



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGISTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y DIAGNÓSTICO DE
LABORATORIO

**Evaluación del daño genotóxico mediante ensayo de cometa en población
expuesta a material particulado MP 2.5 en la zona Sur de ciudad de Cuenca –
Ecuador.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Barrera Parra, Diana Alexandra

DIRECTORA: Bailón Moscoso, Natalia Catalina, PhD

LOJA – ECUADOR

2018



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>

2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso, PhD

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, denominado: Evaluación del daño genotóxico mediante ensayo de cometa en población expuesta a material particulado MP 2.5 en la zona Sur de ciudad de Cuenca – Ecuador realizado por Barrera Parra Diana Alexandra, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 15 de octubre de 2018

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Barrera Parra Diana Alexandra declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Evaluación del daño genotóxico mediante ensayo de cometa en población expuesta a material particulado MP 2.5 en la zona Sur de ciudad de Cuenca – Ecuador, de la Titulación Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio, siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, concepto, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

F.

Autor: Barrera Parra Diana Alexandra

Cédula: 0104132279

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a las personas más importantes en mi vida, en primer lugar, quiero dedicarle a Dios y a la Virgen María por darme sabiduría y entendimiento para poder culminar con éxito esta meta que me he planteado.

A mi esposo quien formó parte de mi sacrificio, por su amor, su confianza y por brindarme el tiempo necesario para realizarme como profesional.

A mis Padres por su amor, cariño y apoyo incondicional para seguirme preparando y hacer de mí una mejor persona, gracias a ellos soy todo lo que soy.

A mis hermanos y a toda mi familia quienes me han brindado su apoyo y por darme ánimos para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por haberme abierto las puertas para poder prepararme profesionalmente, así como también a los diferentes docentes que me brindaron sus conocimientos con dedicación y profesionalismo.

A mi directora de Tesis, Dra. Natalia Bailón Moscoso, por haberme confiado este trabajo, por su paciencia, su dedicación y apoyo para concluir el mismo. Su experiencia en el área y su don profesional ha sido mi fuente de motivación para seguirme preparando.

Mis agradecimientos también al grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología por la ayuda brindada durante el desarrollo del presente trabajo.

A mis padres, por confiar y creer en mí y por todo el sacrificio que han realizado para convertirme en una excelente persona y profesional.

A mi esposo por su amor y paciencia, por depositar en mí su confianza. Gracias por luchar a mi lado.

A mis familiares y amigos por estar ahí cuando los necesitaba.

A todos ustedes mi más profundo agradecimiento.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Contaminación atmosférica	6
1.2 Contaminación atmosférica en la ciudad de Cuenca – Ecuador	6
1.3 Principales contaminantes atmosféricos	7
1.3.1 Dióxido de azufre	7
1.3.2 Monóxido de carbono	7
1.3.3 Dióxido de nitrógeno	7
1.3.4 Ozono	7
1.4 Material particulado	8
1.4.1 Clasificación del material particulado	8
1.4.2 Composición del material particulado	8
1.4.3 Medición de la Calidad del Aire	9
1.4.4 Fuentes de material particulado	10
1.5 Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud	11
1.6 Enfermedades relacionadas con la exposición a material particulado	12
1.6.1 Enfermedades respiratorias	13

1.6.2	Enfermedades cardiovasculares	14
1.6.3	Cáncer	15
1.7	Biomarcadores de genotoxicidad	17
1.7.1	Ensayo Cometa.	17
1.7.1.1	<i>Fundamento Ensayo Cometa.</i>	18
1.7.1.2	<i>Aplicaciones Ensayo Cometa.</i>	18
CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO		20
2.1	Objetivo general del proyecto.	21
2.2	Objetivos específicos del proyecto.	21
CAPITULO III. MÉTODOS		22
3.1	Tipo de estudio	23
3.2	Área de estudio	23
3.3	Población de estudio	25
3.3.1	Criterios de Inclusión.	25
3.3.2	Criterios de Exclusión.	26
3.4	Obtención de la muestra	26
3.5	Metodología ensayo cometa	26
3.5.1	Preparación de microgeles de agarosa.	26
3.5.2	Preparación de las muestras.	26
3.5.3	Lisis.	27
3.5.4	Electroforesis.	27
3.5.5	Neutralización y deshidratación.	27
3.5.6	Tinción y conteo de células.	27
3.5.7	Análisis estadístico.	27
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		29
RESULTADOS		30
DISCUSIÓN		35

CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMEN

La contaminación ambiental es un problema de gran interés a nivel mundial ya que la exposición a sustancias químicas produce efectos nocivos en la salud como problemas respiratorios, cardiovasculares y cáncer. La calidad del aire en la ciudad de Cuenca muestra altas concentraciones de material particulado 2.5 (MP 2.5) en la zona urbana, ocasionado principalmente por el alto tráfico vehicular responsable de la emisión de sustancias contaminantes del aire con consecuentes efectos genotóxicos. En el presente trabajo se evaluó el daño genotóxico producido por exposición a altas y bajas concentraciones de MP 2.5, el ensayo se realizó con personas que residen o laboran la zona sur de la ciudad de Cuenca mediante el ensayo cometa. Se observó un aumento significativo en la media del índice de daño genotóxico y de la longitud de la cola del cometa ($p < 0.05$) existiendo diferencias estadísticas entre los grupos analizados, indicando que la exposición a altas concentraciones de MP 2.5 produce daño en el ADN de las células lo cual podría incrementar el riesgo de padecer cáncer.

Palabras claves: Ensayo cometa, daño ADN, material particulado 2.5.

ABSTRACT

Environmental pollution is a problem of great interest worldwide because exposure to chemicals produces harmful effects on health such as respiratory problems, cardiovascular and cancer. The air quality in the city of Cuenca shows high concentrations of particle matter 2.5 (PM 2.5) in the urban area, caused mainly by the high vehicular traffic responsible for the emission of air pollutants with indirect genotoxic effects. In the present work, the genotoxic damage produced by exposure to high and low concentrations of PM 2.5 was evaluated, the test was performed with persons who reside or work in the southern area of the city of Cuenca using the comet assay. There was a significant increase in the mean of the genotoxic damage index and the length of the tail of the comet ($p < 0.05$), there were statistical differences between the analyzed groups, indicating that exposure to high concentrations of PM 2.5 produces DNA damage of the cells which could increase the risk of cancer.

Keywords: Comet assay, DNA damage, particle matter 2.5

INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica es un problema importante para la salud durante muchos años. Se estima que en los países industrializados un 20% de las enfermedades se asocia con factores medioambientales, por lo tanto, la relación entre la contaminación del aire y la salud es cada día más conocida (Vargas Marcos, 2005).

El material particulado (MP) en el ambiente está constituido por una mezcla compleja de partículas de naturaleza tanto sólida como líquida las cuales son capaces de transportar una serie de compuestos químicos de entre los cuales destacan el monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), óxido de azufre (SO₂), ozono (O₃) y partículas con tamaños entre 2.5 a 10 µm (MP 2.5) (Traversi et al., 2009). El MP se origina ya sea por fuentes primarias, es decir son emitidas directamente al ambiente, o por fuentes secundarias, es decir, se forman como resultado de reacciones químicas producidas en la atmósfera o entre las partículas primarias (OMS, 2005).

Las partículas atmosféricas contienen miles de compuestos, muchos de los cuales se ha investigado que son mutágenos y/o carcinógenos, por lo que se ha considerado evaluar el riesgo genotóxico / carcinógeno en población expuesta a estos contaminantes (Astudillo et al., 2015).

El daño genotóxico se produce por la habilidad que posee un agente químico o físico de reaccionar con el material genético de un organismo, causando alteraciones reversibles o irreversibles en su estructura, alterando de esta manera la información genética del ADN en las células (Aammi et al., 2017).

Para determinar la actividad genotóxica producida por contaminantes ambientales se ha descubierto una serie de biomarcadores de genotoxicidad, sin embargo, uno de los más utilizados es el ensayo cometa que es un método cuantitativo, sensible que permite analizar el daño del ADN de las células y tiene la ventaja de poder realizar el biomonitoreo in vivo o in vitro en cualquier tipo de tejido de interés para detectar diversos tipos de daño en el ADN de las células y generación de datos a nivel de una sola célula estas características le da una potencial ventaja frente a otros métodos que se limitan a un solo tejido (Dalboni et al., 2012; Franken et al., 2017; Hartmann et al., 2003)

En la ciudad de Cuenca, una de las principales fuentes de contaminación ambiental es la emisión de MP que va creciendo a través de los años; en la zona urbana se generan altas concentraciones de MP, que provienen del sector industrial, pero en mayor proporción del

transporte. En un estudio realizado se determinó que los niveles de MP en la zona urbana de la ciudad de Cuenca superan los límites establecidos por la normativa de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Astudillo et al., 2018), como consecuencia de esto se observan los efectos a nivel fisiológico predominando enfermedades respiratorias y cardiovasculares en la población expuesta, además muchos contaminantes ambientales tienen efectos genotóxicos, es decir que causan mutaciones o cambios genéticos en las células que se evidencia a largo plazo aumentando el riesgo de padecer cáncer (Beri et al., 2010), por lo tanto se ha visto la necesidad de realizar un estudio para determinar la relación que existe entre la exposición a estos contaminantes y el daño que producen los mismos (EMOV EP, 2015).

El objetivo principal del presente estudio es evaluar el daño genotóxico mediante el ensayo cometa en población expuesta a MP 2.5 en la zona Sur de la ciudad de Cuenca – Ecuador, y como objetivos específicos, determinar el daño genotóxico producido en la población de la zona Sur de la ciudad de Cuenca mediante ensayo cometa y determinar la relación que existe entre el daño genotóxico y la exposición a MP 2.5 en zonas de alto y bajo nivel de contaminación en la zona Sur de la ciudad de Cuenca.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Contaminación atmosférica

Desde la revolución industrial, el uso creciente de combustibles, demanda de electricidad, actividades mineras, actividades agrícolas y el uso masivo de combustibles fósiles como fuente de energía, han sido los principales responsables de la contaminación atmosférica, siendo esta un problema de interés a nivel mundial (Falcon et al., 2016). Existen diferentes definiciones sobre la contaminación atmosférica, pero todas se dirigen hacia la presencia de sustancias químicas en la atmósfera en diferentes concentraciones que pueden provocar daño al ecosistema y ser nocivas para la salud humana (Ubilla, 2017).

Los contaminantes que se emiten directamente a la atmósfera se denominan contaminantes primarios y aquellos que se forman a partir de reacciones químicas y fotoquímicas o de sus precursores en la atmósfera se denominan contaminantes secundarios. El monóxido de carbono (CO) es un ejemplo de contaminante primario mientras que el ozono (O₃), óxido de nitrógeno (NO) son algunos de los contaminantes secundarios (Ubilla, 2017).

La contaminación atmosférica se da por dos principales fuentes de contaminación que son las fijas (desechos domésticos, fábricas, pesticidas, entre otros) y las móviles (vehículos de motor a diésel o gasolina), cualquiera que fuese la fuente de contaminación se emiten al aire tanto sustancias inorgánicas como dióxido de azufre (SO₂), dióxido de nitrógeno (NO₂), óxido de carbono (CO) y sustancias orgánicas como MP 2.5 y MP 10 (Zuluaga et al., 2009).

