



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGISTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y DIAGNÓSTICO DE
LABORATORIO

**Determinación del daño genotóxico en población expuesta a material
particulado MP 2,5 mediante ensayo de micronúcleos en la zona Sur de la
ciudad de Cuenca – Ecuador.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Riera Astudillo, Pablo Fabricio

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: Determinación del daño genotóxico en población expuesta a material particulado MP 2,5 mediante ensayo de micronúcleos en la zona Sur de la ciudad de Cuenca – Ecuador, realizado por Riera Astudillo Pablo Fabricio, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre de 2018

Firma:

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Riera Astudillo Pablo Fabricio declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Determinación del daño genotóxico en población expuesta a material particulado MP 2,5 mediante ensayo de micronúcleos en la zona Sur de la ciudad de Cuenca – Ecuador, de la Titulación Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio, siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso, PhD 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, 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 realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

F.

Autor: Pablo Fabricio Riera Astudillo

Cédula: 0105832059

DEDICATORIA

Este proyecto que nació de la motivación que me han dado mis padres, hermanos, mi querida esposa y familiares, por ello les dedico mi tesis.

Toda la fortaleza que han impregnado a mi corazón mis amados padres su ejemplo de vida, constancia y lucha la he reflejad en esta tesis.

Mi hermano y hermana que me han brindado su incondicional apoyo, muchas veces con su motivación y compartir buenos momentos.

La confianza brindada por mi querida esposa, mi compañera de vida que ha sacrificado ha horas de su tiempo para brindarme apoyo humano y profesional.

AGRADECIMIENTO

Le doy gracias infinitas a Dios por ser la luz que siempre guía mi camino, a mis formadores académicos quienes con gran sabiduría, esfuerzo y sacrificio me han impartido los conocimientos necesarios para poder culminar una meta importante en mi vida.

A mis padres que con su calor humano y sus logros han sido un gran ejemplo para seguir.

A mi amada esposa por su paciencia y sus sabios consejos que me han ayudado a nunca desfallecer ni rendirme en los momentos difíciles.

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 ambiental	6
1.2 Factores que afectan la concentración de los contaminantes del aire	6
1.3 Medición de la calidad del aire.....	6
1.4 Clasificación de los contaminantes ambientales.....	7
1.4.1 Fuentes antropogénicas primarias.	7
1.4.2 Fuentes antropogénicas secundarias.	7
1.5 Contaminación ambiental por material particulado	7
1.5.1 Composición	8
1.5.2 Clasificación.....	8
1.6 Contaminación ambiental en la ciudad de Cuenca	8
1.7 Contaminación ambiental y efectos en la salud	9
1.7.1 Efectos sobre el sistema respiratorio.	10

1.7.2	Efectos sobre el sistema cardiovascular.....	11
1.7.3	Contaminantes ambientales y mutaciones.	11
1.8	Biomarcadores de genotoxicidad	12
1.9	Ensayo de micronúcleos.....	12
1.9.1	Fundamento ensayo de micronúcleos.	12
1.9.2	Aplicaciones ensayo de micronúcleos.	13
CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....		14
2.1	Objetivo general del proyecto.	15
2.2	Objetivos específicos del proyecto.	15
CAPITULO III. MÉTODOS.....		16
3.1	Tipo de estudio.....	17
3.2	Área de estudio	17
3.3	Población de estudio.....	19
3.3.1	Criterios de Inclusión	19
3.3.2	Criterios de Exclusión	19
3.4	Obtención de la muestra	19
3.5	Transporte de muestra.....	20
3.6	Metodología del ensayo de micronúcleos	20
3.6.1	Preparación de la muestra.....	20
3.6.2	Fijación de la muestra.....	20
3.6.3	Tinción de la muestra.	20
3.6.4	Conteo de células.	21
3.6.5	Análisis estadístico.	21
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		23

RESULTADOS	24
4.1 Características demográficas de la población de estudio	24
4.2 Evaluación de los antecedentes personales de la población de estudio.	25
4.3 Estudio de las alteraciones nucleares.	28
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES.....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo determinar el daño genotóxico en población expuesta a altas concentraciones de material particulado MP 2,5 mediante ensayo de micronúcleos en el Suroeste de la ciudad de Cuenca - Ecuador. En el estudio participaron 70 donantes quienes residen o laboran en zona Suroeste de la ciudad de Cuenca y están expuestos a altas y bajas concentraciones de MP 2,5. Mediante el ensayo de micronúcleos y el resto de las anomalías nucleares en células del epitelio bucal se determinó la frecuencia de estos en 1000 células. Se realizó la estadística descriptiva para cada grupo y el análisis de las pruebas no paramétricas mediante la prueba t – Student utilizando el software estadístico Graphpad Prism 5. Los resultados obtenidos mostraron daño genotóxico asociado a la exposición a altas concentraciones de MP 2,5 en la zona Suroeste de la ciudad de Cuenca, lo que representa un alto riesgo de padecer enfermedades. Se concluye que los donantes expuestos altas concentraciones de MP 2,5 muestran un daño genotóxico evidente. Estos resultados son de gran relevancia en la determinación de futuros estudios.

Palabras clave: Contaminación ambiental, daño genotóxico, ensayo de micronúcleos, MP 2,5.

ABSTRACT

The present study aims to determine the damage genotoxic population exposed to high concentrations of material in particulate PM 2,5 using micronucleus test in the southwest of the city of Cuenca - Ecuador. The study involved 70 donors who reside or work in the area southwest of the city of Cuenca and are exposed to high and low concentrations of PM 2,5. Using the micronucleus test and the rest of the nuclear anomalies in buccal epithelial cells was determined the frequency of these 1000 cells. The descriptive statistics analysis for each group and analysis of the nonparametric tests using the test t - student using the statistical software Graphpad prism 5. The results showed genotoxic damage associated with exposure to high concentrations of PM 2,5 in the area southwest of the city of Cuenca, which represents a high risk of disease. In conclusion that exposed donors high concentrations of MP 2,5 are clearly genotoxic damage. These results with highly relevant in the determination of future studies.

Keywords: Environmental pollution, genotoxic damage, micronucleus assay, PM 2,5.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años a nivel mundial se han realizado varias investigaciones con el único objetivo de disminuir la contaminación del ambiente, sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos la contaminación del aire sigue siendo un tema de importancia (EEA, 2004).

La modernización y el desarrollo poblacional acelerado han contribuido con el incremento del tráfico vehicular, industrias y estación de servicio de combustibles, lo cual se ve reflejado en un aumento de la contaminación del aire a nivel mundial y su impacto en la salud humana principalmente con el desarrollo del cáncer se ha convertido en un tema principal de investigación (Xing et al. 2016).

Los contaminantes del aire se clasifican en partículas en suspensión entre ellas están el polvo, los gases, hollín, humos, entre otros; que están constituidos por ozono, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y el material particulado (Valavanidis et al., 2008). Se conoce como material particulado (MP) al conjunto de partículas suspendidas de diferentes tamaños y composición química ya sean sólidas o líquidas que son emitidas al ambiente de entre las cuales se destacan el polvo, el hollín del diésel, y las partículas que resultan de los procesos industriales (Arciniegas, 2012).

Cuenca es una ciudad en donde varios sectores tiene alta contaminación del aire, debido al incremento del parque automotor, a un gran número de estación de servicios y una amplia área industrial, pero se desconoce los posibles efectos genotóxicos que pueden producir la exposición a los contaminantes ambientales emitidos al aire exterior sabiendo que los mismos poseen un potente efecto genotóxico y carcinogénico y puede producir enfermedades a los humanos expuestos (Jerves, 2016).

El ensayo de micronúcleos es uno de los biomarcadores genotóxicos más usados para detectar daño genotóxico, en donde se valora las anomalías nucleares formadas por un daño producido a nivel del ADN, cabe recalcar que es fundamental la integridad celular para mantener la salud de las personas, ya que pequeñas alteraciones en el mismo constituyen lesiones potenciales (Mendoza et al., 2013).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente se han diseñado algunos objetivos para resolver a la problemática planteada. El objetivo general en este estudio es determinar el daño genotóxico en población expuesta a altas concentraciones de material particulado MP 2,5 mediante ensayo de micronúcleos en el sector Suroeste de la ciudad de Cuenca – Ecuador. Los objetivos específicos son: Determinar la correlación que existe entre la exposición a altas concentraciones de material

particulado MP 2,5 y el daño genotóxico y determinar el daño genotóxico mediante el ensayo de micronúcleos tanto en donantes expuestos a altas concentraciones como en donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Contaminación ambiental

El aire está compuesto por una mezcla de gases que permanecen alrededor del planeta dando lugar a la atmósfera terrestre, por lo tanto, se considera esencial para la vida, el problema de la contaminación de aire constituye un asunto de vida o muerte para los seres vivos (Borrego et al., 2012), por lo tanto uno de los mayores problemas que enfrenta la sociedad actual.

La contaminación ambiental se define como la conglomeración de diferentes sustancias presentes en la atmósfera en concentraciones que puede interferir en la salud, seguridad y bienestar de los seres vivos lo cual afecta la supervivencia y la calidad de vida de los mismos (Salinas, 2012). Los contaminantes ambientales son en su mayoría emitidos por industrias y vehículos automotores que utilizan diésel y gasolina como combustible (Gaviria et al., 2011), aunque también se pueden encontrar elementos biológicos como bacterias, virus, polen y esporas (OMS, 2005).

1.2 Factores que afectan la concentración de los contaminantes del aire

La concentración de las sustancias contaminantes del aire depende de dos factores de la magnitud de las fuentes de emisión y de la eficiencia de su dispersión; la variación de la concentración de los contaminantes están relacionadas con las condiciones meteorológicas, por lo tanto viento es un elemento clave en la dispersión de las partículas en el aire por lo tanto en zonas o sectores en donde existe una mayor circulación del aire las partículas se dispersan fácilmente (OMS, 2004).

1.3 Medición de la calidad del aire

Las mediciones de la calidad del aire generalmente se reportan como concentraciones medias diarias o anuales de las partículas por metro cúbico (m^3) de aire y se expresa al MP en microgramos por metro cúbico ($\mu g/m^3$) (Tabla 1). En el año 2005 fueron publicadas las Directrices de la OMS sobre la Calidad del Aire en las cuales se señalan los límites de concentración de los contaminantes ambientales (OMS, 2005).

