Gold-Bouchot, C. (2005). *Golfo de México, Contaminación e Impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México Instituto Nacional de Ecología. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.3616.4962>
- Bravo, E. (2007). Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. *Fronteras Comunes Y Asociación Ecológica Santo Tomás*, 1–36. Retrieved from www.mexicotoxico.org
- Burger, M., & Román, D. P. (2010). Plomo salud y ambiente: experiencia en Uruguay. *Plomo Salud Y Ambiente: Experiencia ...*, 1–248.
- Cano, S. E. (2001). Toxicología del mercurio. actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. *Jornada Internacional Sobre El Impacto Ambiental Del Mercurio Utilizado Por La Minería Aurífera Artesanal En Iberoamérica*, 1–66. Retrieved from <http://www.gama-peru.org/jornada-hg/espanol.pdf>
- Castro, J., Peron, A., Silva, F., Siqueira, E., Macedo, A., Oliveira, V., ... Júlio, H. (2017). Physico-chemical and genotoxicity analysis of Guaribas river water in the Northeast Brazil. *Chemosphere*, *177*, 334–338. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.010>
- Castro de Esparza, M. L. (2006). Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. *Natural Arsenic in Groundwaters of Latin America*, (June), 20–24.
- Chanvaivit, S., Navasumrit, P., Hunsonti, P., Autrup, H., & Ruchirawat, M. (2007). Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. *Mutation Research*, *626*(1–2), 79–87. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.09.007>

- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249. <http://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Collins, A. R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *BBA - General Subjects*, 1840(2), 794–800. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.022>
- Dhawan, A., Bajpayee, M., & Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 5–32. <http://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z>
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, C., & Egwurugwu, Y. (2007). Contaminación de Metales Pesados y Efectos Biotóxicos Humanos. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), 112–118.
- Engel, A. (2016). Viability, Cell. In H.-W. Vohr (Ed.), *Encyclopedia of Immunotoxicology* (pp. 955–962). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-54596-2_1554
- Europa, C. de. (1968). Anexo III . Carta Europea del Agua, 1968.
- Fang, L., Neutzner, A., Turtschi, S., Flammer, J., & Mozaffarieh, M. (2015). Comet Assay as an Indirect Measure of Systemic Oxidative Stress. *Journal of Visualized Experiments*, (99), 1–5. <http://doi.org/10.3791/52763>
- Fong, I. A., & Ruiz, A. T. De. (2001). El petróleo y su proceso de refinación. *Universidad Tecnológica de Panamá*, 1, 10–11,37. Retrieved from [http://biblioteca.unmsm.edu.pe/redlieds/proyecto/publicacioneselectro/monografias/El petr?leo y su proceso de refinaci?n.pdf](http://biblioteca.unmsm.edu.pe/redlieds/proyecto/publicacioneselectro/monografias/El%20petr%20leo%20y%20su%20proceso%20de%20refinaci%20n.pdf)
- Fontaine, G. (2013). Más allá del caso Texaco: ¿se puede rescatar al nororiente ecuatoriano? *Íconos - Revista de Ciencias Sociales* N° 16, (16), 129–137.
- Freshney, I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth Edition. <http://doi.org/10.1016/B978-1-85617-745-0.00001-2>
- Gaivão, I., & Sierra, L. M. (2014). Drosophila comet assay: insights, uses, and future perspectives. *Frontiers in Genetics*, 5, 304. <http://doi.org/10.3389/fgene.2014.00304>
- García, J., Arreguín, F., Hernández, S., & Lluch, D. (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la Sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia ISSN:0378-1844*, 29, pp.311-319. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33909304.pdf>
- García, P. E. P., & Cruz, M. I. A. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 199–205.
- Gil, F. (2000). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Revista de Toxicología*, 17(1), 19–26. Retrieved from <http://www.citeulike.org/group/16364/article/10691829>
- Gondecki, P. (2011). Entre retirada forzosa y autoaislamiento voluntario: reflexiones sobre pueblos indígenas aislados y estrategias de evitación en el manejo de conflictos en la Amazonía occidental. *Indiana*, 28(28), 127–152. Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=247022796007%5Cnhttp://www.redalyc.org/articulo.oa?id=247022796007%5Cnhttp://www.redalyc.org/pdf/2470/247022796007.pdf>
- Gottlieb, M. S. (1980). Lung cancer and the petroleum industry in Louisiana. *Journal of*

Occupational Medicine. : Official Publication of the Industrial Medical Association, 22(6), 384–388.

- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A.-M., ... Souidi, M. (2006). [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Annales de biologie clinique*, 64(6), 535–548.
- Guo, J., & Fang, J. (2012). The Distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in Water of Taihu Lake. *Procedia Environmental Sciences*, 12(Icese 2011), 258–264. <http://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.275>
- Hernandez, J. (2010). Introduccion a La Toxicologia. *Dpto. Farmacología Y Terapeutica*, 1–11.
- Heuser, V. D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P., & da Silva, J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology*, 232(3), 235–47. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2007.01.011>
- Huertos, E. D. (2016). Consumo energético y medio ambiente datos para un debate Enrique Delgado Huertos, (May 2015). <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1248.1443>
- Jadoon, S., Amin, A., Malik, A., & Khaleel, H. (2016). Effects of Crude Oil Contamination under the Controlled Conditions on the Physicochemical Properties of Water in Khurmala and Guwayar, Kurdistan Region, Iraq. *Journal of Pollution Effects & Control*, 4(3), 3–7. <http://doi.org/10.4172/2375-4397.1000165>
- Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Slobodnik, J., Liška, I., Gačić, Z., ... Vuković-Gačić, B. (2016). Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Science of The Total Environment*, 540, 377–385. <http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.061>
- Kraus, R. S. (2012). Petroleo:Prospeccion Y Perforacion, 1–16. Retrieved from <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/75.pdf>
- Laffon, B., Fraga, R., Perez, B., & Mendez, J. (2006). Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(10), 1714–1723. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2006.05.010>
- Larriba, M. (2015). Extracción de hidrocarburos aromáticos de naftas y gasolinas de reformado y pirólisis empleando una mezcla binaria de líquidos iónicos como disolvente.
- Leifsen, E. (2017). Wasteland by design: Dispossession by contamination and the struggle for water justice in the Ecuadorian Amazon. *The Extractive Industries and Society*. <http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.exis.2017.02.001>
- Liska, D. J. (1998). The Detoxification Enzyme Systems - 187.pdf. *Alternative Medicine Review*, 3(3), 187–198. Retrieved from <http://www.altmedrev.com/publications/3/3/187.pdf>
- Liu, L., Zhang, X., & Zhong, T. (2016). Pollution and health risk assessment of heavy metals in urban soil in China. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(2), 424–434. <http://doi.org/10.1080/10807039.2015.1078226>
- López, J. M., Sánchez, J., Gómez, Á., & Fernández, Á. (2009). *Flujos del petróleo y del*

gas natural para el transporte. [http://doi.org/ISBN: 978-84-89649-29-3](http://doi.org/ISBN:978-84-89649-29-3)