1.2 Contaminación atmosférica en la ciudad de Cuenca – Ecuador

Cuenca es la tercera ciudad del Ecuador que se encuentra ubicada al sur del país. Diversos organismos iniciaron en el año 1986 el monitoreo de la calidad del aire y en el año 2012 el Municipio de Cuenca continuó realizando el monitoreo en 18 puntos de la ciudad con mediciones de CO, NO₂, O₃, SO₂ y de MP 2.5 y se encontraron valores que superaron la normativa nacional y la guía de calidad de aire de la OMS en varios puntos de la ciudad (EMOV EP, 2015). Asimismo, concluyeron que la principal fuente de emisión de los contaminantes ambientales es el tráfico vehicular con un 85% de las emisiones evaluadas seguido de centrales térmicas, industrias, entre otras. (Palacios et al., 2014) Luego de varios monitoreos realizados se concluyó que Cuenca es la cuarta ciudad con mayor índice de contaminación ambiental a nivel del Ecuador, por tal motivo se realizaron estudios sobre prevalencia de enfermedades respiratorias en niños procedentes de lugares contaminados y se determinó que presentan un alto riesgo de padecer las mismas (Palacios, 2014).

1.3 Principales contaminantes atmosféricos

Los principales contaminantes atmosféricos a nivel mundial son el dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), el ozono (O₃) y material particulado (MP), se detallan algunas características de cada uno de ellos (OMS, 2005).

1.3.1 Dióxido de azufre

El dióxido de azufre (SO₂) es un gas incoloro que a altas concentraciones se puede detectar por su olor característico cáustico e irritante, se disuelve fácilmente con el agua para formar ácido sulfuroso (H₂SO₃) y al entrar en contacto con el oxígeno del aire se oxida y forma ácido sulfúrico (H₂SO₄) que son compuestos nocivos y causan graves daños a la salud afectando principalmente la función respiratoria (Aránguez et al., 1999).

1.3.2 Monóxido de carbono

El monóxido de carbono (CO) es un gas potencialmente tóxico que es emitido por los escapes de los vehículos motorizados que usan diésel o gasolina por combustión incompleta; tiene alta afinidad por la hemoglobina, el CO se une con la hemoglobina y forma carboxihemoglobina (COHb) que al ser liberada en el organismo disminuye la oxigenación tisular y puede causar daños en el sistema nervioso central y enfermedades cardiovasculares (Rosas et al., 2015), en altas concentraciones puede causar efectos en la audición en el estado de vigilia y en la percepción visual (Mata, 2011).

1.3.3 Dióxido de nitrógeno

El dióxido de nitrógeno (NO₂) es un gas inodoro, incoloro que constituye el 70% de la composición del aire; tanto el óxido nítrico (NO) como el dióxido de nitrógeno (NO₂) se consideran contaminantes ambientales que son producidos como resultado de la combustión; una exposición prolongada a estos contaminantes produce efectos importantes en la salud (Aránguez et al., 1999).

1.3.4 Ozono

El Ozono (O₃) es un compuesto altamente reactivo, incoloro, inodoro que no se emite directamente, sino que se produce como resultado de reacciones que se forman en la atmósfera entre óxidos de nitrógeno y compuestos volátiles en presencia de oxígeno y luz solar (Zuluaga et al., 2009). Se considera un contaminante que produce irritación principalmente en tejidos vivos

(Aránguez et al., 1999), puede afectar las vías respiratorias y producir enfermedades como enfisema, bronquitis y asma (Mata, 2011).

1.4 Material particulado

El material particulado (MP) se considera uno de los contaminantes atmosféricos de mayor importancia a nivel mundial, se produce por la mezcla de partículas sólidas y/o líquidas tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPS), benceno, tolueno; componentes biológicos como bacterias, esporas o polen y compuestos inorgánicos como sulfatos, nitratos, amonio y metales tales como hierro (Fe), níquel (Ni), vanadio (V) y cobre (Cu) presentes en la atmósfera como resultado de la descomposición de fuentes naturales o antropogénicas (Arciniegas Suárez, 2012).

1.4.1 Clasificación del material particulado

El MP se clasifica de acuerdo al diámetro aerodinámico de las partículas en:

- **Partículas gruesas o MP 10:** tienen un diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$ y pueden penetrar y depositarse en la región traqueo bronquial en el tracto respiratorio.
- **Partículas finas o MP 2.5:** tienen un diámetro aerodinámico $\leq 2.5 \mu\text{m}$ se depositan directamente en los alveolos pulmonares ya que son fácilmente respirables, llegan al torrente circulatorio y producen efectos nocivos a nivel respiratorio causando un mayor impacto sobre la salud (Quijano, 2015).
- **Partículas ultrafinas o MP 0.1:** tienen un diámetro aerodinámico $\leq 0,1 \mu\text{m}$ (González, 2016).

Las diferencias en la composición química y tamaño de las partículas son factores que influyen sobre los diferentes efectos que producen las mismas en la salud humana (Peixoto et al., 2017).

1.4.2 Composición del material particulado

En el material particulado se puede encontrar varios tipos de contaminantes (Tabla 1) desde compuestos orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos que podrían tener potencial cancerígeno y mutagénico, hasta compuestos inorgánicos como metales pesados tales como plomo (Pb), cadmio (Cd), níquel (Ni), cobre (Cu) y vanadio (V) o inclusive mezclas de estos compuestos que pueden llegar a generar radicales hidroxilos produciendo daño oxidativo siendo esto altamente peligroso (Préndez et al., 2007). (Figura 1).

Composition	Elements
Metals	K, Ca, Ga, Pb, Sr, Zr Ba, Na, Li, Be, Ti, Sn, Mg Al, Cs, Bi In Sb
Transitional metals	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn Cd, Au, V, Hg, Nb, Tl, Co Mo Zr Rb, Ag
Non-metals	B, As, Se S Sb
Lanthanides and actinides	Sm, U Tb Ce, La
Biologicals	Glucans Endotoxins Pollens Viruses
Carbon	Elemental Organic

Figura 1: Composición del material particulado

Fuente: (Falcon-Rodriguez et al., 2016)

Elaborado por:(Falcon-Rodriguez et al., 2016)

Se demostrado que los componentes de las partículas están en estrecha relación con los daños específicos en la salud, algunos compuestos orgánicos, metales pesados y un gran número de especies químicas forman parte de una mezcla compleja que en la actualidad son indicadores de carcinogénesis y mutagénesis e incluso son considerados elementos de interés toxicológico (García, 2006).

1.4.3 Medición de la Calidad del Aire

La medición del aire del ambiente se puede llevar a cabo por muestreo, análisis y el monitoreo del aire del ambiente. El muestreo se realiza mediante toma de muestras de forma discontinua y permite determinar la concentración de MP suspendido en sus diferentes tamaños MP 10 y MP 2.5 (INECC, 2010). Los resultados obtenidos de las mediciones se reportan en unidades de concentración como mediciones diarias o anuales por metro cúbico (m³) de aire.

El MP se expresa en microgramos por metro cúbico (µg/m³); en el año 2005 la OMS ha elaborado Guías de la Calidad del Aire con el objetivo de brindar orientación para reducir la contaminación del aire y por lo tanto ha establecido límites de los contaminantes ambientales (OMS, 2005), con concentraciones medias diarias y anuales como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones MP establecidas por la OMS

Guías de la Calidad del aire de la OMS relativas al material particulado			
MP 2.5		MP 10	
10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media anual	20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media anual
25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media en 24 horas	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media en 24 horas

Fuente: (OMS, 2005)

Elaborado por: Autor

El Ministerio del Ambiente en el año 2011 mediante el Acuerdo 050 establece la Normativa Ecuatoriana de la Calidad del Aire, en donde establece los límites de la concentración de los contaminantes ambientales en 24 horas y al año (MAE, 2011).

Tabla 2. Concentraciones de MP por el Ministerio del Ambiente de Ecuador

Normativa de Calidad del Aire. Ministerio del Ambiente de Ecuador. Acuerdo 050.			
MP 2.5		MP 10	
15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media anual	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media anual
50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media en 24 horas	100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media en 24 horas

Fuente: (Ministerio del Ambiente de Ecuador, 2011)

Elaborado por: Autor

1.4.4 Fuentes de material particulado

Existen muchas fuentes que pueden contribuir a la emisión de partículas suspendidas en el aire, dentro de las principales fuentes se encuentran la emisión de gases de vehículos a motor y de áreas industriales, combustión de biomasa, desastres naturales, entre otras (Aammi et al., 2017). (Figura 2).

En las grandes ciudades el tráfico vehicular contribuye un 50% de MP 2.5 el cual está compuesto principalmente por carbón orgánico y componentes minerales como silicio (Si), hierro (Fe), calcio (Ca), aluminio (Al) y magnesio (Mg) (Peixoto et al., 2017).

Según el tipo de fuente que genera el material particulado se pueden clasificar en fuentes naturales y fuentes antrópicas (García, 2006).

Las fuentes naturales tales como rocío de agua de mar, partículas de polen, polvo, partículas provenientes de procesos naturales como erupciones volcánicas y materiales que se producen por procesos de erosión del suelo; este tipo de partículas son gruesas y permanecen en el aire por largos períodos de tiempo (Figura 2). Mientras que las antrópicas se producen en procesos industriales, procesos de generación de calor, quema de combustibles fósiles, actividades de transporte y vehículos, entre otras, son partículas finas y contiene una variedad de compuestos tóxicos a diferencia de las fuentes naturales (García, 2006).

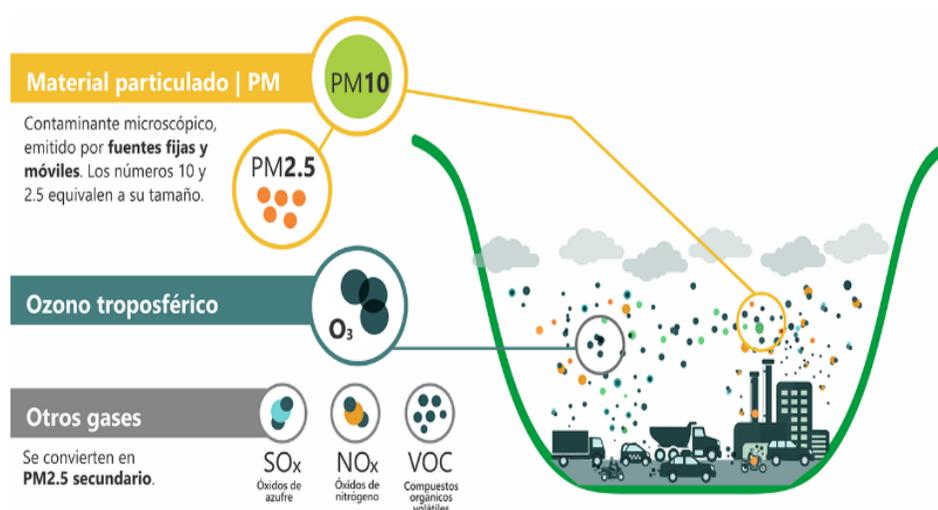


Figura 2: Fuentes de contaminación atmosférica

Fuente: (Radharani, 2017).

Elaborado por: (Radharani, 2017)

1.5 Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud

Uno de los requisitos básicos de la salud y bienestar de las personas es tener un aire limpio, no obstante, la contaminación ambiental es una constante amenaza para la salud a nivel mundial. Según la OMS en la actualidad son más de dos millones de muertes prematuras cada año que se puede atribuir a los efectos sobre la salud que produce la contaminación ambiental (OMS, 2005).

En las últimas décadas varios estudios muestran la asociación que existe entre niveles elevados de contaminantes ambientales y diversos casos de mortalidad y hospitalización por enfermedades respiratorias y cardiovasculares. Así también en los últimos años, la mayoría de estudios epidemiológicos y toxicológicos sobre la inhalación de partículas en suspensión en el aire (principalmente partículas de escape de vehículos) encontraron una correlación entre la

mortalidad y enfermedades respiratorias por contaminantes atmosféricos (Valavanidis et al., 2008). El deterioro de la salud relacionado con la contaminación del aire depende de diversos factores ya sean exógenos como características físicas o químicas de los contaminantes o endógenos como estado anatómico y fisiológico de la persona, hábitos, patrón de respiración, entre otros (Ubilla, 2017).