Tabla 1. Valores de MP fijados en las Directrices de la OMS

MP 2,5		MP 10	
Media anual	10 $\mu g/m^3$	Media anual	20 $\mu g/m^3$
Media diaria (24 horas)	25 $\mu g/m^3$	Media diaria (24 horas)	50 $\mu g/m^3$

Fuente: (OMS, 2005)

Elaborado por: Autor

La Normativa Ecuatoriana de la Calidad del Aire en el año 2011 también establece los límites permisibles de los contaminantes ambientales (Tabla 2) e inclusive plantea métodos y procedimientos para la determinación de los mismos (MAE, 2011).

Tabla 2. Valores de MP fijados en la Normativa Ecuatoriana

MP 2,5		MP 10	
Media anual	15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media anual	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Media diaria (24 horas)	50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Media diaria (24 horas)	100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Fuente: (MAE, 2011)

Elaborado por: Autor

1.4 Clasificación de los contaminantes ambientales

Generalmente los contaminantes del aire se clasifican en material particulado (polvos, neblinas, humos), contaminantes gaseosos (gases y vapores) y olores (OMS, 2004). No obstante, los contaminantes ambientales se clasifican de acuerdo a la fuente de emisión de la siguiente manera (Oyarzún, 2010):

1.4.1 Fuentes antropogénicas primarias.

Se originan por la actividad humana, combustión de fósiles para la producción de energía, calefacción doméstica, industria metálica, gases emitidos por los combustibles de vehículos, desgaste de los neumáticos, polvo emitido por los frenos (Oyarzún, 2010).

1.4.2 Fuentes antropogénicas secundarias.

Gases reactivos como dióxido de azufre (SO_2), dióxido de nitrógeno (NO_2), gases orgánicos emitidos en la atmósfera y partículas que se forman por reacciones químicas tales como hidrólisis, oxidación y reacciones fotoquímicas (Oyarzún, 2010).

1.5 Contaminación ambiental por material particulado

La contaminación por material particulado constituye uno de los principales problemas a nivel mundial, ya que la exposición a estas partículas se ha asociado con efectos adversos para la salud. Las principales fuentes de emisión son los procesos de combustión, y las actividades industriales (Gélvez et al ., 2012).

1.5.1 Composición

El MP está constituido por una mezcla heterogénea de compuestos químicos y/o elementos biológicos de diferente composición, los cuales son emitidos directamente a la atmósfera o luego de haber sufrido reacciones químicas. Dentro de los contaminantes están las partículas de carbono elemental, compuestos orgánicos, sulfatos, nitratos y metales como arsénico (As), cadmio (Cd), hierro (Fe), zinc (Zn), cromo (Cr), cobre (Cu), aluminio (Al), vanadio (V), plomo (Pb) (Gélvez et al., 2012).

1.5.2 Clasificación.

De acuerdo a su proceso de formación las partículas se dividen en dos grupos:

- ✓ Partículas gruesas o MP 10 son de diámetro aerodinámico $\geq 10 \mu\text{m}$, son producto de la combustión no controlada y están relacionadas con la desintegración mecánica de la materia o re suspensión de partículas en el ambiente (Londoño, 2008). Son menos peligrosas y menos tóxicas porque estas partículas se quedan retenidas en las vellosidades de la cavidad nasal o en las mucosas de la cavidad bucal (Mai Tra, 2011).
- ✓ Partículas finas o MP 2,5, son de diámetro aerodinámico $\leq 2,5 \mu\text{m}$, son partículas ácidas, contienen hollín y otros derivados de las emisiones de los vehículos y de las industrias (Londoño et al., 2008). Son de mayor peligrosidad porque son fácilmente respirables, penetran los pulmones y se depositan en la región traqueo bronquial y alveolar del tracto respiratorio, las sustancias orgánicas se quedan adheridas lo que incrementa su toxicidad (Mai Tra, 2011).

1.6 Contaminación ambiental en la ciudad de Cuenca

La ciudad de Cuenca es la tercera ciudad del Ecuador, se encuentra ubicada al sur del país y cuenta con una población de 505.585 habitantes (INEC, 2010). La ciudad tiene un clima templado con una temperatura promedio de 15°C, 75% de humedad relativa y se encuentra a una altura media de 2550 metros sobre el nivel del mar (Palacios y Espinoza, 2014).

En el año 2007 el Municipio de Cuenca, comenzó a realizar el monitoreo de contaminantes ambientales en varios puntos de la ciudad (Figura 1) y determinaron que la principal fuente emisora de contaminantes fue el tráfico vehicular que aporta con un 85 % de las emisiones totales además determinaron que en todos los puntos analizados el MP 10 se encontraba por encima de los niveles según la guía de la OMS con un promedio de 32, 4 a 42 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Cuenca es la cuarta ciudad del Ecuador con mayor índice de MP en el aire urbano esto es debido al creciente desarrollo de la industria y del parque automotor el cual se estima un crecimiento de 10.000 vehículos anualmente (Astudillo et al., 2015).

Según evidencias científicas los contaminantes ambientes producen daños a la salud y al estar los mismos en altas concentraciones incrementan el riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón y enfermedades cardiovasculares (Palacios y Espinoza, 2014).

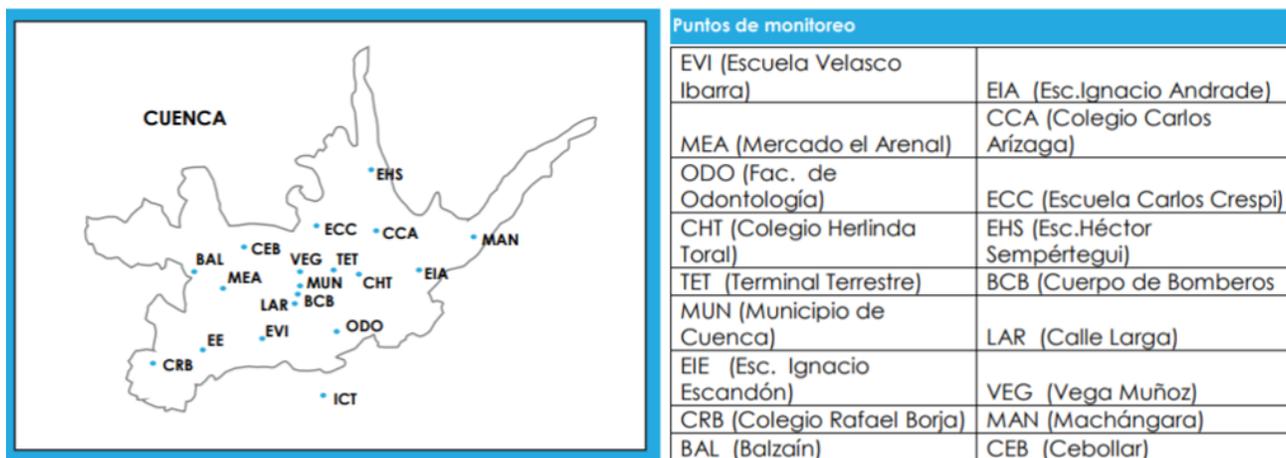


Figura 1. Puntos de monitoreo de contaminantes ambientales en la ciudad de Cuenca

Fuente: (Palacios y Espinoza, 2014)

Elaborado por: (Palacios y Espinoza, 2014)

1.7 Contaminación ambiental y efectos en la salud

Se ha determinado que existe una correlación entre la contaminación del aire y la salud humana, mientras mayor sea el tiempo de exposición al material particulado mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón y enfermedades cardiovasculares, se estima que una exposición a concentraciones de MP $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por largo tiempo aumento un 8% el índice de mortalidad por cáncer de pulmón en adultos (Pope, 2006); sin embargo hay que considerar factores relacionados como son el hábito de fumar, dieta y ambiente laboral (Pavel et al., 2008).

Los vehículos que funcionan con motores a diésel o gasolina emiten material particulado muy tóxico ya que tiene propiedades cancerígenas y puede causar enfermedades en el tracto respiratorio, a nivel cardiovascular o reacciones alérgicas. Los efectos tóxicos y cancerígenos del aire contaminado se han asociado a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Wang et al., 2008).

La exposición a contaminantes ambientales ocurre por 3 vías principalmente: vía inhalatoria, vía digestiva y vía dérmica (Cosselman et al., 2015). La vía aérea es el principal punto de acceso de los contaminantes ambientales al organismo, por esta razón la mala calidad del aire afecta

principalmente al sistema respiratorio. Los contaminantes provocan inflamación de las vías respiratorias, saturan las vías responsables de la descongestión y alteran los sistemas tanto de reparación de tejidos como de defensa inmunológica (Santurtún et al., 2017)

Se ha determinado que las partículas MP 2,5 y MP 10 tienen la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno que generan en las células estrés oxidativo, además, pueden inducir mutaciones ya que algunos contaminantes son carcinógenos humanos reconocidos (Beleño et al., 2013).

