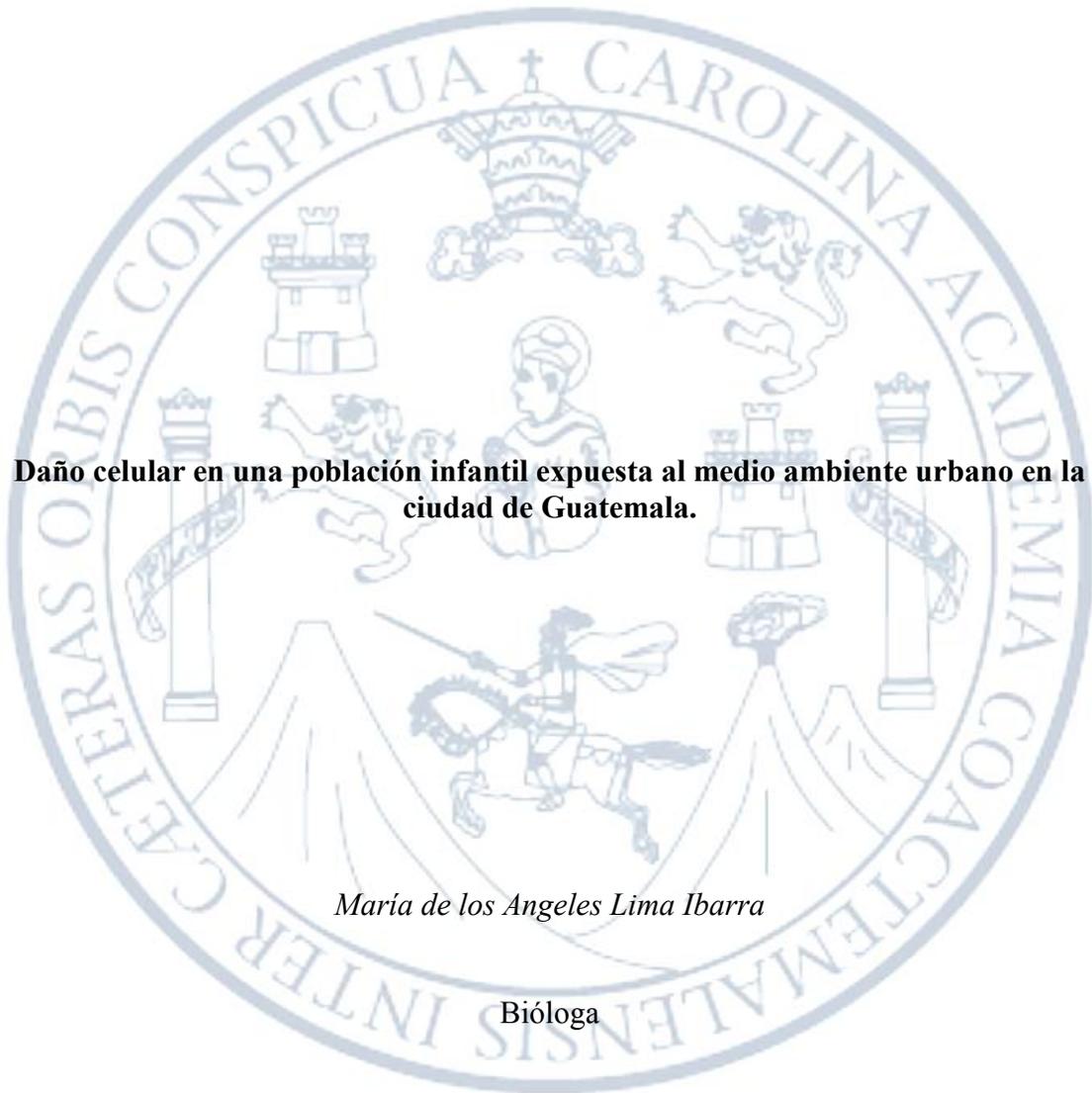


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



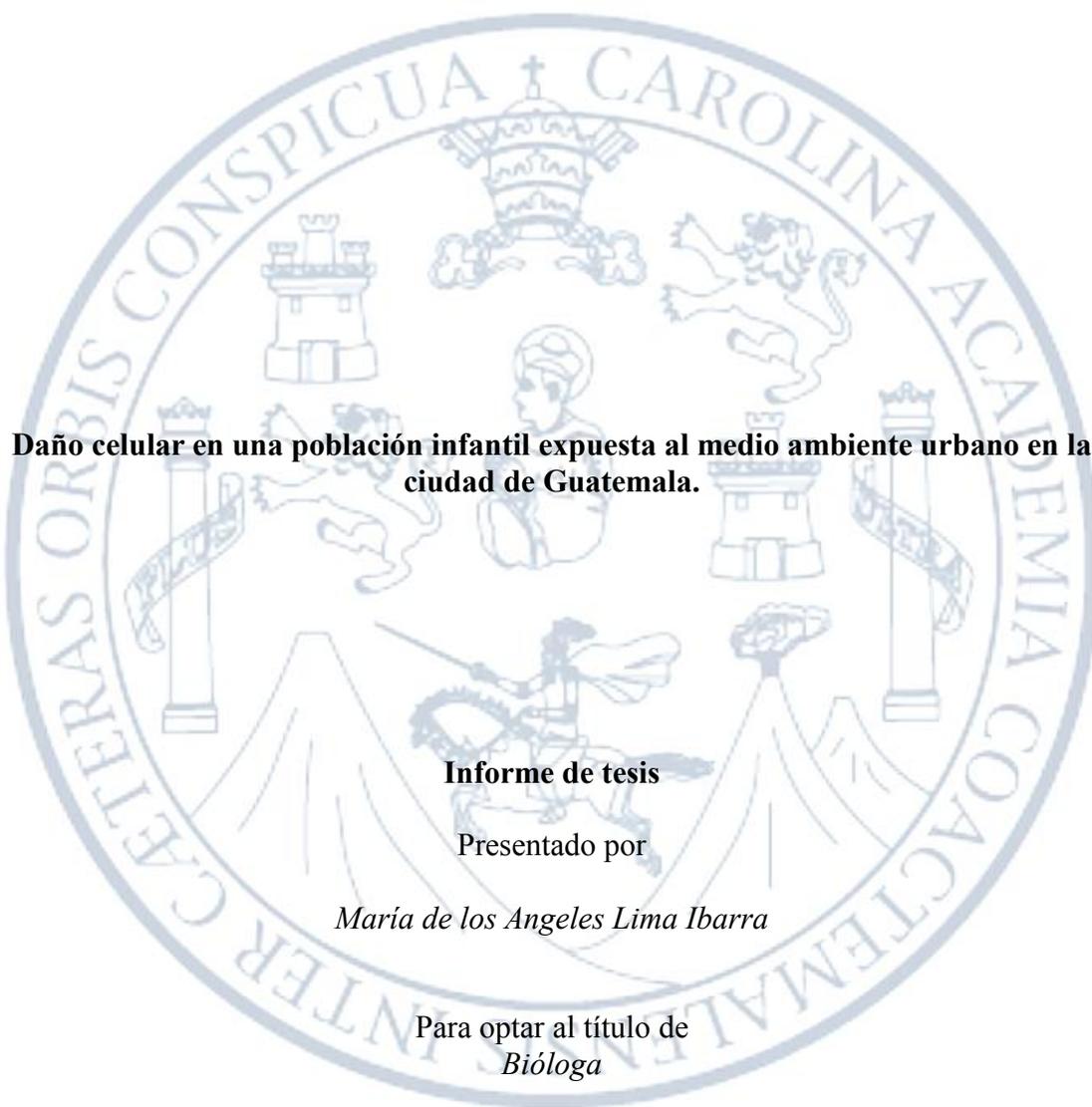
Daño celular en una población infantil expuesta al medio ambiente urbano en la ciudad de Guatemala.

María de los Angeles Lima Ibarra

Bióloga

Guatemala, Marzo de 2017

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Daño celular en una población infantil expuesta al medio ambiente urbano en la ciudad de Guatemala.

Informe de tesis

Presentado por

María de los Angeles Lima Ibarra

Para optar al título de
Bióloga

Guatemala, Marzo de 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancuourt Herrera	Vocal V

DEDICATORIA

Al pueblo de Guatemala.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A mi familia: mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mi Mamá por su esfuerzo, a mi Papá por su motivación, a mi hermana Andrea por su apoyo, a mi hermano Ricardo y a mi Luca.

Mi agradecimiento a las personas que fueron parte de mi formación académica. A mis profesores y especialmente a quienes se convirtieron en mentores de mi aprendizaje que me enseñaron con su trabajo y vocación: Lic. Roselvira Barillas, M.Sc. Carmen Yurrita, Lic. Antonieta Rodas, Lic. Julio Morales, Ing. Juan Herrera, PhD Sergio Melgar, Licda. Elizabeth Solórzano y Lic. Allan Urbizo.