Los contaminantes que pueden penetrar al tracto respiratorio dependen del tamaño y toxicidad de las partículas, pueden alcanzar las vías respiratorias más pequeñas y alveolos o quedar retenidas a nivel de fosas nasales. La toxicidad depende la composición química de las partículas, la mezcla de los contaminantes puede provocar efectos severos sobre la salud (Ubilla, 2017).

Alrededor del 60% de las enfermedades del tracto respiratorio está asociada con la exposición a contaminantes ambientales (SO_2 , O_3 , NO , CO , material particulado y compuestos volátiles); el tránsito vehicular es considerado como el factor principal causante de enfermedades respiratorias (alergias, rinitis, faringitis, asma), enfermedades cardiovasculares y cáncer (Zuluaga et al., 2009).

1.6 Enfermedades relacionadas con la exposición a material particulado

EL MP puede ser intrínsecamente tóxico debido a sus características fisicoquímicas, también puede interferir con los mecanismos que controlan el sistema respiratorio o a su vez pueden actuar como una sustancia tóxica absorbida (Argumedo y Castillo, 2016).

En la Figura 3 se puede observar que tanto el tamaño como la solubilidad de las partículas en el agua son factores que favorecen la absorción en el sistema respiratorio; las vías respiratorias tienen una estructura anatómica tal que facilita la adherencia de las partículas, sin embargo el efecto que produzcan en el organismo depende de su tamaño; las partículas gruesas son retenidas por los cilios del conjunto nasal y la mucosa que protege la cavidad nasal y la tráquea y por lo tanto son eliminadas fácilmente, las partículas finas suelen depositarse en los bronquios o en los alveolos pulmonares, pero generalmente se eliminan por fagocitosis o por drenaje hacia el sistema linfático y finalmente las partículas ultrafinas se depositan en los alveolos pulmonares permaneciendo tiempos prolongados ya que no existe ningún mecanismo de defensa del organismo para eliminar este tipo de partículas (Aldaz, 2017).

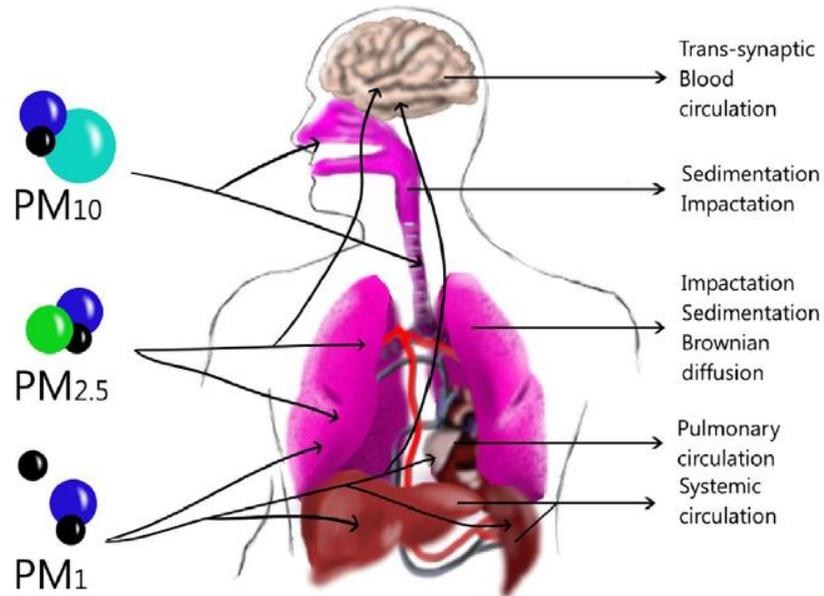


Figura 3: Tamaño y dinámica de las partículas en el pulmón y otros tejidos
Fuente: (Falcon et al., 2016)
Elaborado por: (Falcon et al., 2016)

De acuerdo al proceso de formación y transporte en el organismo las partículas al ser totalmente respirables son alta de peligrosidad al tener la capacidad de penetrar y depositarse en la región traqueo bronquial y alveolar del tracto respiratorio provocando enfermedades respiratorias, al pasar al torrente circulatorio puede provocar enfermedades cardiovasculares y si permanecen en los tejidos pueden estar relacionados con el cáncer (Beleño et al., 2013).

1.6.1 Enfermedades respiratorias

Debido a la facilidad que tienen los contaminantes aéreos de ingresar al epitelio alveolar, tienen un impacto negativo directo en la función respiratoria, los grupos vulnerables como ancianos y niños son más susceptibles a padecer enfermedades respiratorias sin importar la zona geográfica en la que residan; los contaminantes como el MP, O₃, NO₂, SO₂, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés) están implicados en la mortalidad por causa respiratoria y el MP 2.5 está implicado en el desarrollo del cáncer pulmonar, en estos casos por cada 10 µg/m³ de incremento en la concentración de MP 2.5 aumenta un 4% el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar y un 6% de mortalidad (Restrepo et al., 2016).

Las MP 2.5 son partículas finas que tienen la capacidad de penetrar las regiones distales de las vías respiratorias, se ha demostrado que la inhalación de estas partículas altera la respuesta inmune causando infiltración neutrofílica, mayor expresión de genes para metaloproteínas, desactivación del surfactante pulmonar, además produce disfunción fagocítica en macrófagos,

alteración de la movilidad mucociliar y por ende disminuye la eliminación de las bacterias (Lopez et al., 2014).

La rinitis y el asma bronquial son enfermedades alérgicas respiratorias que en recientes investigaciones se ha demostrado que han aumentado en todo el mundo; la inhalación de contaminantes ambientales afecta la función pulmonar de pacientes asmáticos y al parecer también aumenta la frecuencia e intensidad de los síntomas en pacientes alérgicos ya que presentan daños en la mucosa de la vía respiratoria lo que facilita el acceso de alérgenos inhalados a las células del sistema inmune (Medina et al., 2017).

1.6.2 Enfermedades cardiovasculares

El desarrollo de enfermedades cardiovasculares puede deberse principalmente a patologías respiratorias de base, sin embargo, el MP también es el responsable de las afecciones cardiovasculares, no obstante, no se sabe a ciencia cierta cuál es el componente que afecta directamente pues se conoce que el MP es una mezcla de compuestos contaminantes (Restrepo et al., 2016).

Se considera que estos contaminantes tienen el poder de desencadenar el estrés oxidativo en el tejido cardiovascular lo que altera la actividad del sistema nervioso autónomo, activa el proceso inflamatorio, altera la actividad de la endotelina-1, aumenta la producción de plaquetas, altera la integridad del endotelio vascular lo que puede llegar a producir arritmias ventriculares, daño cardíaco y lo más común infarto agudo de miocardio (Restrepo et al., 2016). Estudios realizados por la Asociación Americana de Cardiología (AHA, por sus siglas en inglés) en el año 2004 proporcionan evidencia que la exposición a MP 2.5 a largo plazo contribuye a la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Pope et al., 2006), además también se ha encontrado relación significativa entre la morbimortalidad cardiovascular y las concentraciones de material particulado, de hecho por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP 2.5 en el ambiente aumenta el 1% el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Bo-chiuan et al., 2015) .(Figura 4).

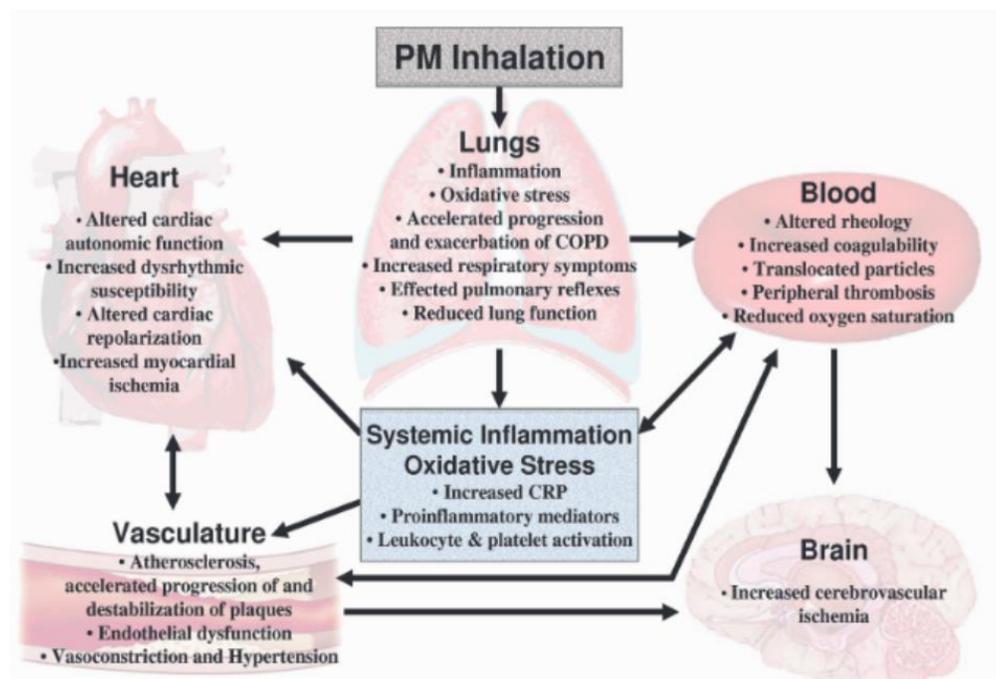


Figura 4. Posibles vías fisiopatológicas que relacionan la exposición a MP con la morbilidad y mortalidad cardiopulmonar

Fuente: (Pope et al., 2006)

Elaborado por: (Pope et al., 2006)

1.6.3 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento rápido y disperso de células anormales; si el crecimiento no puede ser controlado oportunamente, puede dar lugar a la formación de metástasis lo que aumenta el riesgo de muerte significativamente. La tasa de supervivencia varía dependiendo de la localización, no obstante, el diagnóstico precoz y la prevención juegan un papel importante para disminuir la mortalidad por esta patología (García, 2015).

Se considera al cáncer como una enfermedad multifactorial, dentro de los factores de riesgo asociados con el desarrollo de esta patología se han relacionado con el estilo de vida, mala alimentación, predisposición genética, contaminación ambiental e infecciones por algunos virus o bacterias (García, 2015).

En el 2008 se han reportado 7,6 millones de muertes por cáncer, siendo el más común el cáncer de pulmón representando el 7% de la mortalidad, seguido del cáncer cervicouterino, entre otros (Alvarado et al., 2017; Falcon et al., 2017).

En la actualidad la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha clasificado a los contaminantes del aire como carcinógenos del grupo I (Falcon et

al., 2017). El MP contiene principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) y metales que son los principales causantes del estrés oxidativo, considerados agentes mutagénicos y carcinogénicos que se han asociado con marcadores de daño genético que pueden aumentar la frecuencia de cáncer en humanos (Alvarado et al., 2017).

El cáncer se ha considerado como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, representando el 8,2 millón de muertes en el año 2012, la característica principal de todos los tipos de cáncer es la inestabilidad genómica. Probablemente se presenta por la combinación de procesos como el daño del ADN, defectos en la reparación o una falla para detener el ciclo celular antes que el ADN dañado pase a las células hijas (Franken et al., 2017).