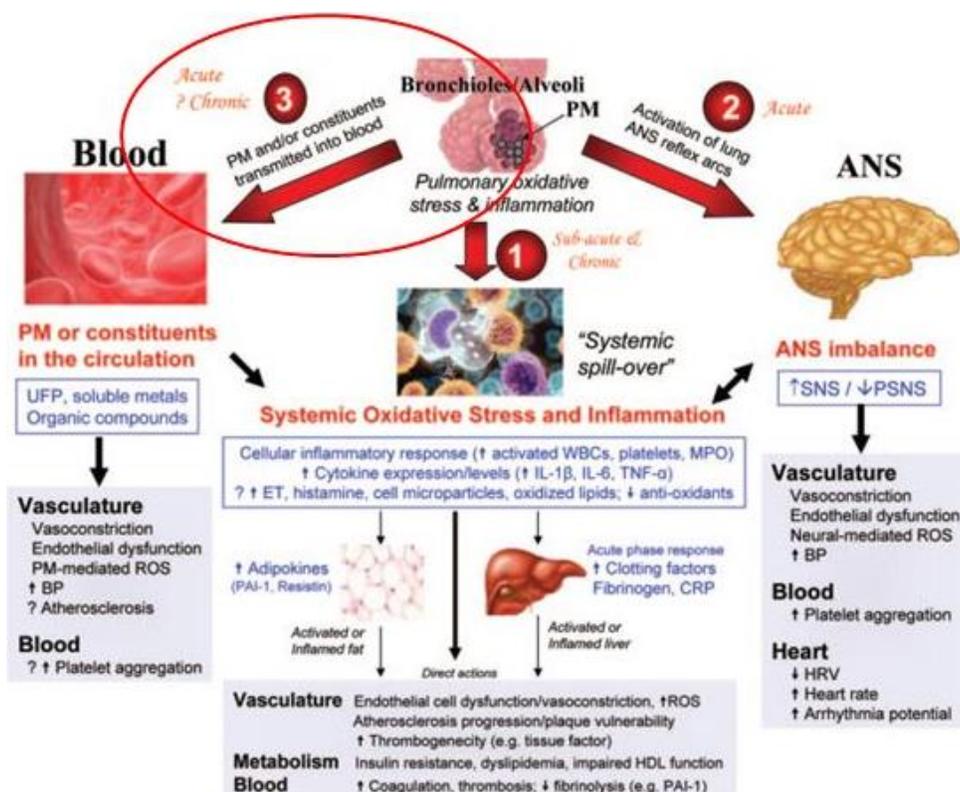


Figura 2: Contaminación ambiental efectos en la salud

Fuente: (Brook et al., 2010)

Elaborado por: (Brook et al., 2010)

1.7.1 Efectos sobre el sistema respiratorio.

Los efectos de los contaminantes en el organismo dependen de varios factores entre ellos están la concentración de los contaminantes, el tiempo de exposición, la susceptibilidad de las personas expuestas. Los niños y los adultos mayores son especialmente más susceptibles a los efectos de los contaminantes, en el caso de los niños aún no desarrollan plenamente los mecanismos de defensa por lo que presentan mayor dificultad de eliminación de partículas desde las vías aéreas,

cabe recalcar que este grupo de personas pasan realizando actividades la mayor parte del tiempo al aire libre (Aránguez et al., 1999).

El tamaño de las partículas está relacionado con el daño que producen en el organismo mientras más pequeñas las partículas pueden penetrar directamente al interior de los pulmones; la exposición a estos contaminantes pueden contribuir a la disminución de la función pulmonar y pueden presentar algunos efectos como interferir con uno o más mecanismos del aparato respiratorio, actuar como vehículo de sustancias tóxicas absorbidas o adheridas a su superficie, alteración del sistema de defensa del organismo y daños del tejido pulmonar (Khafaie et al., 2016).

Los síntomas incluyen irritación de las vías respiratorias, disnea, rinitis alérgica y un aumento del riesgo de bronquitis obstructiva crónica, enfisema pulmonar, asma bronquial y cáncer pulmonar (Oyarzún, 2010).

1.7.2 Efectos sobre el sistema cardiovascular.

Los mecanismos fisiopatológicos mediante los cuales los contaminantes ambientales producen daño cardiovascular todavía no están claros, pero se estima que están relacionados con una enfermedad respiratoria de base; sin embargo, entre los mecanismos que pueden estar alterados por la presencia de partículas respirables se encuentran:

- a) Alteración de los canales de calcio en las células del miocardio.
- b) Contaminantes ácidos producen irritación de las vías respiratorias y provoca broncoespasmo agudo, edema pulmonar, hipoxia e incremento de la demanda de oxígeno.
- c) Inflamación y disfunción endotelial lo que produce una hipercoagulabilidad sanguínea y provoca inestabilidad de la placa aterosclerótica lo que incrementa la probabilidad de formación de coágulos y con esto una isquemia del miocardio.
- d) Alteraciones del sistema nervioso autónomo (Riojas et al., 2006).

1.7.3 Contaminantes ambientales y mutaciones.

Varios estudios epidemiológicos explican que el desarrollo del cáncer se produce por la presencia de mutágenos en el ambiente, se ha demostrado que la frecuencia de mutaciones incrementa más en los lugares cercanos a industrias y zonas de alto tráfico vehicular (Saiyed et al., 2001).

Las mutaciones que ocurren en el material genético de una célula, pasan a las células hijas, estas mutaciones se acumulan y al comprometer genes se favorece la formación de células cancerosas. Un gen supresor tumoral es el encargado de reducir la probabilidad de que una célula se transforme en una célula cancerígena y su función es inhibir la proliferación celular excesiva; cuando existe

una mutación o delección en el gen supresor se incrementa la probabilidad de que se forme un tumor, las mutaciones acumuladas en células somáticas favorecen la aparición del cáncer (Zuluaga et al., 2009).

1.8 Biomarcadores de genotoxicidad

Los biomarcadores de genotoxicidad son de gran utilidad para detectar enfermedades genéticas y riesgo de cáncer en humanos; el principal objetivo de la realización de estas pruebas es el biomonitorio humano para determinar si el cáncer se fue inducido por el medio ambiente, es decir las interacciones humano – genotóxico (Pavel et al., 2008).

Estos biomarcadores evalúan varias etapas comienzan con la exposición seguido de la absorción, metabolismo, distribución, interacción con el genotóxico (daño y reparación del ADN), cambios genéticos y finalmente enfermedad (Pavel et al., 2008).

1.9 Ensayo de micronúcleos

Se ha encontrado que la exposición a contaminantes ambientales causa daño a la salud provocando toxicidad reproductiva, afección de órganos, cáncer y genotoxicidad (Bugar et al., 2016). El ensayo de micronúcleos en células de la mucosa bucal es un método de laboratorio mínimamente invasivo que permite estudiar el daño del ADN, inestabilidad cromosómica, muerte celular y el potencial regenerativo de la mucosa bucal humana (Thomas et al., 2009).

1.9.1 Fundamento ensayo de micronúcleos.

Este ensayo se fundamenta en la colección de células bucales usando un cepillo citológico estéril, se genera una suspensión de células individuales mediante centrifugación las cuales son dispersadas en un portaobjetos una vez que hayan sido fijadas y finalmente se realiza la tinción con Giemsa que colorea el citoplasma de las células de color rosado y el núcleo de color azul que se observa en un microscopio óptico (Thomas et al., 2009).

Las células normales se pueden distinguir de las consideradas anormales por la relación núcleo-citoplasma y la morfología nuclear, por lo tanto, nos permite evaluar el daño del ADN (micronúcleos y/o brotes nucleares), defectos citocinéticos (células binucleadas), potencial proliferativo (frecuencia de células basales) y muerte celular (cromatina condensada, carriorexis, cariolisis) como se observa en la Figura 3 (Thomas et al., 2009).

Este ensayo se realiza con muestras de células del epitelio bucal ya que presenta la ventaja de reflejar el efecto genotóxico ocurrido en las células de la capa basal de una manera directa, y da

una aproximación para identificar y cuantificar el daño micronucleogénico en tejidos humanos que son blancos carcinógenos órgano-específicos que podrían desarrollar cáncer (Bugar et al., 2016).

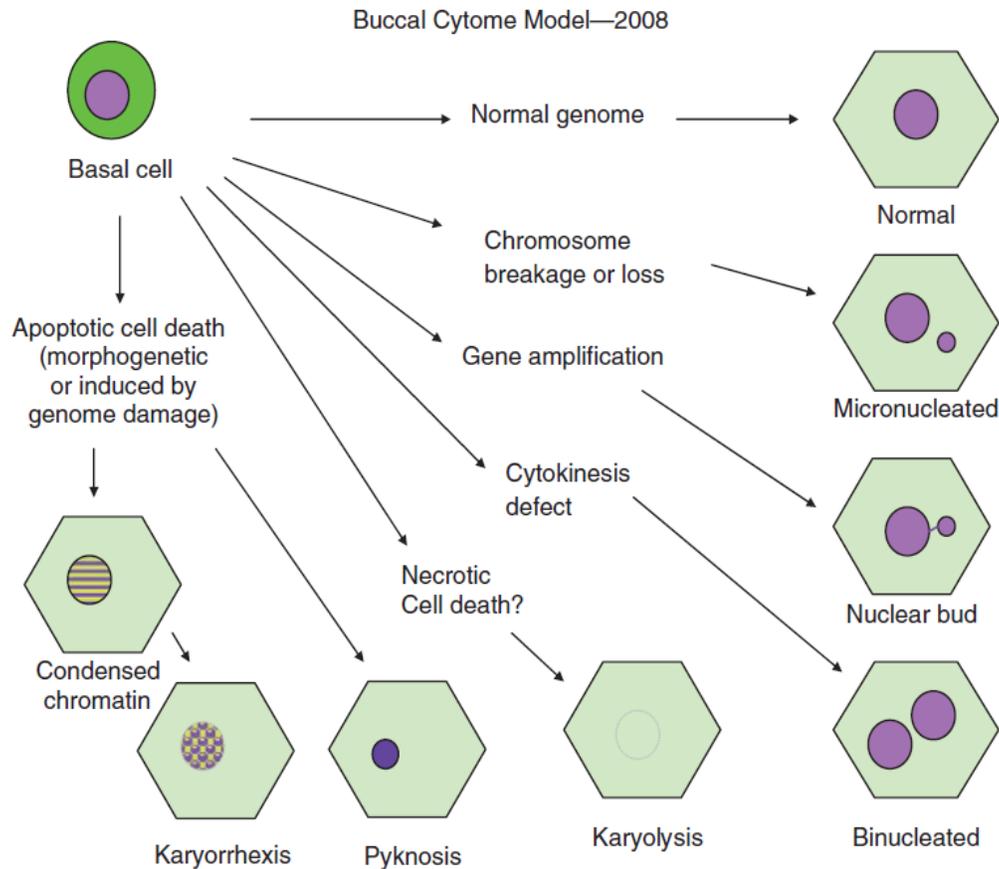


Figura 3. Representación diagramática de los varios tipos de células de la mucosa bucal
Fuente: (Thomas et al., 2009)
Elaborado por: (Thomas et al., 2009)

1.9.2 Aplicaciones ensayo de micronúcleos.

Este ensayo se usa en estudios epidemiológicos para investigar la genotoxicidad debida a diversas patologías como son autoinmunes, por trastornos de la alimentación, exposición a quimioterapia, por exposición ocupacional o ambiental y anomalías nucleares. El ensayo de micronúcleos también ha sido aplicado para conocer el efecto de determinados pesticidas y plaguicidas, productos químicos considerados de riesgo para los seres vivos; existen estudios tanto con ratones como con humanos donde se demuestra el efecto potenciador de estos productos sobre el índice de micronúcleos (Zalacain et al., 2005).

CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO

2.1 Objetivo general del proyecto.

Determinar el daño genotóxico en población expuesta a altas concentraciones de material particulado MP 2,5 mediante ensayo de micronúcleos en el sector Suroeste de la ciudad de Cuenca – Ecuador.

2.2 Objetivos específicos del proyecto.

Determinar la correlación que existe entre la exposición a altas concentraciones de material particulado MP 2,5 y el daño genotóxico.

Determinar el daño genotóxico mediante el ensayo de micronúcleos tanto en donantes expuestos a altas concentraciones como en donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5.

CAPITULO III. MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio

El estudio es de tipo descriptivo transversal en el cual se correlaciona la exposición a altas concentraciones de MP 2,5 y el daño genotóxico mediante ensayo de micronúcleos.

3.2 Área de estudio

El estudio se realizó en la zona Suroeste de la ciudad de Cuenca en donde previamente según un monitoreo realizado por el Centro de Estudios Medioambientales de la Universidad de Cuenca (CEA) se determinó los puntos de alta concentración (Punto 11) y baja concentración (Punto 10) del material particulado como se ilustra en la Figura 4.

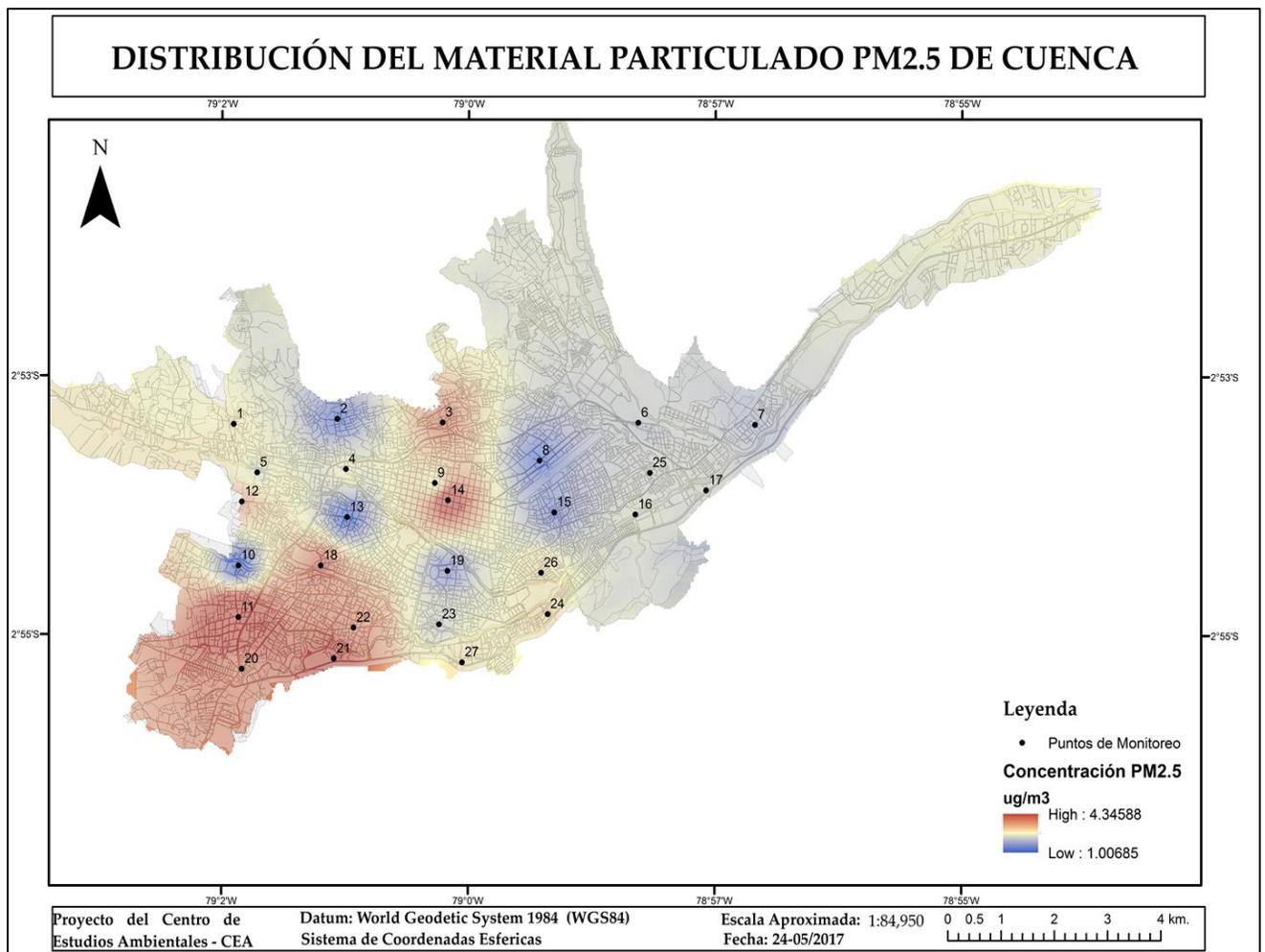


Figura 4: Distribución de material particulado MP 2,5 en la ciudad de Cuenca – Ecuador

Fuente: Centro de Estudios Ambientales (CEA).

Elaborado por: Centro de Estudios Ambientales

Una vez localizados los puntos exactos para los casos el estudio se realizó entre las calles José Vinueza, Juan Pío Montufar, Francisco Ascázubi, Camino Viejo a Baños, Manuel Quiroga, Av. de las Américas, Antón de Sevilla y Av. Salado como se ilustra en la Figura 5.

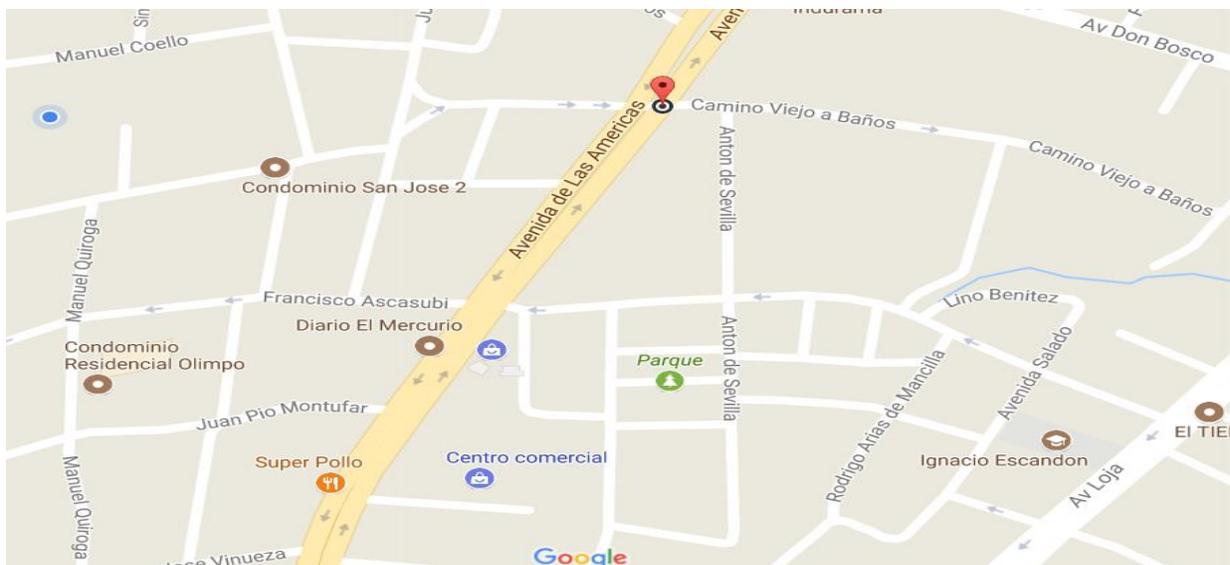


Figura 5. Localización puntos exactos estudio de casos

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Una vez localizados los puntos exactos para los controles el estudio se realizó entre las calles Alfonso María Mora, Darío Ordoñez, Manuel Corral Jouregui, Miguel Carrasco, Av. Primero de Mayo como se ilustra en la Figura 6.

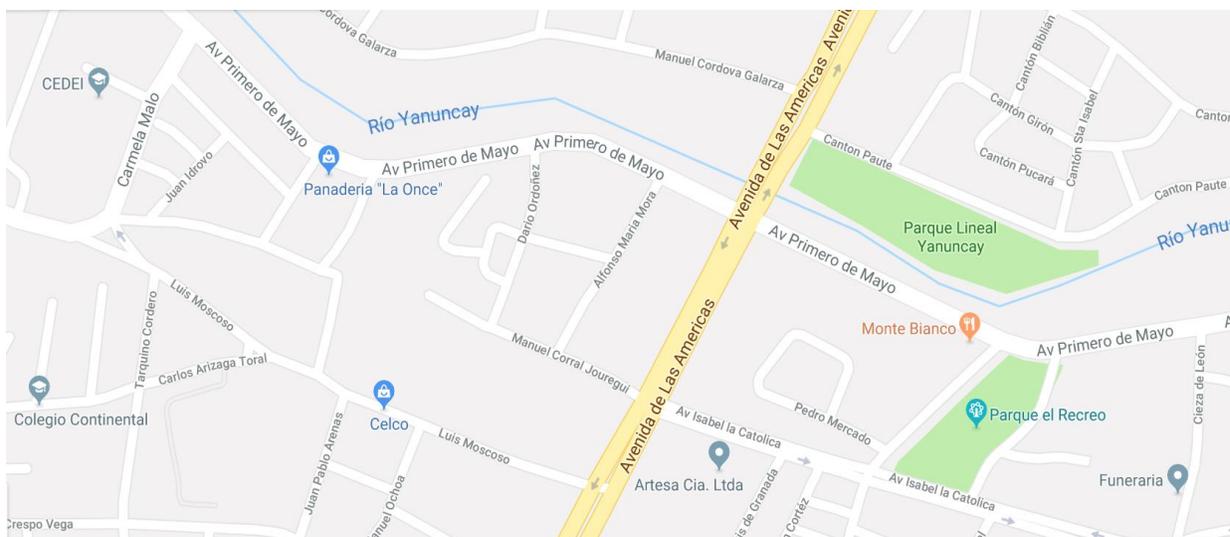


Figura 6. Localización de puntos de estudio de controles

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

3.3 Población de estudio

Para seleccionar la población de estudio, a los donantes previamente se les realizó una encuesta para determinar si los individuos cumplían con los criterios de selección teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.