- Martins, M., Ferreira, A., Costa, M., & Costa, P. (2016). Comparing the genotoxicity of a potentially carcinogenic and a noncarcinogenic PAH, singly, and in binary combination, on peripheral blood cells of the European sea bass. *Environmental Toxicology*, 31(11), 1307–1318. <http://doi.org/10.1002/tox.22135>
- Møller, P. (2006). The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 336–345.
- Morcillo, G., Martínez de Paz, P., Morales, M., & Martínez, J. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.09.005>
- Moriño, N., Glados, A., Martinez, J., & Sala, M. (2008). Exposición a la contaminación por actividad petrolera y estado de salud de la Comuna Yamanunka y estado de salud de la Comuna Yamanunka (Sucumbíos, Ecuador).
- Paz, C., Creus, A., Cabé, O., & Leone, P. (2001). *Genética Toxicología y Carcinogénesis libro.pdf*.
- Paz, C., & López, A. (2014). Genética Molecular y Citogenética Humana. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 27–30. <http://doi.org/10.1530/jrf.0.1010027>
- Pérez, G., Morales, P., & Haza, A. (2016). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), 1–15. http://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n1.51869
- Perez, O., & Silva, N. (2014). *CASO CHEVRON- LA VERDAD NO CONTAMINA*.
- Phillips, D. H., & Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS*, 99, 87–110.
- Ramírez, A. V. (2006). Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *Anales de La Facultad de Medicina de Lima - Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 67(1), 49–58.
- Robinson, J. P., Coder, D., Johnson, S., Nguyen, V., & Coder, D. (2017). Assessment of Cell Viability Assessment of Cell Viability, (April 2013). <http://doi.org/10.1002/0471142956.cy0902s64>
- Rubio, C. (2005). Ingesta de contaminantes metálicos (Hg,Pb,Cd, Fe, CU, Zn y Mn) en la comunidad autónoma canaria. *Evaluación toxicológica*, 185.
- Salsedo, P. (1992). *La química aplicada y elaboración de petróleo Colombiano*.
- San Sebastian, M., Armstrong, B., & Stephens, C. (2001). Health of women living near oil wells and oil production stations in the Amazon region of Ecuador. *Rev Panam Salud Publica*, 9(6), 375–84. <http://doi.org/10.1590/S1020-49892001000600004>
- San Sebastián, M., & Hurtig, A. (2005). Oil exploitation in the Amazon basin of Ecuador: a public, 2005(5), 205–211.
- San Sebastián, M., Tanguila, A., & Santi, S. (2004). *INFORME YANA CURI Impacto de la actividad petrolera en la salud de poblaciones rurales de la Amazonía ecuatoriana*.

- Serrano, J., & Osornio, A. (2007). Cancer y sustancias toxicas en el ambiente.pdf.
- Simonsen, N., Scribner, R., Su, L. J., Williams, D., Luckett, B., Yang, T., & Fontham, E. T. H. (2010). Environmental exposure to emissions from petrochemical sites and lung cancer: the lower Mississippi interagency cancer study. *Journal of Environmental and Public Health*, 2010, 759645. <http://doi.org/10.1155/2010/759645>
- Smith, N. (2010). Hidrocarburos aromaticos. *Enciclopedia de Salud Y Seguridad En El Trabajo*, 104–295. Retrieved from www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/.../104_07.pdf
- Strolin, M., Whomsley, R., & Baltes, E. (2006). Involvement of enzymes other than CYPs in the oxidative metabolism of xenobiotics. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(6), 895–921. <http://doi.org/10.1517/17425255.2.6.895>
- Suárez, E., Zapata-Ríos, G., Utreras, V., Strindberg, S., & Vargas, J. (2013). Controlling access to oil roads protects forest cover, but not wildlife communities: a case study from the rainforest of Yasuní Biosphere Reserve (Ecuador). *Animal Conservation*, 16(3), 265–274. <http://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2012.00592.x>
- Tejeda Benitez, L., Marimón Bolivar, W., Tejeda Tovar, C., & Quiñones Bolaños, E. (2015). Absorción de Cromo Hexavalente en soluciones acuosas por cascaras de naranja (*Citrus sinensis*). *Producción Más Limpia*, 10(1), 9–21. <http://doi.org/10.22507/pml.v10n1a1>
- Venegas, L. a Z. (2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. *Tesis Doctoral*, 223.
- Vergara, A. (2010). Estandarizacion del ensayo del cometa alcalino en celulas de sangre periferica. *Tesis Trabajo De Grado*, 9–60.
- Wang, B., Wan, Y., Zheng, G., & Hu, J. (2016). Evaluating a Tap Water Contamination Incident Attributed to Oil Contamination by Nontargeted Screening Strategies. *Environmental Science & Technology*, 50(6), 2956–2963. <http://doi.org/10.1021/acs.est.5b05755>
- Yang, J., Zhang, H., Zhang, H., Wang, W., Liu, Y., & Fan, Y. (2017). Smoking modify the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on oxidative damage to DNA in coke oven workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1–9. <http://doi.org/10.1007/s00420-017-1206-2>