El cáncer se puede presentar como resultado de mutaciones q aparecen en transcurso de la vida durante una exposición a sustancias carcinógenas (Lodish et al., 2016) las más comunes son:

- **Carcinógenos físicos:** radiaciones ultravioletas e ionizantes.
- **Carcinógenos químicos:** humo de tabaco, aflatoxinas, arsénico, colorantes.
- **Carcinógenos biológicos:** infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

La carcinogénesis es un proceso de alta complejidad en el que una célula normal se transforma en cancerígena mediante tres fases: Iniciación, promoción y progresión (Figura 5):

- **Fase de iniciación:** Los radicales libres contribuyen a la transformación celular a través del daño oxidativo del ADN, anulación del mecanismo de muerte celular programada y promoción de la expresión de oncogenes; al incrementar las concentraciones de los radicales libres la proteína p53 encargada de prevenir la transformación oncogénica, puede desencadenar bloqueo del ciclo celular y apoptosis, sin embargo, se puede inhibir la producción de esta proteína.
- **Fase de promoción:** en esta fase se produce la expansión clonal de las células que se han mutado por activación de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis dando como resultado una lesión del tejido que se le conoce como tumor.
- **Fase de progresión:** esta última fase se caracteriza por cambios celulares irreversibles, las células desarrollan capacidad angiogénica lo que contribuye al crecimiento del tumor, mientras el tumor aumenta de tamaño su ambiente hipóxico conlleva a la activación de las vías angiogénicas que culmina en el brote de vasos sanguíneos en los tejidos

circundantes al tumor, coloniza otros tejidos en órganos distantes y a este proceso se le conoce como metástasis (García, 2015).

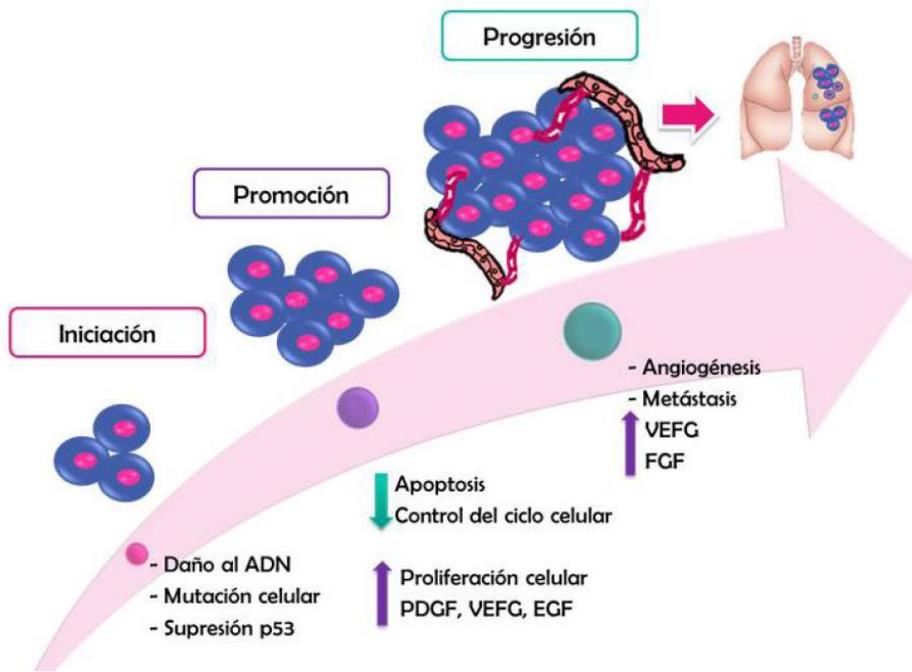


Figura 5. Fases de la carcinogénesis

Fuente: (García, 2015)

Elaborado por: (García, 2015)

1.7 Biomarcadores de genotoxicidad

Los biomarcadores de genotoxicidad son utilizados para detectar agentes que producen daño a nivel del ADN, ya que los agentes genotóxicos poseen la capacidad de alterar el material genético de las células, puede causar mutaciones en las células germinales y células somáticas que pueden causar el desarrollo del cáncer en los humanos (Matheus et al., 2014). Las pruebas más utilizadas para detectar estas anomalías son: el cariotipo, intercambio de cromátidas hermanas, ensayo de micronúcleos, el estudio de la inducción de apoptosis, la prueba de Ames y el ensayo cometa (Zúñiga et al., 2007).

1.7.1 Ensayo Cometa.

El ensayo cometa es un método simple para medir rupturas de simple y doble cadena del ADN en las células; tiene aplicaciones en el estudio de genotoxicidad de nuevos compuestos químicos, el monitoreo de la contaminación ambiental con genotoxinas, el biomonitoreo humano, la epidemiología molecular y la investigación fundamental en daño y reparación del ADN (Collins, 2004).

La electroforesis alcalina de células individuales se encuentra ampliamente difundida para la evaluación de daño al material genético, es un test de alta sensibilidad, rápido y eficaz, capaz de detectar hasta los bajos niveles de daño al ADN, se le considera una herramienta eficiente para utilizar en biomonitorio de poblaciones expuestas a sustancias contaminantes (Tonina, 2017).

1.7.1.1 Fundamento Ensayo Cometa.

Es un método para detección de daño genotóxico a partir de la migración del ADN alterado por agentes genotóxicos. Consiste en obtener una suspensión de células que son embebidas en agarosa sobre portaobjetos y lisadas por detergentes y una concentración de sales con lo que el contenido celular es removido originándose “nucleoides”, en los que el ADN liberado permanece altamente enrollado Figura 6. Posteriormente los portaobjetos son tratados en condiciones alcalinas, lo que permite que el ADN se desenrede desde los sitios de ruptura de las cadenas y en la electroforesis a pH alto los fragmentos de ADN, inducidos por agentes genotóxicos, migren. Luego se realiza un lavado con una solución neutralizante y teñidos con un colorante Bromuro de etidio que se intercala con el ADN. Al observar al microscopio, las células que presentan daño en el material genético dan la apariencia de un cometa, con una cabeza fluorescente brillante y una cola cuyo largo está relacionada con la cantidad de rupturas inducidas en el ADN por los agentes genotóxicos (Collins, 2004).

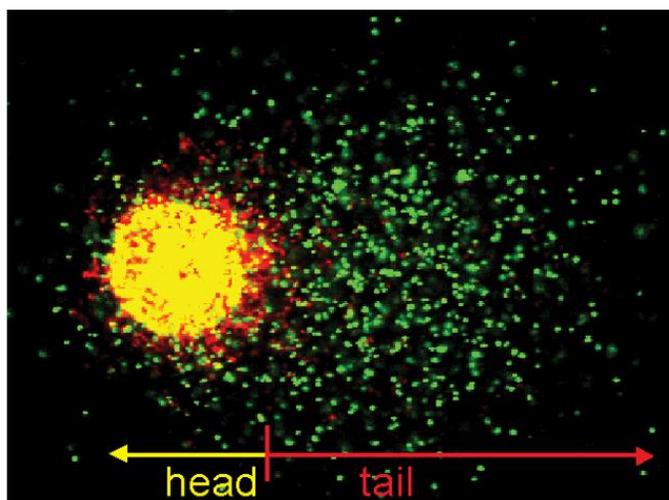


Figura 6: Ensayo cometas diferenciación cabeza y cola

Fuente (Mórocz et al., 2013)

Elaborado por: (Mórocz et al., 2013)

1.7.1.2 Aplicaciones Ensayo Cometa.

Con este ensayo es posible detectar un amplio espectro de lesiones primarias al ADN tales como rupturas de cadena sencilla, rupturas de cadena doble, uniones cruzadas ADN-ADN y

ADN/proteína, bases dañadas por oxidación, sitios alcalino lábiles y sitios de reparación de ADN incompleta. Ha sido también empleado para visualizar la degradación del ADN debido a necrosis y apoptosis, identifica subpoblaciones resistentes o sensibles a agentes dañinos para el ADN cuando se observan resultados diferenciales en una población homogénea o heterogénea de células del mismo tejido (Mórocz et al., 2013; Rodríguez et al., 2016).

CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO

2.1 Objetivo general del proyecto.

Evaluar el daño genotóxico mediante el ensayo cometa en población expuesta a material particulado MP 2.5 en la zona Sur de la ciudad de Cuenca – Ecuador.

2.2 Objetivos específicos del proyecto.

Determinar el daño genotóxico producido en la población de la zona Sur de la ciudad de Cuenca mediante el ensayo del cometa.

Determinar la relación que existe entre el daño genotóxico y la exposición a MP 2.5 en zonas de alto y bajo nivel de contaminación de la zona Sur de la ciudad de Cuenca.

CAPITULO III. MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio

El estudio es de tipo descriptivo transversal, en el cual se plantea determinar la relación que existe entre la exposición a altos niveles de MP y el daño genotóxico mediante ensayo cometa.

3.2 Área de estudio

El estudio se realizó en la zona Suroeste de la ciudad de Cuenca, debido a que en el año 2017 el CEA (Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca) realizó el monitoreo de la calidad de aire, determinándose zonas de alta concentración (Punto 11) y de baja concentración (Punto 10) de MP 2.5 (Figura 7). Este monitoreo se realizó en un período corto de tiempo para determinar las zonas más contaminadas de la ciudad (Astudillo et al., 2018).

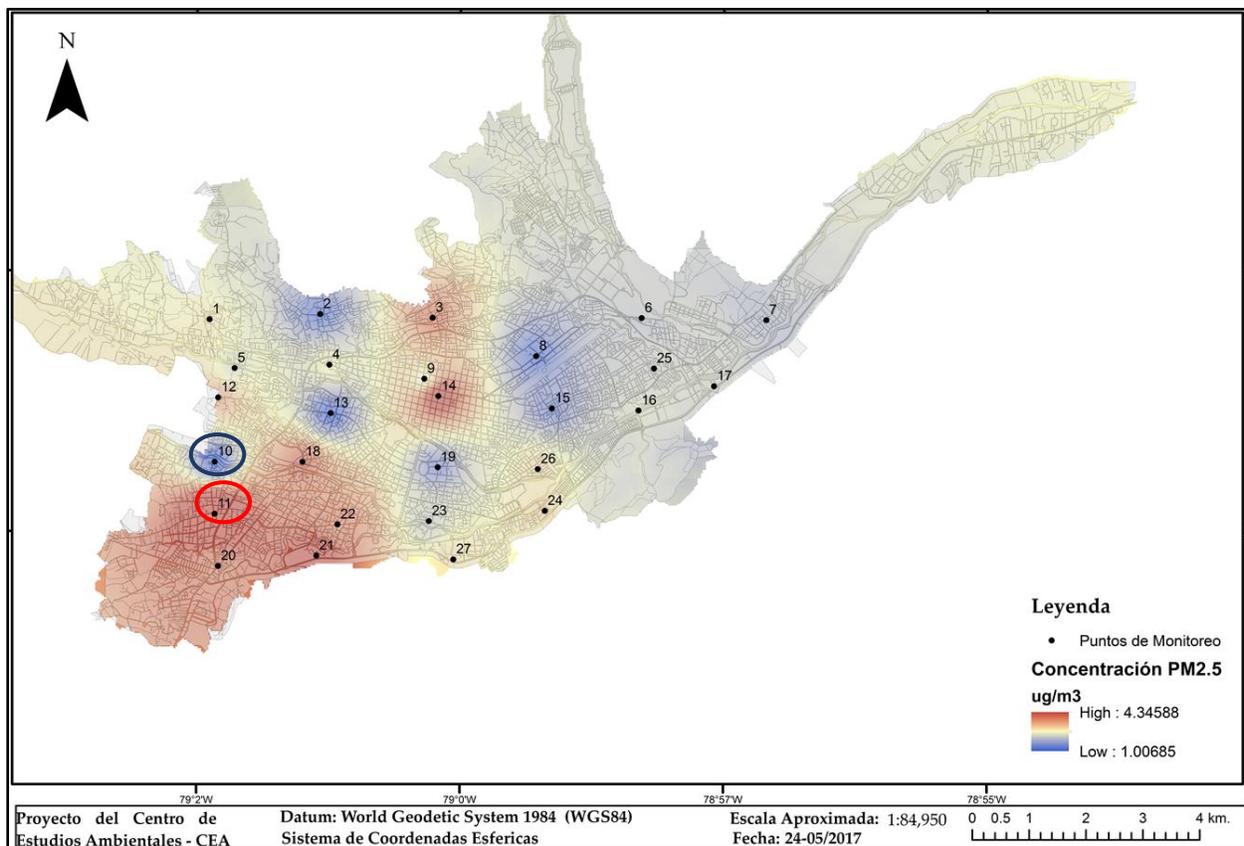


Figura 7. Distribución del material particulado MP 2.5 en la ciudad de Cuenca

Fuente: (Astudillo et al., 2018)