La población de estudio para los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5 que se analizó, fueron 36 donantes, 18 hombres y 18 mujeres entre 21 y 54 años, quienes previamente firmaron el consentimiento informado.

La población de estudio para los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5 que se analizó fueron 34 donantes, 18 hombres y 16 mujeres entre 21 y 54 años de edad, quienes previamente firmaron el consentimiento informado.

3.3.1 Criterios de Inclusión

En el estudio se incluyeron personas de edad comprendida entre 18 y 65 años, que permanezcan en la zona de estudio mínimo de 8 horas durante el día y residan un tiempo mínimo de 3 años, personas que hayan firmado el consentimiento informado.

3.3.2 Criterios de Exclusión

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

3.4 Obtención de la muestra

A los donantes quienes cumplieron con los criterios de inclusión se les tomó una muestra de células del epitelio bucal mediante hisopado para esto se utilizó un cepillo citológico estéril y se realizó un frotis suave en la carilla interna de las mejillas derecha e izquierda de cada paciente, el cepillo se colocó en un tubo de centrífuga de 15 mL que contenía 3 mL de buffer (1,6 g de Tris-HCl, 1,2 g EDTA y 37,2 g de NaCl) ajustado a un pH=7 para que se mantenga el equilibrio osmótico de las células del epitelio bucal y a cada tubo que contiene la muestra se le identificó con un código que contiene dos números seguidos de dos letras mayúsculas SA para los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5 y SB para los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5.

3.5 Transporte de muestra

Una vez obtenida la muestra los tubos bien identificados se colocaron sobre una gradilla y en un recipiente que contenía hielo, se cerró herméticamente y se mantuvo la temperatura hasta llegar al laboratorio en donde se realizó el análisis.

3.6 Metodología del ensayo de micronúcleos

3.6.1 Preparación de la muestra.

Para retirar el cepillo citológico del tubo, se realizó varias agitaciones para liberar todas las células que probablemente se quedaron adheridas a las cerdas, una vez bien agitado se descartó el cepillo citológico y los tubos se taparon herméticamente y se centrifugaron a 6800 rpm por 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se colocó 1 mL de PBS (Fosfato Disódico, fosfato de potasio monobásico y cloruro de potasio, (SIGMA) y se realizó el mismo procedimiento 3 veces.

3.6.2 Fijación de la muestra.

Una vez realizados los lavados el pellet obtenido se disolvió con 1 mL de fijador Saccomanno (50% v/v etanol, 20 % v/v polietilenglicol diluido en agua) para fijar las células para su posterior análisis.

De cada muestra con fijador de Saccomanno se tomó un volumen de 100 μ L y se mezcló con 50 μ L de DMSO (Sigma Aldrich) y 20 μ L de fijador (etanol (Merck) / ácido acético glacial (Merck) en proporción 3:1).

De la solución anterior con una jeringa se absorbió un volumen de 500 μ L y se colocó sobre un portaobjetos previamente rotulado con el código correspondiente, el portaobjetos se colocó sobre un gel frío para permitir la fácil dispersión de la muestra en toda la placa y finalmente se dejó secar a temperatura ambiente.

3.6.3 Tinción de la muestra.

Una vez secas las placas con las muestras fijadas se procedió a realizar la tinción con la técnica May Grunwald-Giemsa, las placas se colocaron en una cubeta de tinción con el reactivo de Giemsa (Merck) por 5 minutos, luego se realizó un lavado de las placas con agua destilada, posteriormente se colocaron en una cubeta con agua destilada 3 minutos, y finalmente las placas se colocaron en una cubeta con buffer de Sorensen (254 mL de fosfato monopotásico y 246 mL de fosfato disódico) durante 3 minutos, se dejaron secar las placas y se observaron en un microscopio óptico (Nikon) con aceite de inmersión (Merck) con un lente de 100x.

3.6.4 Conteo de células.

Este reactivo de tinción permite observar el citoplasma de las células de color rosado y el núcleo de color azul, se realizó el conteo de 1000 células y se analizó la estructura celular; micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, células binucleadas, células incompletas, brotes celulares y células normales por placa tanto de los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5 como de los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5.

3.6.5 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el Software Estadístico GraphPad Prism® 5, utilizando la prueba de t-Student la cual permite analizar la diferencia significativa de los resultados entre el grupo de donantes expuestos a altas concentraciones altas y a bajas concentraciones. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con un intervalo de confianza de 95 %.

ESPACIO EN BLANCO



Figura 7. Flujo de ensayo de micronúcleos

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

4.1 Características demográficas de la población de estudio.

En el estudio participaron 70 donantes que residen en la zona Sur de la Ciudad de Cuenca (36 donantes expuestos a altas concentraciones y 34 donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5); el primer grupo está conformado por 18 hombres y 18 mujeres, con una edad promedio de 36 años y el segundo grupo está conformado por 18 hombres y 16 mujeres, con una edad promedio de 35 años. En cuanto al tiempo promedio de residencia de los participantes en la zona de estudio es de 13,61 años para los donantes expuestos a altas concentraciones y de 12,76 años para los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5. Los donantes que participaron en el estudio presentan un bajo porcentaje de hábitos de fumar y consumir bebidas alcohólicas como se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas de la población de estudio expuesta a altas y bajas concentraciones de MP 2,5 que residen en la zona Sur de la ciudad de Cuenca - Ecuador

FACTORES	Expuestos a altas concentraciones de MP 2,5		Expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5		p - valor
	N	%	N	%	
GÉNERO					
Femenino	18	50	16	47,05	0,8056
Masculino	18	50	18	52,95	
Total	36	100	34	100	
TABACO					
No fuma	26	72,22	31	91,17	0,2149
Fumador	4	11,11	1	2,94	
Fumador pasivo	5	13,89	2	5,89	
Exfumador	1	2,78	0	0	
Total	36	100	34	100	
ALCOHOL					
Ingesta de alcohol	4	11,11	3	8,82	0,7498
No ingieren alcohol	32	88,89	31	91,18	
Total	36	100	34	100	
	N	$\bar{x} \pm$ error estándar	N	$\bar{x} \pm$ error estándar	p - valor
EDAD	36	36,86 \pm 1,831	34	35,62 \pm 1,62	0,6142
TIEMPO DE RESIDENCIA	36	13,61 \pm 1,579	34	12,76 \pm 1,533	0,5500

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

4.2 Evaluación de los antecedentes personales de la población de estudio.

Según la Tabla 4 en el análisis de los antecedentes personales de los donantes que participaron en el estudio, no presentan diferencias significativas con dificultad para tener hijos, problemas de descendencia pues el valor de p es $> 0,05$, sin embargo, un 19,45% de los donantes que están expuestos a altas concentraciones de MP 2,5 si presentan problemas de fertilidad, defectos de nacimiento, alteraciones genéticas o cáncer siendo estadísticamente significativo con un valor de p de 0,0067 ($<0,05$).

La exposición a agentes químicos es otro factor importante ya que un alto porcentaje de donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5 se encontraban expuestos al polvo (48,38%), debido a que en el lugar en donde laboran o residen hay mucha afluencia de vehículos y gasolineras y en relación con el grupo de donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5 es estadísticamente significativo con un valor de p de $< 0,0001$. También se tomó en cuenta si los donantes previamente desempeñaron una ocupación previa que los llevó a estar en contacto con agentes químicos, sin embargo, casi en su totalidad los donantes de ambos grupos que participaron en el estudio no estuvieron expuesto a químicos.

Tabla 4. Análisis de los antecedentes personales de la población de estudio expuesta a altas y bajas concentraciones de MP 2,5 que residen en la zona Sur de la Ciudad de Cuenca – Ecuador

PREGUNTAS ENCUESTA	Expuestos a altas concentraciones de MP 2,5		Expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5		p - value
	N	%	N	%	
1) PROBLEMAS DE FERTILIDAD, DEFECTOS DE NACIMIENTO, ALTERACIONES GENÉTICAS O CÁNCER					
Si o familiares	7	19,45	0	0,00	0,0067
Ninguno	29	80,55	34	100	
Total	36	100	34	100	
2) DIFICULTAD PARA TENER HIJOS					
Si	1	2,78	0	0,00	0,3277
No	35	97,22	34	100	
Total	36	100	34	100	
3) PROBLEMAS CON SU DESCENDENCIA					
Abortos	2	5,56	0	0,00	0,2483
Muertes neonatales	1	2,78	0	0,00	
Bajo peso al nacer	1	2,78	0	0,00	
Ninguna	32	88,88	34	100	
Total	36	100	34	100	

4) FECHA DE LA ÚLTIMA VISITA MÉDICA

0 - 6 meses	14	38,89	10	29,42	
7 - 12 meses	5	13,89	2	5,88	0,8212
Más de 1 año	3	8,33	2	5,88	
NS/NC	14	38,89	20	58,82	
Total	36	100	34	100	