A las personas que colaboraron y brindaron asesoría en la realización de este estudio, especialmente a Haroldo Álvarez por su apoyo en todas las etapas de esta investigación; Estefany Ordoñez Sayle y Jorge Jiménez por su asesoría estadística; Víctor Fernández y Elder Lay, por su ayuda en laboratorio; Profesores: Dr. Gabriel Silva, Asesor de tesis; PhD Sergio Melgar, revisor de tesis; M.Sc. Dulce Saldaña y Dra. Elisa Hernández.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y al Centro de Investigaciones Biomédicas.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
NOMBRE DE LA INVESTIGACIÓN:	4
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	6
Formas de contacto a sustancias tóxicas en niños	7
Ensayo de micronúcleos en células bucales	8
Daño en el ADN	9
Daño genotóxico	10
Los micronúcleos	11
Proyecto de Frecuencia de Micronúcleos en Poblaciones Humanas	13
Ciudad de Guatemala	14
Situación territorial de la Ciudad de Guatemala	14
Delimitación de zonas urbanas en la ciudad de Guatemala	15
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	18
2.1 General	18
2.2 Específicos	18

	2
HIPÓTESIS _____	19
MATERIALES Y MÉTODOS _____	19
Universo _____	19
Muestra _____	19
Criterios inclusión para niños que viven en áreas urbanas _____	20
Criterios exclusión para niños que viven en áreas urbanas _____	21
Criterios inclusión para niños que viven en áreas rurales _____	21
Criterios exclusión para niños que viven en áreas rurales _____	22
Muestra _____	22
Obtención de la muestra _____	22
Variables _____	22
Materiales _____	23
Equipo y suministros _____	23
Metodología _____	24
Implicaciones Bioéticas _____	24
Procedimiento de toma de muestras celulares y procesamiento de la muestra _____	25
Análisis celular _____	26
Análisis estadístico _____	27
RESULTADOS _____	28
<i>Características de la población</i> _____	28

Cuadro no. 1. Características de los niños evaluados que viven en ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala y niños que viven en ambientes rurales.	28
<i>Frecuencia de células micronucleadas y anormalidades nucleares</i>	29
Cuadro no. 2. Micronúcleos y anormalidades nucleares en células de mucosa bucal en niños expuestos a ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala y niños que viven en ambientes rurales.	29
Cuadro no. 3. Resultados del ensayo de mucosa bucal en niños que viven en ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala y niños que viven en ambientes rurales.	30
Figura no 1. Imágenes de las diferentes células teñidas usando Fielgen y Light Green vistos por fluorescencia con filtro rojo lejano	31
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	37
REFERENCIAS	38
ANEXO 1. Consentimiento informado	45
ANEXO 2. Boleta de datos Generales	46
ANEXO 3. Conteo individual de micronúcleos y alteraciones nucleares de niños de áreas urbanas.	48
ANEXO 4. Conteo individual de micronúcleos y alteraciones nucleares de niños de áreas rurales.	49

NOMBRE DE LA INVESTIGACIÓN:

Daño celular en una población infantil expuesta al medio ambiente urbano en la ciudad de Guatemala.

RESUMEN

La contaminación ambiental es un problema global, especialmente en áreas urbanas, el área urbana de ciudad de Guatemala ha crecido más en la última década que en toda su historia previa, destacando un crecimiento desordenado y carente de regulaciones por lo cual las áreas residenciales han quedado intercaladas con las áreas industriales y de actividades económicas que generan las mayores cargas ambientales. Los estudios realizados con poblaciones pediátricas indican que esta puede ser más susceptible a los efectos de la exposición ambiental que los adultos y que además la aparición de anomalías nucleares en niños es muy rara. El propósito de este estudio fue determinar si la exposición ambiental en zonas urbanas en la ciudad de Guatemala puede contribuir a la aparición de daño celular expresado como micronúcleos y alteraciones nucleares. La línea base de la frecuencia de micronúcleos es relativamente baja en recién nacidos y los resultados disponibles concluyen que los contaminantes ambientales causan un incremento en la frecuencia de micronúcleos.

Se obtuvo asentimiento de los niños evaluados, así como, el consentimiento informado de los padres de un total de 65 niños sanos con edades comprendidas entre los 4 a 11 años (media de 7.2) los padres de los niños respondieron un cuestionario para obtener información demográfica y ambiental (54% reside en ambiente urbano y 46% en área rural). Se colectó muestras celulares de epitelio bucal y se evaluó la presencia de anomalías nucleares. Encontrándose que los niños que están potencialmente expuestos a ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala presentaron mayor frecuencia de micronúcleos y de células con otras anomalías nucleares, las diferencias fueron significativas para la aparición de células con micronúcleos y células binucleadas ($p < 0.001$) con relación a los niños que viven en áreas rurales. Dado que la exposición al

ambiente urbano en la ciudad de Guatemala incide en el incremento de la aparición de micronúcleos y células binucleadas y que la frecuencia de las mismas es mayor en los niños en áreas urbanas que en aquellos en áreas rurales del departamento de Guatemala, se recomienda el estudio de cohortes para evaluar el daño citogenético.