Elaborado por: (Astudillo et al., 2018)

Luego de realizar el monitoreo, el CEA seleccionó los puntos con las concentraciones de material particulado MP 2.5 más altas dentro de ellas el punto 11 (Tabla 3) y realizó el monitoreo durante 24 horas por dos meses, obteniendo resultados que sobrepasan las normativas establecidas (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 3. Análisis de la concentración de material particulado MP 2.5

	PRIMER MES			SEGUNDO MES		
	Promedio concentración $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Promedio concentración mínima $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Promedio concentración máxima $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Promedio concentración $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Promedio concentración mínima $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Promedio concentración máxima $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Punto 11 Av. Américas sector Coralcentro	30,341	16,422	49,129	30,774	16,437	49,169

Fuente: Centro de estudios ambientales (CEA) Universidad de Cuenca

Elaborado por: Autor

Una vez localizados los puntos (Figura 8), en la zona de alta concentración de MP 2.5 se seleccionaron a los donantes que decidieron participar voluntariamente en el estudio quienes tienen su establecimiento comercial o domicilio ubicado ente las siguientes calles: Camino Viejo a Baños, Francisco Ascázubi, Juan Pío Montufar, Manuel Quiroga, Av. de las Américas, Antón de Sevilla.



Figura 8. Localización de calles para el grupo de expuestos a alta concentración de MP 2.5.

Fuente: Google maps

Elaborado por: Autor

Una vez localizados los puntos (Figura 9), en la zona de baja concentración de MP 2.5 se seleccionaron a los donantes que decidieron participar voluntariamente en el estudio quienes cuales tienen su establecimiento comercial o domicilio ubicado entre las siguientes calles: Luis

día y residan o laboren un tiempo mínimo de 3 años, personas que hayan firmado el consentimiento informado.

3.3.2 Criterios de Exclusión.

Se excluyen del estudio las personas que no hayan firmado el consentimiento informado, mujeres en estado de gestación, personas menores de 18 años, personas que laboren o estén expuestos a sustancias químicas y personas que hayan tenido o tienen algún tipo de cáncer.

3.4 Obtención de la muestra

Las muestras de sangre fueron tomadas mediante venopunción en tubos heparinizados y fueron transportadas manteniendo la cadena de frío hacia el laboratorio para el realizar el ensayo cometa.

Para el grupo de donantes expuestos a alta concentración de MP 2.5 a cada muestra obtenida se le asignó un código de trabajo que consistía en dos dígitos numéricos seguidos de las letras SA los cuales fueron claramente identificados para mantener la trazabilidad del estudio.

Para el grupo de donantes expuestos a baja concentración de MP 2.5 a cada muestra obtenida se le asignó un código de trabajo que consistía en dos dígitos numéricos seguidos de las letras SB los cuales fueron claramente identificados para mantener la trazabilidad del estudio.

3.5 Metodología ensayo cometa

3.5.1 Preparación de microgeles de agarosa.

Esta preparación consiste en colocar 130 μ L de agarosa ultrapura de normal punto de fusión al 1% (NMP Invitrogen) sobre portaobjetos limpios, dejar secar y guardar protegidas de la luz por lo menos 12 horas antes del ensayo.

3.5.2 Preparación de las muestras.

Se realizó una dilución 1:2 de la muestra de sangre (75 μ L) con agarosa de bajo punto de fusión (150 μ L) al 1% (LMP Promega Corporation (USA)). De la mezcla se tomó 75 μ L y se colocó sobre el portaobjetos previamente cubierto con agarosa NMP por duplicado, se colocó el cubreobjetos y se refrigeró por 5 minutos; una vez transcurrido el tiempo se retiró el cubreobjetos y se agregó 130 μ L de agarosa LMP en cada placa, nuevamente se colocó el cubreobjetos y se procedió a refrigerar por 5 minutos y finalmente se retiró el cubreobjetos.

3.5.3 Lisis.

Una vez preparadas las muestras con agarosa, las placas fueron sumergidas en una solución de lisis (1% de Triton X-100 Sigma Aldrich, 10% de DMSO Promega Corporation USA, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA Invitrogen, 10 Mm Tris y pH 10), las cuales posteriormente se refrigeraron a 4°C protegido de la luz de 18 a 20 horas. En la solución de lisis las concentraciones de sales y detergentes nos permitieron la desintegración de las membranas de las células, restos citoplasmáticos y proteínas, razón por la cual en este punto del proceso se protege de la luz para evitar el daño adicional que podría producir la luz en el ADN desprotegido.

3.5.4 Electroforesis.

En la cámara de electroforesis (Comet 20 Scie Pas) se colocaron las placas en la cubeta junto con el buffer de corrida que contiene 300 mM Fisher, 1 Mm EDTA Invitrogen, ajustado a un pH \geq 13; las condiciones de la fuente de poder (Thermo Scientific) para el inicio de la corrida electroforética fueron 25 V, 300 mA, 20 min.

3.5.5 Neutralización y deshidratación.

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a retirar las placas de la cubeta y se realizó 3 lavados en un buffer de neutralización ajustado a un pH de 7,5 (0,4 M Tris) durante 5 minutos y luego se procedió a realizar la deshidratación realizando 1 lavado con metanol frío para el análisis.

3.5.6 Tinción y conteo de células.

Para el análisis las placas fueron deshidratadas con agua desionizada fría durante 5 o 10 minutos, se tiñó las placas con 60 μ L de Bromuro de etidio (Promega Corporation USA) y se colocó el cubreobjetos, el exceso fue secado con papel absorbente y se realizó el conteo en el microscopio de fluorescencia AxiosKop 2 Plus (Carl Zeiss) con el software *Comet Assay System IV* (Perceptive instruments) de 100 células por placa por duplicado.

3.5.7 Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos obtenidos, los cuales son expresados en media \pm desviación estándar (DE), se utilizó el software estadístico Graphpad Prism 5. El Chi-square test se utilizó para realizar el análisis de variables, el test de Mann-Whitney y el test no paramétrico Kruskal Wallis se utilizaron para realizar el análisis de comparación de grupos. El valor de $p \leq 0.05$ con

un intervalo de confianza del 95% se consideró como nivel estadísticamente significativo y de importancia biológica.

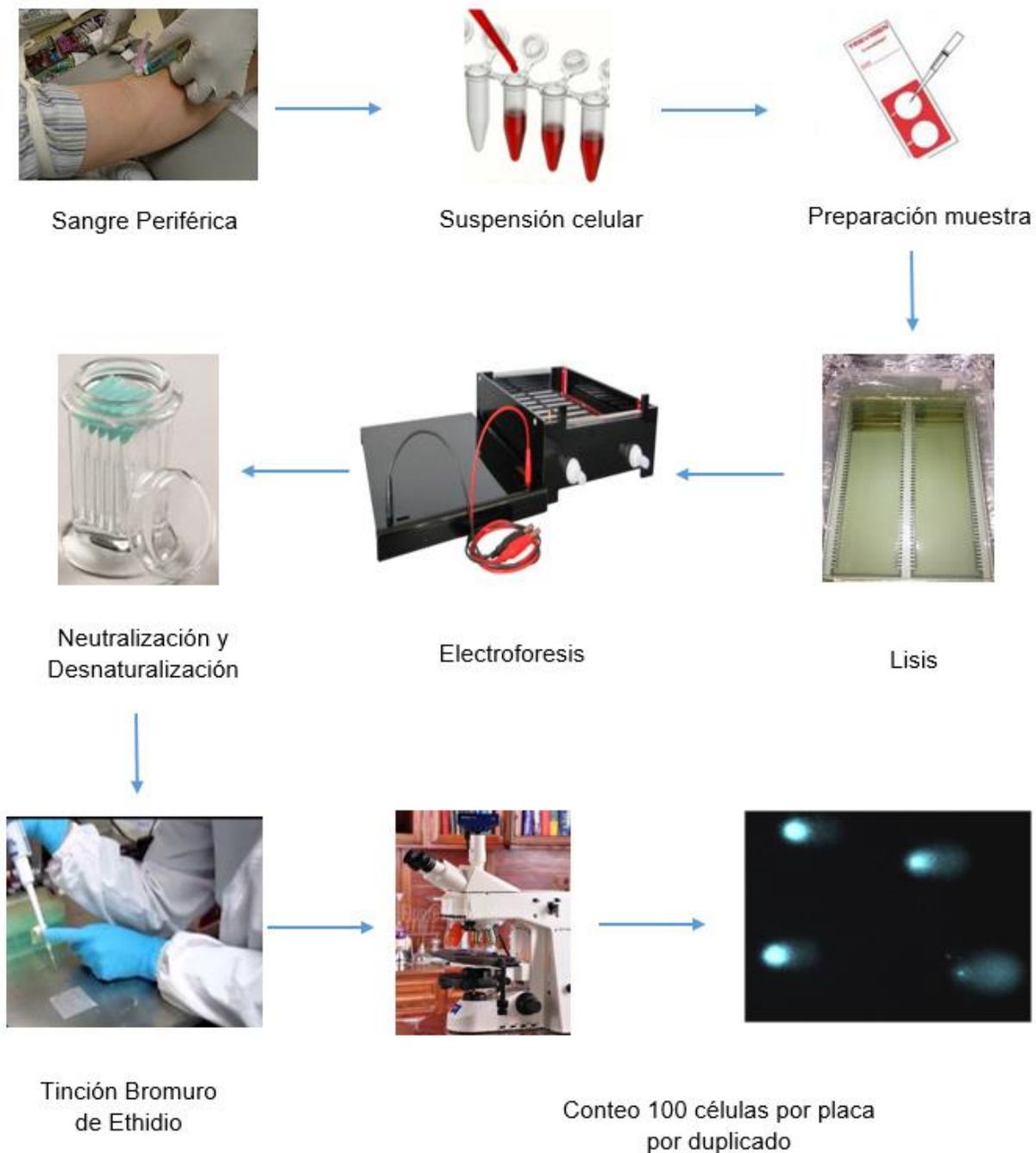


Figura 10. Flujograma Ensayo Cometa

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

En la Tabla 4 se detallan las características generales de la población, en el presente estudio participaron 70 donantes, 36 donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 (18 hombres y 18 mujeres) y 34 donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2.5 (con 18 hombres y 16 mujeres), la edad promedio de los 2 grupos es de $36,86 \pm 10,99$ y $35,65 \pm 9,44$ años, respectivamente, y el tiempo de residencia en el lugar de estudio es alrededor de 13 años para los dos grupos. En cuanto al consumo de tabaco y alcohol un alto porcentaje de donantes de ambos grupos (72,22% y 88,89% respectivamente) que participaron en el estudio refieren no tener estos hábitos, en conclusión, no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados. En el lugar de estudio en donde existe altas concentraciones de MP 2.5, más del 40% de la población está expuesta al polvo y ruido y alrededor de un 10% de la población reside o labora cerca de estaciones de servicio de combustible, es importante mencionar que es una zona comercial y de alto tráfico vehicular.