5) USO DE MEDICAMENTOS EN LOS SEIS ÚLTIMOS MESES

Antibióticos	6	17,14	0	0,00	
Analgésicos y antipiréticos	7	20,00	7	26,92	
Diuréticos	4	11,43	1	3,85	
Antihipertensivos	3	8,57	0	0,00	
Antiácidos	1	2,86	0	0,00	0,0747
Antihistamínicos	3	8,57	3	11,54	
Tratamiento de Diabetes	1	2,86	0	0,00	
Psicofármacos	1	2,86	0	0,00	
Ninguno	9	25,71	15	57,69	
Total	35	100	26	100	

6) OCUPACIÓN ACTUAL: EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES AMBIENTALES

Ruido	26	40,33	0	0,00	
Polvo	30	48,38	2	100	< 0,0001
Gasolina	7	11,29	0	0,00	
Total	62	100	2	100	

7) OCUPACIÓN PREVIA: EXPOSICIÓN A AGENTES

Si	3	8,33	0	0,00	0,0853
No	33	91,67	34	100	
Total	36	100	100	100	

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Con respecto a las patologías que padecen los donantes la más común es la cefalea ya que se presenta alrededor de un 12% en ambos grupos como se ilustra en la figura 8; por otra parte, los donantes expuestos a altas concentraciones presentan un 10,2 % de rinitis alérgica en comparación con los expuestos a bajas concentraciones que da un bajo porcentaje. Por otra parte, ambos grupos en porcentajes del 26,5% y 61,8% respectivamente, no padecen una patología y refieren sentirse subjetivamente bien en el momento de realizar el estudio. No obstante, fue necesario determinar la significancia estadística entre los grupos analizados con relación al padecimiento de enfermedades, en el Gráfico 1, se observa que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ya que se obtuvo valores de p mayores a 0,05.

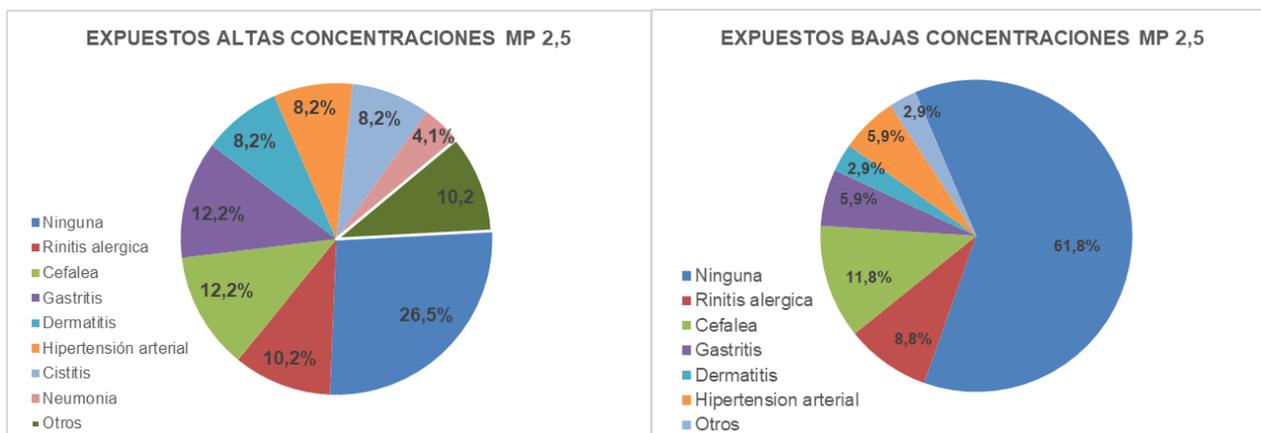


Figura 8. Patologías más frecuentes de los donantes

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

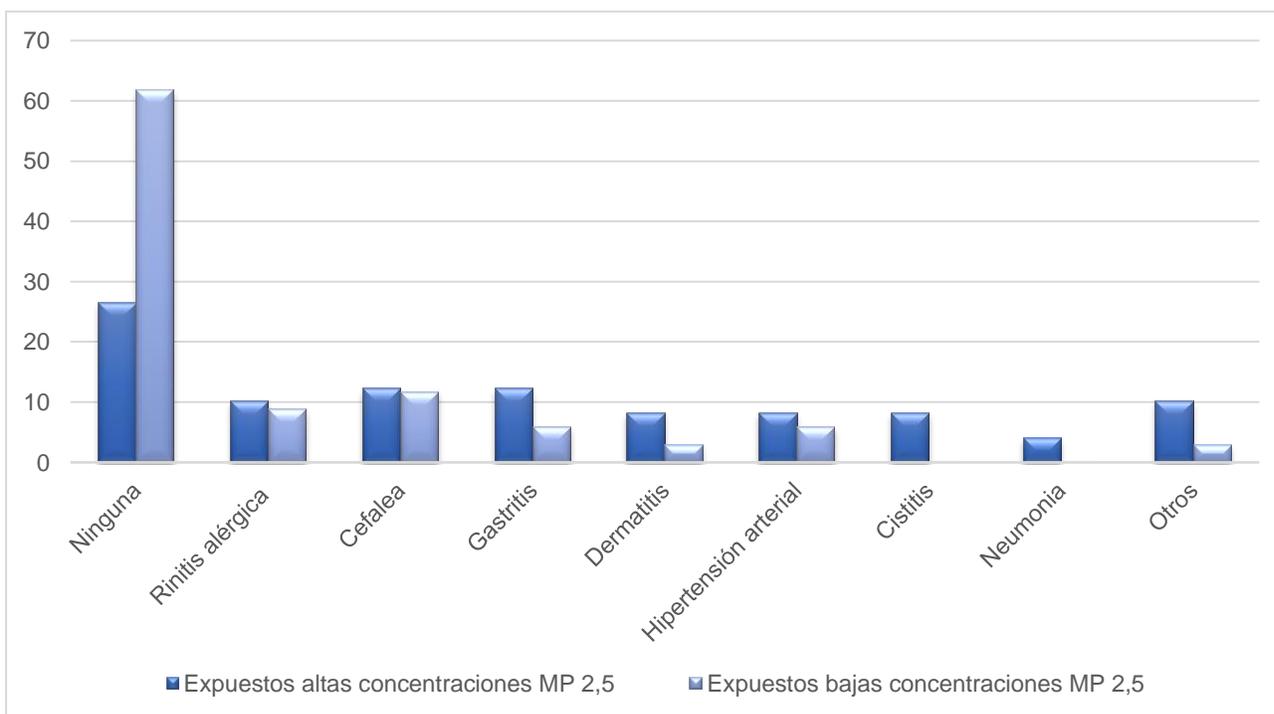


Gráfico 1. Análisis estadístico de enfermedades entre grupos de estudio

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

La administración de fármacos también fue evaluada en el estudio (Tabla 5), siendo los analgésicos y antipiréticos los más utilizados por los donantes de ambos grupos con un 20% para los expuestos a altas concentraciones y 26,92% para los expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5 pero no presentan diferencias significativas entre los grupos analizados.

4.3 Estudio de las alteraciones nucleares.

El presente trabajo permitió la identificación de las diferentes alteraciones nucleares en las células del epitelio bucal de los donantes tanto expuestos a altas concentraciones como de los expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5; se realizó el conteo de 1000 células por placa y se determinó el número de micronúcleos, células binucleadas, brotes nucleares, células incompletas y puentes nucleoplásmicos.

Los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5, presentaron diferencias estadísticamente significativas para todas las anormalidades nucleares Gráfico 2a, Gráfico 2b, Gráfico 2c ($p < 0,05$) en comparación con los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5, cabe recalcar que los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5 no presentaron puentes nucleoplásmicos en las células del epitelio bucal.

El procedimiento estadístico que se utilizó para comparar las medias de los grupos analizados fue la prueba t-Student; el valor de p de todos los parámetros analizados es menor que 0,05; por lo tanto, esto demuestra que las medias de los grupos son estadísticamente significativas, con un intervalo de confianza del 95%.

Para el análisis de los puentes nucleoplásmicos Gráfico 2e en las células del epitelio bucal no se evidenció la presencia de los mismos en el grupo de los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5 por lo tanto se procedió a realizar el test de Wilcoxon obteniéndose una media de 0,1389 y un error estándar de 0,058 ($0,1389 \pm 0,058$) con un valor de p de 0,0389 ($< 0,05$) siendo este estadísticamente significativo.

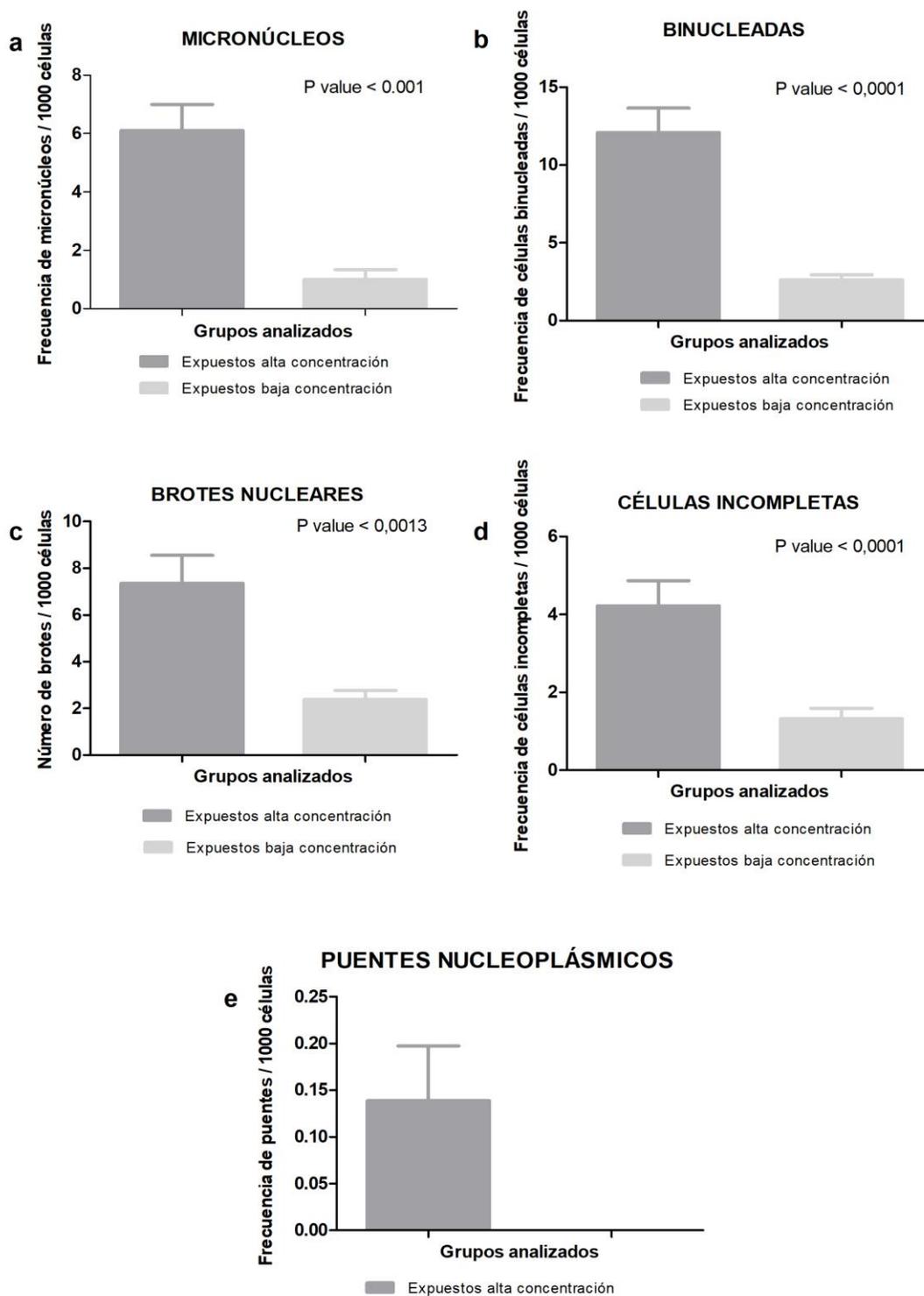


Gráfico 2. Comparación de la frecuencia de las alteraciones nucleares entre los donantes expuestos a altas concentraciones y bajas concentraciones de MP 2,5 que residen en la zona Sur de la ciudad de Cuenca.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

DISCUSIÓN

A nivel mundial la contaminación del aire por material particulado es uno de los principales problemas que enfrenta la sociedad actual ya que la exposición a altas concentraciones de sustancias genotóxicas alteran el proceso de replicación y posterior división del ADN, de tal manera que el material genético no se reparte equitativamente a las células hijas; cuando esto ocurre cierta cantidad del material genético queda excluido y no se incorpora al núcleo central de la célula, como resultado se origina un núcleo de menor tamaño que se le conoce como micronúcleo

El ensayo de micronúcleos (MN) es una técnica sensible, rápida y no invasiva que permite evaluar el daño del material genético en población expuesta a contaminantes ambientales (Araldi et al., 2015); esta técnica se realiza en células epiteliales de la mucosa bucal debido a la capacidad protectora que presentan las mismas contra potentes carcinógenos los cuales al ser metabolizados pueden generar metabolitos reactivos y producir daño a otros órganos (aparato respiratorio y cardiovascular); además presenta una capacidad proliferativa lo que le vuelve a las células vulnerables a lesiones producidas en el ADN, por esta razón las células del epitelio son usadas para monitorizar los eventos genotóxicos producidos por la ingestión o inhalación de contaminantes ambientales (Torres et al., 2013).

Los resultados obtenidos en el estudio muestran una frecuencia significativamente alta de micronúcleos, células binucleadas, células incompletas, brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos en el grupo de donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5 con respecto a los donantes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5. La diferencia es altamente significativa ya que el valor de p es menor a 0,05. Esto nos indica que los donantes expuestos a contaminantes ambientales MP 2,5 presentan daño genotóxico evidente. Estos resultados se adicionan a los resultados de otros estudios que confirman el potencial efecto genotóxico producido por exposición a altas concentraciones de MP 2,5 (Oh et al., 2011; Traversi et al., 2009).

Según investigaciones realizadas por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca (CEA) la concentración promedio de MP 2,5 en la zona de estudio durante un monitoreo de 24 horas fue de $30,34 \mu\text{g}/\text{m}^3$; según las directrices de la OMS sobre la Calidad del Aire los límites de concentración de MP 2,5 en 24 horas es $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (OMS, 2005), lo que indica que los niveles de MP 2,5 en la zona de estudio sobrepasan la normativa establecida por la OMS. No obstante, según la Normativa Ecuatoriana los niveles de MP 2,5 se encuentran dentro del rango permitido $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (MAE, 2011), a pesar de ello, se pudo evidenciar que a las concentraciones antes mencionadas ya se produce daño genotóxico en la población expuesta. Los estudios son realizados en grandes

ciudades en donde las concentraciones de MP 2,5 sobrepasan las directrices establecidas por la OMS, en la ciudad de Suwon en Corea zona de alto tráfico vehicular se determinó la actividad genotóxica in vitro del MP 2,5 utilizando extractos orgánicos del aire contaminado en diferentes concentraciones ($1 \mu\text{g}/\text{m}^3 - 50 \mu\text{g}/\text{m}^3$), en este estudio existe mayor daño genotóxico a una concentración de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ con un frecuencia de 7,38 MN por cada 1000 células; lo que quiere decir que la frecuencia de MN es dosis dependiente es decir que mientras más alta es la concentración de MP 2,5 mayor frecuencia de MN (Oh Seung, 2011). En el año 2009 (Traversi et al., 2009) observó un daño genotóxico marcado en un estudio in vitro producido por exposición a MP 2,5 en tres ciudades de Italia en donde los niveles del mismo sobrepasaron las directrices de la OMS ($46,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $34,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $37,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivamente).

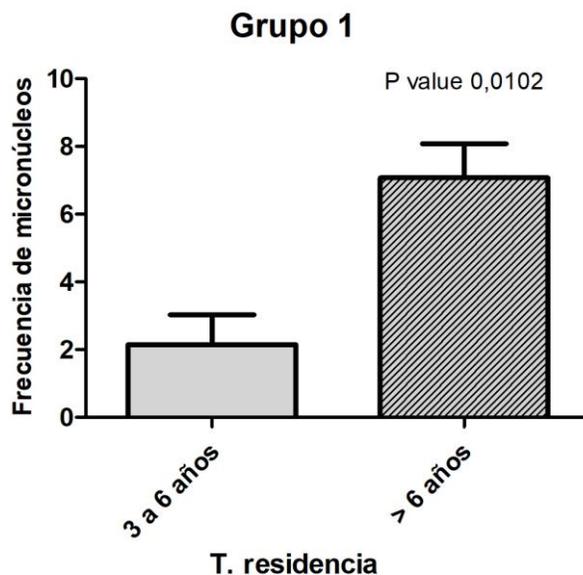
En los estudios previos se ha demostrado que las partículas MP 2,5 producen un incremento del daño genotóxico tanto in vitro como en experimentos in vivo con ratones (Abad et al., 2018; Oh et al., 2011; Traversi et al., 2009); la importancia de este trabajo radica en que el estudio es realizado en individuos in vivo los cuales se ven afectados.

Se debe considerar la concentración y la composición de los contaminantes ambientales para medir el nivel de daño, lo que se comprueba con otros estudios realizados en donde se evaluó el daño genotóxico producido por diferentes tipos de contaminantes entre ellos mercurio, plomo, hidrocarburos aromáticos policíclicos en donde la frecuencia de MN también es alta (Rosales et al., 2013; Larrea et al., 2010; Pariona, 2010).

Estos hallazgos demuestran la presencia de biomarcadores que evalúan el daño cromosómico como son los micronúcleos (MN) y brotes nucleares (Benítez-Leite et al., 2012), otros biomarcadores que indican defecto de citocinesis como las células binucleadas; mientras que las células incompletas son biomarcadores de muerte celular (Tejedor, 2011); anomalías del tejido epitelial de la mucosa bucal de donantes que residen o laboran en la zona Sur de la ciudad de Cuenca en donde están expuestos a altas concentraciones de MP 2,5.

Muchos estudios muestran diferencias estadísticamente significativas, entre individuos expuestos comparados con un grupo control (no expuestos), aunque la frecuencia de micronúcleos es relativamente pequeña alrededor de 1,1 a 4,0 micronúcleos por cada 1000 células (Benítez-Leite et al., 2012). Es importante mencionar que la frecuencia de MN en el grupo control es de $1,00 \pm 0,345$ este resultado está de acuerdo con (Bonassi et al., 2011) quienes establecieron valores entre 0,74 – 1,07 y (Oliveira et al., 2017) valores de 1,03 MN en el grupo control lo que se explica como un ocurrencia normal de MN en pacientes expuestos a bajas concentraciones de MP 2,5. Con respecto

a la frecuencia de micronúcleos y de otras anomalías nucleares en el estudio realizado se determinó que la frecuencia es más alta en comparación con otras investigaciones, (Benítez-Leite et al., 2012; Brina et al., 2018) teniendo un promedio de $6,11 \pm 0,887$ micronúcleos por cada 1000 células de la mucosa bucal de los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5.



Grupo 1: Expuestos a altas concentraciones de MP 2,5

Gráfica 3. Relación entre frecuencia de MN y tiempo de residencia de los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

El tiempo de residencia y la frecuencia de micronúcleos en los donantes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5 también están relacionadas, un gran número de donantes residen o laboran en la zona de estudio alrededor de $13,61 \pm 1,579$ años (Tabla 4); encontrándose que los donantes que llevan mayor tiempo viviendo en esta zona presentan mayor frecuencia de micronúcleos Gráfico 3; se puede comparar este hallazgo con un estudio realizado en pacientes expuestos a contaminantes ambientales como el plomo en el cual determinan que la frecuencia de micronúcleos está directamente relacionado con el tiempo de exposición a este metal independientemente de la concentración del mismo en el ambiente (Pariona , 2010).