Tabla 4. Características demográficas entre donantes expuestos a alta concentración y baja concentración de MP 2.5

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	Expuestos alta concentración n = 36 Media ± DE	Expuestos baja concentración n = 34 Media ± DE	p- valor
Edad (años) ¹	36,86 ± 10,99	35,62 ± 9,44	ns
Tiempo de residencia (años) ¹	13,67 ± 9,42	12,76 ± 8,93	ns
	Expuestos alta concentración %	Expuestos baja concentración %	
Género²			
Femenino	50	47,05	ns
Masculino	50	52,95	
Tabaco²			
No fuma	72,22	91,17	ns
Fumador	11,11	2,94	
Fumador pasivo	13,89	5,89	
Exfumador	2,78	0,00	
Alcohol²			
Ingieren alcohol	11,11	8,82	ns
No ingieren alcohol	88,89	91,18	
Exposición a agentes químicos²			
Ninguno	0,00	94,12	< 0,0001
Polvo	46,87	5,88	
Ruido	42,19	0,00	
Combustible	10,94	0,00	

ns: no significativo
1: Mann – Whitney test
2: Chi-square test

Elaborado por: Autor

Fuente: Autor

En la Tabla 5 se observan los antecedentes familiares y personales comparando el grupo de expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 contra el grupo de expuestos a bajas concentraciones de MP 2.5. Al realizar el análisis de la información obtenida con relación a los antecedentes personales y familiares de los donantes que participaron en el estudio, con respecto a problemas de fertilidad, defectos de nacimiento, alteraciones genéticas o cáncer, un 19,45% de los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 o sus familiares refieren haber tenido alguno de los problemas antes mencionados, por lo tanto, se presenta diferencias estadísticas significativas entre grupos. Con respecto a problemas con su descendencia y dificultad para tener hijos no son estadísticamente significativos ($p = 0,2008$ y $p = 0,3277$ respectivamente). Es importante mencionar que los donantes que refirieron tener problemas con su descendencia (abortos 5.55%) no se relacionan con los problemas de fertilidad antes mencionados.

Tabla 5. Comparación entre los antecedentes personales y familiares de la población de estudio

ANTECEDENTES PERSONALES Y FAMILIARES	Expuestos alta concentración n = 36 %	Expuestos baja concentración n = 34 %	p - valor
Problemas de fertilidad, defectos de nacimiento, alteraciones genéticas o cáncer ²			
No o ninguna	80,55	100	0,0115
Si y familiares	19,45	0	
¿Ha tenido dificultad para tener hijos? ²			
No	97,23	100	ns
Si	2,77	0	
Ha tenido problemas con su descendencia ³			
Ninguno	86,11	100	ns
Abortos	5,55	0	
Muertes neonatales	2,78	0	
Bajo peso al nacer	2,78	0	
Partos prematuros, malformaciones, enfermedades congénitas	0	0	
Fecha de última visita médica ²			
0 - 6 meses	63,63	71,43	ns
7 - 12 meses	22,72	14,29	
Más de 1 año	13,63	14,29	
ns: no significativo 2: Chi – square test 3: Kruskal wallis test			

Elaborado por: Autor

Fuente: Autor

Los donantes expuestos a altas y bajas concentraciones de MP 2.5, en el momento del estudio no presentan ningún síntoma y refieren sentirse bien en el momento en que se realiza el estudio.

Sin embargo, el grupo de donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 manifestaron que suelen padecer cefalea, gastritis y rinitis alérgica con un 12,2%, 12,2% y 10,2% respectivamente (Gráfico 1), cabe recalcar que estas patologías se encuentran asociadas a la exposición a contaminantes ambientales. Según el análisis estadístico no existen diferencias significativas entre los grupos analizados con relación a las enfermedades más frecuentes (p-valor >0,05).

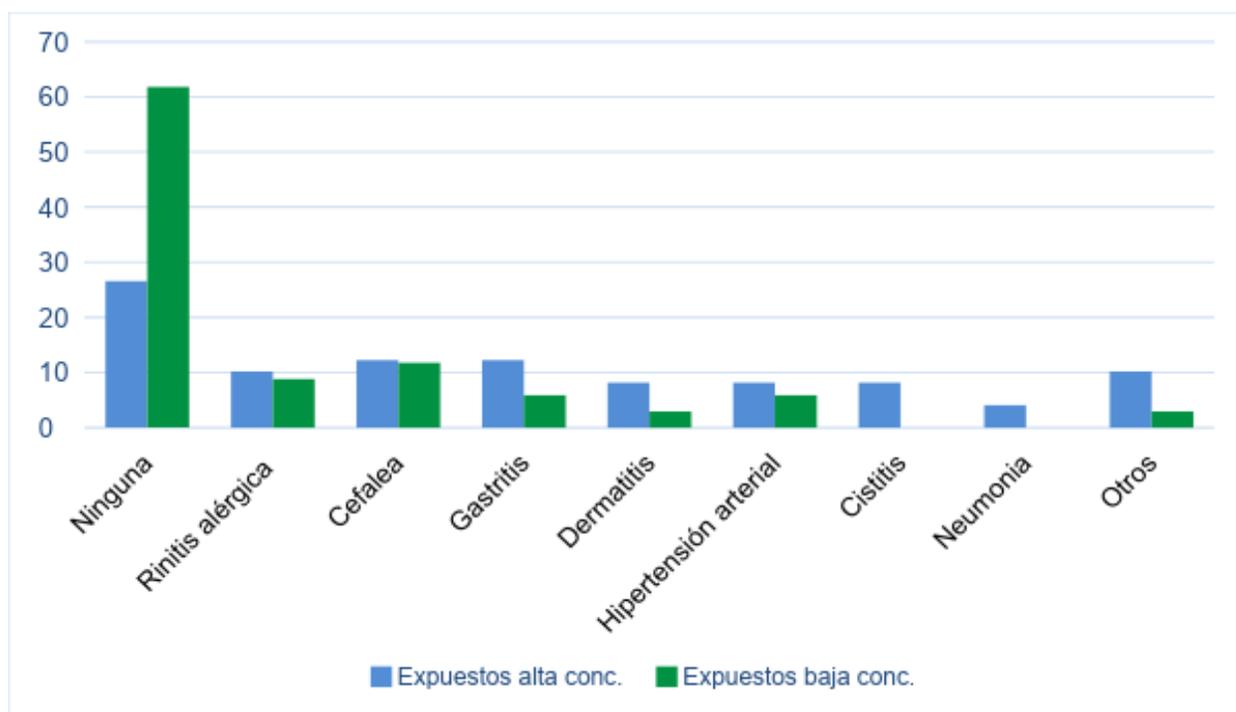


Gráfico 1. Paredimiento de enfermedades de los grupos expuestos a altas y bajas concentraciones de MP 2.5.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

El uso de fármacos también fue un factor evaluado en este estudio, en el Gráfico 2 se observa que los analgésicos son los más utilizados (17,5% donantes expuestos a alta concentración y 31,3% donantes expuestos a baja concentración de MP 2.5), sin embargo, un alto porcentaje de los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 refiere haberse sometido a tratamientos con antibióticos (12,5%) y al hacer el análisis estadístico se obtuvo un p-valor de 0,0369 por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con respecto al uso de antibióticos.

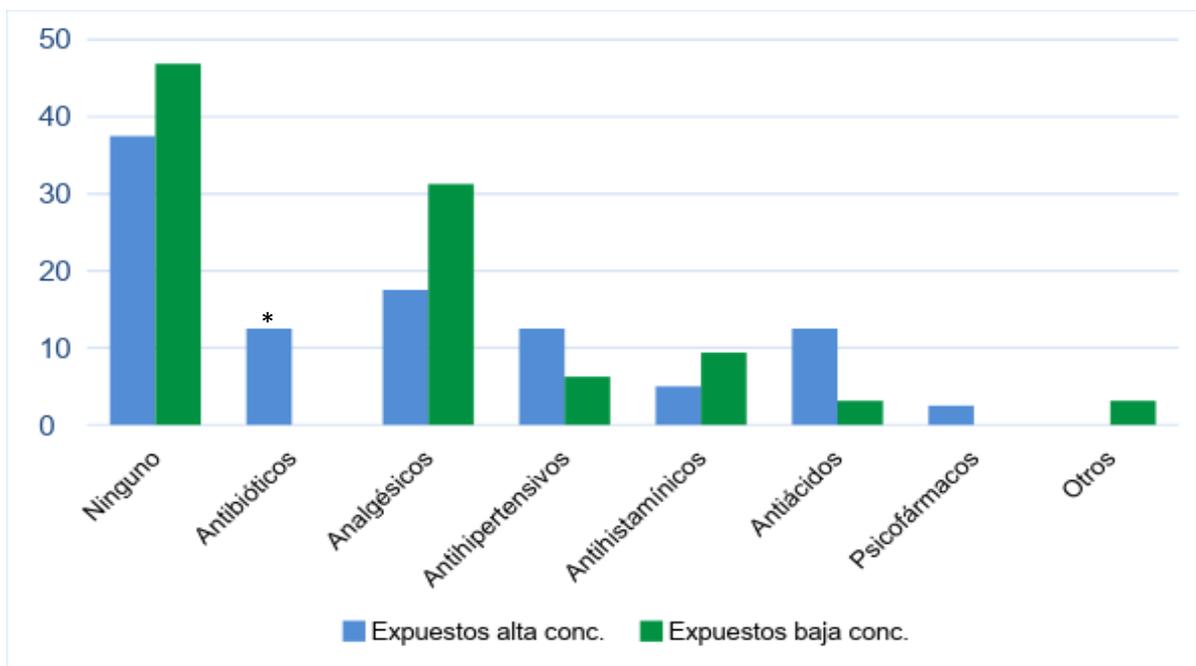


Gráfico 2. Administración de fármacos de los grupos analizados. *Análisis estadístico Mann-Whitney test con un p-valor obtenido de 0,0369 estadísticamente significativo.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

El uso de fármacos puede producir daño del ADN, en el análisis de los antecedentes personales y familiares de los donantes que participaron en el estudio se observó que existe diferencias significativas entre los grupos con respecto al uso de antibióticos, sin embargo, luego de realizar el análisis no existe correlación entre el uso de antibióticos con el daño genotóxico en los donantes que participaron en el estudio, p-valor > 0,05 no existe significancia estadística.

La genotoxicidad producida por el MP 2.5 fue medida mediante el análisis de la longitud de la cola, la intensidad de la cola de los cometas y el daño genotóxico, en el Gráfico 3 se puede observar los resultados obtenidos luego de la valoración estadística de cada parámetro.

De acuerdo a esto los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 son los que presentan mayor daño genotóxico ya que la longitud de la cola de los cometas y el índice de daño genotóxico muestran un incremento en las medias de los grupos analizados siendo esto estadísticamente significativo; es importante mencionar que el número de donantes que participaron en el estudio (expuestos a altas y bajas concentraciones de MP 2.5) es corto, posiblemente si se incrementara el número de la muestra esta diferencia podría ser más notoria.

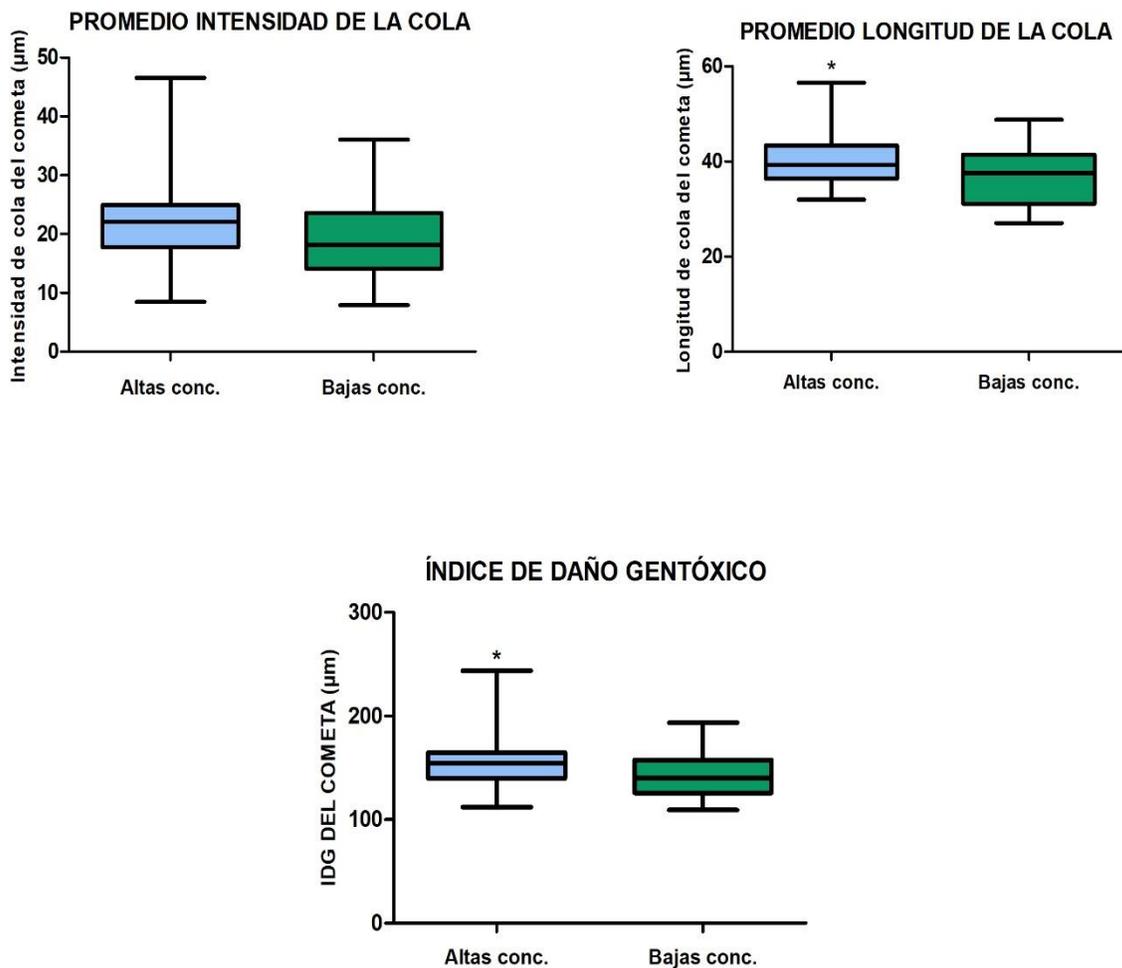


Gráfico 3: Parámetros de daño genotóxico medidos mediante ensayo cometa entre donantes expuestos a alta concentración y baja concentración de MP 2.5. * Indica diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0393$) con respecto al grupo de donantes expuestos a baja concentración de MP 2.5

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

DISCUSIÓN

Considerando las características generales de los donantes del presente estudio, los dos grupos de estudio no mostraron diferencias estadísticamente significativas con relación a la edad, género, tiempo de residencia, hábito de fumar y consumo de bebidas alcohólicas, sin embargo, el grupo de donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 refirieron que en la zona de estudio en donde laboran o residen hay una alta contaminación con polvo y ruido, además al ser una zona comercial y de alto tráfico vehicular también un grupo considerable de donantes están ubicados cerca de la estación de servicio de combustibles.

En cuanto a las enfermedades existe una alta incidencia de donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 que padecen cefalea, gastritis, rinitis alérgica y dermatitis, estas patologías están asociadas con la exposición a contaminantes ambientales lo cual se confirma con un estudio realizado en Europa, en donde se determinó que existe una relación entre la contaminación atmosférica y el padecimiento de enfermedades, ya que en los últimos años el 10 % de la población presentan problemas respiratorios entre ellos rinitis alérgica, asma y en algunos casos dermatitis, los cuales se producen por que al inhalar, ingerir o estar en contacto con el MP 2.5 del aire contaminado estas se depositan a nivel del tracto respiratorio migran hacia la circulación sanguínea y producen problemas cardiovasculares (Ellwood et al, 2005).

En el año 2011, en Colombia, investigadores determinaron que las enfermedades respiratorias son la primera causa de atención primaria en los hospitales y quienes asisten son personas que laboran o viven en espacios urbanos en donde la concentración de MP 2.5 es alta, los síntomas más comunes son inflamación de las vías respiratorias, rinitis alérgica, cefalea, bronquitis, neumonía, entre otros (Martínez et al., 2011); cabe recalcar que el grupo más vulnerable es la población infantil en donde los síntomas producidos por exposición a los contaminantes ambientales son más evidentes (Xing et al, 2016). Cuando existe exposición aguda al MP 2.5 se produce congestión nasal, cefalea, irritabilidad en algunos casos comienzan a desencadenar problemas alérgicos, no obstante, la exposición crónica al MP 2.5 tiende a producir bronquitis obstructiva crónica, asma bronquial e inclusive cáncer pulmonar (Gaviria et al., 2011; López et al, 2007).

Una gran cantidad de estudios experimentales han usado el ensayo cometa para demostrar el efecto genotóxico que produce la exposición a material particulado de las zonas altamente contaminadas (Novotna et al., 2007). En el presente estudio el daño genotóxico es evidente en los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 aunque exista una ligera diferencia

en los valores medios, posiblemente esto se deba a que el tamaño de muestra es limitado, sin embargo, este efecto puede ser más notorio si se incrementa el tamaño de la población estudiada.

Dentro de los parámetros analizados el índice de daño genotóxico y la longitud de la cola fueron estadísticamente significativos, siendo mayor en el grupo de donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2.5. En un estudio realizado al Norte de Santander en Colombia evaluaron la capacidad genotóxica de MP 2.5 utilizando extractos orgánicos y la ocurrencia del daño del ADN fue valorado en la longitud de la cola del cometa, este parámetro fue estadísticamente significativo, lo que indica que la mayoría de las sustancias mutágenos que llegan a la población pueden ingresar a las células y producir daño en el ADN (Gélvez et al., 2012).

En un estudio realizado en varias ciudades de Italia se determinó el daño genotóxico y mutagénico producido por exposición a MP 2.5, el muestreo se realizó a diferentes temperaturas y meses del año y se utilizó dos biomarcadores de genotoxicidad, el test de Ames y el ensayo cometa, y se obtuvo como resultados que la exposición al MP 2.5 produce daño genotóxico y mutagénico, sin embargo, la potencia mutagénica de los contaminantes ambientales no siempre está relacionada con la concentración de partículas en el aire sino, con la composición de las mismas lo que se debe tomar en cuenta para el desarrollo de futuras investigaciones (Bocchi et al., 2017).

En la ciudad de México se determinó el efecto genotóxico in vitro de las aeropartículas de la materia orgánica extraída del ambiente, utilizando el ensayo cometa y determinaron el daño del ADN en linfocitos humanos, sin embargo, los autores afirman que la composición del MP en varias zonas de una misma ciudad puede ser diferente por lo que puede haber sectores en donde se desarrollen enfermedades relacionadas con la mutagenicidad o simplemente generen procesos de tipo inflamatorio (Villalobos et al., 2008).

El Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca (CEA) realizó un estudio de monitoreo de los niveles de MP 2.5 en diferentes sectores de la ciudad, en la zona Sur, que fue donde se realizó el presente estudio, se obtuvieron concentraciones de MP 2.5 a las 24 horas de 30,34 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Astudillo et al., 2018), este valor se encuentra por encima del límite máximo permitido según las directrices sobre la Calidad de Aire establecidas por la OMS (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en un monitoreo de 24 horas) (OMS, 2004), no obstante en la Normativa Ecuatoriana según un el Acuerdo Ministerial 050 (MAE, 2011) establece como límite máximo permitido 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ lo que

indicaría que los valores obtenidos por el CEA en la zona de estudio se encuentran dentro del rango permitido, sin embargo, luego de determinar el efecto genotóxico producido en los donantes que residen o laboran en la zona Sur de la ciudad de Cuenca se observa que a las concentraciones antes mencionadas ya existe un daño genotóxico evidente.

Cabe recalcar que la ciudad de Cuenca es pequeña, sin embargo, con el tiempo asumimos que puede haber un incremento de población y por ende un incremento del tráfico vehicular y si se sigue manteniendo la misma tendencia probablemente el daño genotóxico puede irse incrementando en las futuras generaciones. En Colombia en el año 2014 (Betancur, 2016) se reportó un incremento de la concentración de MP 2.5 de 27,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (2013) a 32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (2014) en estaciones de tráfico, por tal motivo los investigadores determinaron el efecto genotóxico in vitro en células CHO-K1 producido por exposición a esas concentraciones obteniendo diferencias estadísticamente significativas, es decir muestran un efecto dosis-respuesta, a medida que incrementa la concentración del MP 2.5 se incrementa el daño en el ADN y sugieren que el daño podría acumularse y generar daños a nivel del genoma total; resultados similares son reportados por (Lemos et al., 2016) en linfocitos en sangre periférica.

El presente trabajo de investigación permitió determinar que los donantes que participaron en el estudio están expuestos a altas concentraciones de MP 2.5 las cuales producen un daño genotóxico que se ve reflejado en el deterioro de su salud. Por tal motivo, los organismos de control y las autoridades competentes deben tomar precauciones de manera inmediata para disminuir la contaminación del aire de la ciudad de Cuenca lo cual va a verse reflejado en el mejoramiento de la calidad de vida de las personas que residen o laboran en este sector.

Para futuras investigaciones del efecto genotóxico que produce el MP, se debe tomar en cuenta ciertas consideraciones como la temperatura, las condiciones climáticas y las épocas del año ya que esto influye en la concentración y composición del MP en el aire, también se debe considerar que el MP tiene varios compuestos que pueden producir diferentes efectos en el organismo, es importante conocer la composición del MP para establecer exactamente que compuesto produce los efectos genotóxicos en el organismo y relacionar con los síntomas y enfermedades que refieren la población de estudio.

Debido a que la contaminación ambiental es un problema de gran interés a nivel mundial se deben buscar alternativas para mejorar la calidad del aire, una de las alternativas sería impulsar a la población expuesta a utilizar medios de transporte que no produzcan emisión de gases, para movilizarse a lugares cercanos utilizar lo menos posible el vehículo e impulsar a realizar

caminatas, otra de las alternativas sería concientizar a la población en general sobre los efectos que causan en la salud los contaminantes ambientales y el uso del equipo de protección personal para quienes laboren en lugares cercanos a estaciones de servicio de combustibles o carreteras de alto tráfico vehicular.