Otras investigaciones (Bonassi et al., 2011; Lazalde et al., 2017) recalcan que se debe tomar en cuenta algunas variables como la edad, sexo, problemas de fertilidad que pueden estar asociados con la presencia de anomalías nucleares (Tibisay M et al., 2014). No obstante, en el estudio la muestra de ambos grupos ha sido homogénea ya que al compararlos no presenta diferencias estadísticamente significativas. (Thomas et al., 2009) en su estudio informa que las variables edad

y sexo están relacionadas con la frecuencia de micronúcleos; (Bukvic, 2001) en su estudio analiza la edad y el sexo con la frecuencia de micronúcleos, determinando que existe una correlación entre variables, es decir, a mayor edad mayor frecuencia de anomalías nucleares; sin embargo, en el estudio realizado no se evidencia la relación entre la edad y número de micronúcleos en los grupos analizados.

El grupo de donantes expuestos presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a patologías como cefalea, rinitis alérgica y dermatitis en relación al grupo de donantes no expuestos; los cuales pueden ser síntomas de exposición aguda a contaminantes ambientales (Khafaie et al., 2016).

Este trabajo nos permite afirmar que los donantes que participaron en el estudio están expuestos a sustancias genotóxicas las cuales pueden generar en un futuro deterioro a su salud. En este caso los organismos de control deben tomar precauciones lo antes posible para proteger la salud de las personas y del medio ambiente de la ciudad de Cuenca.

De acuerdo al crecimiento automovilístico evidente para disminuir la contaminación del ambiente se sugiere concienciar a la población sobre el uso del transporte público, medio de transporte no motorizado y jornada de trabajo única.

CONCLUSIONES

- ✓ Se determinó el daño genotóxico en la población expuesta a MP 2,5 mediante el ensayo de micronúcleos encontrándose una mayor frecuencia de los biomarcadores de daño celular en la población expuesta a altas concentraciones de MP 2,5 al compararlo con una población expuesta a bajas concentraciones de MP 2,5 que residen o laboran en la zona sur de la ciudad de Cuenca - Ecuador.
- ✓ El tiempo de exposición es un factor que se tomó en cuenta en el análisis y se determinó que existe una correlación con la frecuencia de las alteraciones nucleares encontradas en los pacientes expuestos a altas concentraciones de MP 2,5, lo que quiere decir que a mayor tiempo de exposición existe la probabilidad de encontrar una mayor frecuencia de alteraciones nucleares.
- ✓ Luego de haber culminado el presente trabajo se puede concluir que la exposición a altas concentraciones de material particulado MP 2,5 produce daño genotóxico el cual está relacionado con el desarrollo de enfermedades respiratorias, cardiovasculares y un alto riesgo de padecer cáncer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, C. M. T., Cedillo, R. L., Yañez, S. A., & Valdez, G. J. A. (2014). Inducción de micronúcleos por la fracción orgánica asociada a aeropartículas de una zona de la ciudad de Puebla , México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 2334–2501.
- 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 PM 10. *Luna Azul*, (34), 195–213.
- 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.
- Benítez-Leite, S., Macchi, M. L., Fernández, V., Franco, D., Ferro, E. A., Mojoli, A., ... Sales, L. (2012). Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Revista Chilena de Pediatría*, 83(4), 392–393. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062012000400011>
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., ... Fenech, M. (2011). The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 728(3), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.005>
- Borrego, O., Mario, H., Ramírez, M. O., Reynoso, J. A. G., López, C. R. C., & Veracruzana, U. (2012). Modelación espacial de concentraciones de contaminantes atmosféricos, (January 2016), 93–109.
- Brina, K. R., Carvalho, T. S., Ardenghi, P. G., & Basso da Silva, L. (2018). Micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated buccal cells of urban solid waste collectors and recyclers in southern Brazil. *Chemosphere*, 193, 1058–1062. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.119>

- Brook, R. D., Rajagopalan, S., Pope, C. A., Brook, J. R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A. V., ... Kaufman, J. D. (2010). Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *121*(21), 2331–2378. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3181dbeece1>
- Bugar, O. T., Ibarra, R., & Carrillo, C. S. (2016). nucleares en células de mucosa bucal como biomarcadores de genotoxicidad y, *6*(1).
- Bukvic, N. (2001). Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *498*, 159–167.
- Cosselman, K. E., Navas-Acien, A., & Kaufman, J. D. (2015). Environmental factors in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, *12*(11), 627–642. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.152>
- de Oliveira Galvão, M. F., de Queiroz, J. D. F., Duarte, E. de S. F., Hoelzemann, J. J., de André, P. A., Saldiva, P. H. N., ... Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2017). Characterization of the particulate matter and relationship between buccal micronucleus and urinary 1-hydroxypyrene levels among cashew nut roasting workers. *Environmental Pollution*, *220*, 659–671. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.024>
- EEA. (2004). *Transport and Environment in Europe*.
- 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.
- Espinoza, P. y. (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.
- Gaviria, C., Benavides, P., & Tangarife, C. (2011). Contaminación por material particulado (PM_{2,5} y PM₁₀) y consultas por enfermedades respiratorias en Medellín (2008-2009). *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, *29*(3), 241–250.
- 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.
- Instituto Ecuatoriano de Estadística y Censo, I. (2010). Fascículo Provincial Azuay 2010. Retrieved

from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/>

- Jaime A. Rosales-Rimache, a, Nancy Elizabeth Malca, Jhonatan J. Alarcón, M. C., & Gonzáles, M. A. (2013). Daño Genotóxico En Trabajadores De Minería Artesanal Expuestos Al Mercurio. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 30(4), 595–600. <https://doi.org/10.22201/facmed.14058871p.2018.2.63555>
- JERVES COBO, R., & Armijo Arcos, F. (2016). Análisis y revisión de la red de monitoreo de calidad del aire de la ciudad de Cuenca - Ecuador. *La Granja*, 23(1), 25–34. <https://doi.org/10.17163/lgr.n23.2016.03>
- Khafaie, M. A., Yajnik, C. S., Salvi, S. S., & Ojha, A. (2016). Critical Review of Air Pollution Health Effects With Special Concern on Respiratory Health. *Journal of Air Pollution and Health*, 1(12), 123–136. Retrieved from <http://japh.tums.ac.ir>
- Larrea, M., Tirado, N., & Ascarrunz, M. E. (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *Biofarbo*, 18(2), 31–43.
- Lazalde-Ramos, B. P., Zamora-Pérez, A. L., Sosa-Macías, M., Galaviz-Hernández, C., & Zúñiga-González, G. M. (2017). Micronuclei and nuclear anomalies in Mexico's indigenous population. *Salud Publica de Mexico*, 59(5), 532–539. <https://doi.org/10.21149/8318>
- Londoño, E., Alberto, C., Vasco, M., & Jaime, G. (2008). Relación entre las partículas finas (PM 2,5) y respirables (PM 10) en la ciudad de Medellín. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 7(12), 23–42.
- 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>
- Matheus, T., & Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: Biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18(2), 18–26.
- Mendoza et al. (2013). Genotoxicidad sobre linfocitos humanos expuestos a PM 10 de tres sitios del Valle de Aburrá (Antioquia), 15(2), 294–306.
- Mirian Antonia Pariona Canchiz. (2010). Evaluación genotóxica de una población escolar expuesta a altos niveles de plomo , en la provincia constitucional del Callao.
- Ny, M. T., & Lee, B. K. (2011). Size distribution of airborne particulate matter and associated metallic elements in an urban area of an industrial city in Korea. *Aerosol and Air Quality Research*,

11(6), 643–653. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2010.10.0090>

Oh, S. M., Kim, H. R., Park, Y. J., Lee, S. Y., & Chung, K. H. (2011). Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2,5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 723(2), 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.04.003>

OMS. (2005). WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_spa.

Oms, O. M. D. L. S. (2004). Guías para la calidad del aire, 1–239. <https://doi.org/OPS/CEPIS/PUB/04.110>

Oyarzún, M. (2010). Contaminación aérea y sus efectos en la salud. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 26, 16–25. <https://doi.org/10.4067/S0717-73482010000100004>

Pavel et al. (2008). Molecular Epidemiology and Air Pollution. *Energy Procedia*, 56(October), 604–609. <https://doi.org/10.5772/711>

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>

Ricardo Beleño, et al. (2013). Actividad mutagénica y genotóxica del material, 18, 3731–3737.

Riojas Rodríguez, H., Holguin, F., González-Hermosillo, A., & Romieu, I. (2006). Uso de la variabilidad de la frecuencia cardíaca como marcador de los efectos cardiovasculares asociados con la contaminación del aire. *Salud Pública de México, ISSN 0036-3634, Vol. 48, N° 4, 2006, Págs. 348-357, 48(4), 348–357.*

Saiyed, H., Patel, T., & Gokani, V. (2001). Indoor air pollution in India: a major environmental and public health concern. *Indian Council of Medical Research Bulletin*, 31(5). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:INDOOR+AIR+POLLUTION+IN+INDIA+?+A+MAJOR+ENVIRONMENTAL+AND+PUBLIC+HEALTH+CONCERN#6%5Cn>
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Indoor+air+pollution+in+India:+a+major+environ>

Salinas. (2012). Contaminación atmosférica por material particulado y consultas de urgencias por morbilidad respiratoria en menores de 5 años en la ciudad de Valdivia, período mayo-julio, año 2010, 9(1).

- Santurtún, A., Rasilla, D. F., Riancho, L., & Zarrabeitia, M. T. (2017). Relationship Between Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Air Pollutants Depending on the Origin and Trajectory of Air Masses in the North of Spain. *Archivos de Bronconeumologia*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.03.017>
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., ... Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4(6), 825–837. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>
- Traversi, D., Degan, R., De Marco, R., Gilli, G., Pignata, C., Villani, S., & Bono, R. (2009). Mutagenic properties of PM_{2,5} 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>
- 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>
- Xiaofei Wang, Hangxin Cheng, Xiaobai Xu, G. Z. (2008). A wintertime study of polycyclic aromatic hydrocarbons in PM_{2,5} and PM_{2,5-10} in Beijing: Assessment of energy structure conversion. *Hazardous Materials*, 157(1), 47–56.
- Xing, Y. F., Xu, Y. H., Shi, M. H., & Lian, Y. X. (2016). The impact of PM_{2,5} 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>
- Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227–236. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300007>
- Zuluaga et al. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos, (November).