CONCLUSIONES

- Mediante el ensayo cometa se pudo evaluar el daño genotóxico producido por exposición a altas concentraciones de material particulado MP 2.5 en la población que reside o labora en la zona Sur de la ciudad de Cuenca – Ecuador.
- Existe una correlación entre exposición a altas concentraciones de MP 2.5 y el daño genotóxico, esta correlación es dosis dependiente, es decir que ha mayor concentración de MP en el ambiente mayor daño del ADN.
- La exposición aguda a las altas concentraciones de material particulado MP 2.5 produce efectos en la salud principalmente a nivel del tracto respiratorio, cardiovascular, por tal motivo es importante tomar medidas para mejorar la calidad de aire en la ciudad de Cuenca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aammi, S., Karaca, F., & Petek, M. (2017). A toxicological and genotoxicological indexing study of ambient aerosols (PM_{2.5-10}) using in vitro bioassays. *Chemosphere*, 174(March), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.141>
- Alma, G. (2016). Determinación de la concentración de material particulado atmosférico (MP_{2.5}) en la zona ladrillera de la comunidad de yerbabuena; gto, (1), 216–220.
- Alvarado et al. (2017). Increased methylation of repetitive elements and DNA repair genes is associated with higher DNA oxidation in children in an urbanized, industrial environment. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 813(December), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.007>
- Aránguez, E., Ordóñez, J. M., Serrano, J., Aragonés, N., Fernández-Patier, R., Gandarillas, A., & Galán, I. (1999). Contaminantes atmosféricos y su vigilancia. *Revista Española de Salud Pública*, 73(2), 123–132. <https://doi.org/10.1590/S1135-57271999000200003>
- Arciniegas Suárez, C. A. (2012). Diagnóstico y control de material particulado: partículas suspendidas totales y fracción respirable MP₁₀. *Luna Azul*, (34), 195–213.
- Argumedo, C. D., & Castillo, J. F. (2016). Chemical characterization of particulated atmospheric matter PM₁₀ in Guajira, Colombia | Caracterización química do material particulado PM₁₀ na atmosfera da Guajira, Colombia | Caracterización química de material particulado PM. *Revista Colombiana de Química*, 45(2), 19–29. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.56991>
- Astudillo-Alemán, A. L., Ramirez Orellana, M. I., Garcia Alvear, N. B., Gónzales Arévalo, G. J., Gutierrez Valle, I. A., & Bailón Moscoso, N. C. (2015). Caracterización química del material particulado {PM}₁₀ de la zona urbana de {Cuenca}- {Ecuador} e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares {A}549. *Revista de Toxicología*, (32), 121–126.
- Astudillo, A., Moscoso, D., & Ambientales, C. D. E. (2018). Niveles de material particulado en la zona urbana de Cuenca - Ecuador y su relación con el tráfico vehicular, 9(20), 41–55.
- Beleño H, R., Quijano P, A., & Meléndez G, I. (2013). Mutagenic and genotoxic activity of particulate matter PM_{2.5} from Cucuta, Colombia. *Rev.MVZ Córdoba*, 18(Supl), 3731–3737.
- Betancur, A. (2016). Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del material químico en filtros

- PM 2.5 de las estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá, 47. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/51942/1/1128438656.2016.pdf>
- Beri et al. (2010). GENOTOXIC EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS GENOTOXIC MONITORING AND DETECTION OF ANTIGENOTOXIC EFFECTS, 378–382.
- Bocchi, C., Bazzini, C., Fontana, F., Pinto, G., & Cassoni, F. (2017). Genotoxicity of airborne PM_{2.5} assessed by salmonella and comet assays in five cities of the Emilia-Romagna (Italy) mutagenicity monitoring network. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(9), 719–729. <https://doi.org/10.1002/em.22141>
- Bo-chiuan Chen, Juhua Luo, M. H. (2015). Zinc compound air releases from Toxics Release Inventory facilities and cardiovascular disease mortality rates. *Environmental Research*, 142, 96–103.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Dalboni, S. P., Campagnaro, B. P., Tonini, C. L., Vasquez, E. C., & Meyrelles, S. S. (2012). The Concurrence of Hypercholesterolemia and Aging Promotes DNA Damage in Apolipoprotein E-Deficient Mice, 2012(September), 51–55.
- Di, A., Visalli, G., La, S., Micale, R., Baluce, B., Matarese, G., ... Elena, M. (2008). Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings, 650, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.023>
- Ellwood, P., Asher, M. I., Beasley, R., Clayton, T. O., & Stewart, A. W. (2005). The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods. *Int J Tuberc Lung Dis*, 9(1), 10–16. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00090303>
- E, T. (2017). Test del cometa en sangre periférica de estudiantes fumadores de la facultad de ciencias de la salud
- Elvira Palacios, C. E. (2014). Contaminación del aire exterior. Cuenca - Ecuador, 2009 - 2013. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas Universidad de Cuenca*, 32(2), 34,56.
- Falcon et al. (2016). Aeroparticles, composition, and lung diseases. *Frontiers in Immunology*, 7(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>
- Falcon et al. (2017). Air pollution and genomic instability: The role of particulate matter in lung

- carcinogenesis. *Environmental Pollution*, 229, 412–422.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.019>
- Franken, C., Koppen, G., Lambrechts, N., Govarts, E., Bruckers, L., Den Hond, E., ... Schoeters, G. (2017). Environmental exposure to human carcinogens in teenagers and the association with DNA damage. *Environmental Research*, 152(January), 165–174.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.10.012>
- Gaviria, C., Benavides, P., & Tangarife, C. (2011). Contaminación por material particulado (PM2.5 y PM10) y consultas por enfermedades respiratorias en Medellín (2008-2009). *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 29(3), 241–250.
- Garcia, H. (2006). *Evaluación del riesgo por emisiones de partículas en fuentes estacionarias de combustion.*
- Gélvez, I. M., Montañez, M. L. M., & Parra, A. Q. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP 2.5 en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia*, 25(4), 347–356.
- Geovanny Aldaz. (2017). Material Particulado y la afección a las vías respiratorias de los trabajadores del area de molino de la empresa Ecuacauchos.
- Guillermo M Zúñiga Gonzalez, B. C. G. M. y. (2007). Genotoxicidad y potencial teratógeno. *Revista de Divulgación Científica y Tecnología de La Universidad Veracruzana*, XX(3), 127–150.
- Hartmann et al. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45–51.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Monty Krieger, Antony Brestscher, A. A. (2016). *Biología celular y molecular* (7th ed.).
- INECC Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2010). Manual 1: Principios de medición de la calidad del aire, 1–43.
- Lemos, A. T., Lemos, C. T. de, Flores, A. N., Pantoja, E. O., Rocha, J. A. V., & Vargas, V. M. F. (2016). Genotoxicity biomarkers for airborne particulate matter (PM2.5) in an area under petrochemical influence. *Chemosphere*, 159, 610–618.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.087>

- Lopez, M., Mongilardi, N., & Checkley, W. (2014). Chronic obstructive pulmonary disease by biomass smoke exposure. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(1), 94–99. Retrieved from http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000100014&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- López, E. M., Quiroz, C. M., Cardozo, F. D., & Espinosa, A. M. (2007). Contaminación atmosférica. *Facultad Nacional de Salud Pública-Universidad de Antioquia*, 3, 106. Retrieved from [http://itagui.aredigital.gov.co/institucional/Documents/ContaminacionAtmosferica_y_efectos_hacia_la_salud_-_Efectos_en_la_Salud_\[3_de_4\].pdf](http://itagui.aredigital.gov.co/institucional/Documents/ContaminacionAtmosferica_y_efectos_hacia_la_salud_-_Efectos_en_la_Salud_[3_de_4].pdf)
- MAE. (2011). Norma de calidad del aire ambiente o nivel de inmisión. Retrieved from <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/10/Acuerdo-50-NCA.pdf>
- MAE Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2011). Norma de calidad del aire ambiente o nivel de inmisión. Retrieved from <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/10/Acuerdo-50-NCA.pdf>
- Marcos Restrepo, María Velez, Esteban Vallejo, L. M. (2016). Impacto Clínico De La Contaminación Aérea. *Revista de Medicina*, 57(4), 373–384.
- Martínez. L. E., Quiroz, C. M., & Rúa, J. A. (2011). Morbilidad respiratoria asociada con la exposición a material particulado en el ambiente. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 29(4), 454–460. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572015000500014>
- Mata, E. V. (2011). Calidad del aire y sus efectos en la salud humana. *CEGESTI-Éxito Empresarial*, (149), 1–5.
- Matheus, T., & Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: Biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18(2), 18–26.
- Medina, M. G. O., Montañó, A. F., Davydova-Belitskaya, V., Chávez, G. G., & Gallardo, T. P. (2017). PM10 y O3 como factores de riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y neumonía en la Zona Metropolitana de Guadalajara, Jalisco, México. *Ingeniería Revista Académica de La Facultad de Ingeniería Universidad Autónoma de Yucatán*, 20(1), 14–23.
- Mórocz, M., Gali, H., Raskó, I., Downes, C. S., & Haracska, L. (2013). Single Cell Analysis of Human RAD18-Dependent DNA Post-Replication Repair by Alkaline Bromodeoxyuridine

- Comet Assay. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070391>
- Novotna, B., Topinka, J., Solansky, I., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., & Sram, R. J. (2007). Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen, 172, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.05.013>
- OMS Organización Mundial Salud. (2005). WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_spa.
- OMS Organización Mundial de la Salud, O. M. D. L. S. (2004). Guías para la calidad del aire, 1–239. <https://doi.org/OPS/CEPIS/PUB/04.110>
- Palacios, E., & Espinoza, C. (2014). Contaminación Del Aire Exterior. Cuenca - Ecuador, 2009-2013. Posibles Efectos En La Salud. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas Universidad de Cuenca*, 32(2), 6–17.
- Paola García, J. M. (2015). Estrés Oxidativo, Daño al Adn y Cancer. *Revista de Ciencias Biomédicas*, 107–117.
- Peixoto, M. S., de Oliveira Galvão, M. F., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2017). Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.076>
- Pope, C. A., & Dockery, D. W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 56(6), 709–742. <https://doi.org/10.1080/10473289.2006.10464485>
- Préndez, M., Corvalán, R. M., & Cisternas, M. (2007). Estudio preliminar del material particulado de fuentes estacionarias: Aplicación al sistema de compensación de emisiones en la region metropolitana, Chile. *Informacion Tecnologica*, 18(2), 93–103. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642007000200015>
- Quijano, A., Quijano, M. J., Quijano, L. A., & Manzano, S. T. (2015). Air Toxicity of the City of Villa Del Rosario in Samples of, 88.
- Radharani, A. (2017). *Evaluación de Material Particulado Fino en escuelas primarias de la mitad del mundo*.
- Red de Monitoreo de Calidad del Aire de Cuenca de la EMOV EP. (2015). Informe de la Calidad del Aire de Cuenca, 124. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., & Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del

ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 35(2), 184–194.

Rosas, R., Ochoa, A., Morillo, D., & García, N. (2015). Exposición a Monóxido de Carbono en trabajadores de control vehicular-Cuenca: estudio exploratorio, 75–93.

Traversi, D., Degan, R., De Marco, R., Gilli, G., Pignata, C., Villani, S., & Bono, R. (2009). Mutagenic properties of PM2.5 urban pollution in the Northern Italy: The nitro-compounds contribution. *Environment International*, 35(6), 905–910. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.03.010>

Ubilla, C., & Yohannessen, K. (2017). Contaminación Atmosférica Efectos En La Salud Respiratoria En El Niño. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(1), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2016.12.003>

Valavanidis, A., Fiotakis, K., & Vlachogianni, T. (2008). Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 26(4), 339–362. <https://doi.org/10.1080/10590500802494538>

Vargas Marcos, F. (2005). *La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. Revista Española de Salud Pública*. <https://doi.org/10.1590/S1135-57272005000200001>

Villalobos, Amador, Flores, G. (2008). Materia orgánica extraída de las aeropartículas de la Ciudad de México y sus efectos genotóxicos, 105–109.

Zuluaga M, Valencia A, O. I. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos, (November).

Xing, Y. F., Xu, Y. H., Shi, M. H., & Lian, Y. X. (2016). The impact of PM2.5 on the human respiratory system. *Journal of Thoracic Disease*, 8(1), E69–E74. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.19>