INTRODUCCIÓN

Un gran número de agentes ambientales son mutagénicos capaces de interactuar con el ADN, directa o indirectamente, y provocan cambios en la secuencia de bases y, alteran la información contenida en el material genético. De esta manera, contribuyen a aumentar la incidencia de enfermedades. El uso de cualquier compuesto biológicamente activo puede provocar problemas de toxicidad, las personas más afectadas son aquellas que están en contacto directo con el compuesto. En estos casos debe analizarse aspectos como los riesgos a la salud, evaluar el peligro y determinar el daño. Identificar y evaluar los problemas y, sobre la base de estudios científicos, prevenir el daño y desarrollar estrategias para contrarrestar los efectos tóxicos es una necesidad urgente. El ensayo de micronúcleos en mucosa oral es un método mínimamente invasivo para el estudio del daño en ADN, inestabilidad cromosómica y muerte celular. Este método es frecuentemente usado en estudios de epidemiología molecular para investigar el impacto de la nutrición, factores de estilo de vida, exposición a genotóxicas, daño en el ADN, fallo en la segregación cromosómica y muerte celular (Thomas et al., 2009). Los biomarcadores medidos por este ensayo han sido asociados con un incremento en el riesgo de envejecimiento acelerado, cáncer y muerte celular. El ensayo de micronúcleos es uno de los más utilizados internacionalmente dentro del campo de la genética. Una de sus principales ventajas consiste en que es una prueba sencilla en relación a otros biomarcadores. Además, en combinación con otras técnicas como FISH y el conocimiento actual que se tiene del genoma humano, es posible obtener más información del daño ocasionado y, a partir de esto, implementar nuevas líneas de trabajo que permitan mejores estrategias de prevención ante la exposición de potenciales agentes genotóxicos y carcinogénicos. Este trabajo de

investigación tiene como objetivo describir el daño celular causado al material genético en una población infantil expuesta al medio ambiente urbano, es decir, determinar si vivir en condiciones de urbanidad en la ciudad de Guatemala, tiene un efecto genotóxico en niños, empleando para ello la técnica de micronúcleos en mucosa oral.

ANTECEDENTES

Los seres humanos que residen en áreas con actividades industriales y productivas se encuentran expuestos a contaminantes en el ambiente, en la ciudad de Guatemala no existen normas que regulen la calidad del aire, las emisiones de carbono o compuestos volátiles que se utilizan en las distintas actividades industriales, si bien existen algunas normas implantadas en la industria para garantizar procesos productivos eficientes, ni los industriales ni el gobierno establecen monitoreo de la calidad el agua o aire que se desechan al medio ambiente en el Departamento de Guatemala, por lo cual una mezcla de sustancias peligrosas son desechadas a diario tanto al aire como al agua y al suelo, pudiendo de esta forma entrar en contacto directo con las personas ya será por vía dérmica, inhalatoria u oral, los compuestos tóxicos en el ambiente pueden producir efectos dañinos a la salud a mediano y largo plazo, causando daño genético, el daño genético puede producir mutaciones y estas son capaces de iniciar y favorecen la presencia de otras mutaciones en los oncogenes, en genes supresores de tumores y en los que codifican para los sistemas de reparación del ADN (Angerer, 2007; Alonzo, 2015).

Los contaminantes ambientales pueden plantear un riesgo mayor para los niños que para los adultos, debido a que los niños tienen una mayor esperanza de vida para desarrollar enfermedades con periodos de latencia larga (Sanborn, 2004). Los niños experimentan crecimiento y desarrollo rápido, si se altera una determinada fase puede tener efectos irreversibles. La exposición a agentes ambientales durante la primera infancia puede afectar el desarrollo del sistema inmunológico y puede contribuir más adelante al desarrollo de ciertas enfermedades como el asma y cáncer, debido a que la respuesta inmune es inmadura al nacer y se desarrolla durante la infancia y niñez hasta el primer año de edad, mientras

que el establecimiento de memoria inmunológica no está totalmente establecida hasta los 18 años (Carroquino, 2013).

Formas de contacto a sustancias tóxicas en niños

Los niños presentan mayor susceptibilidad a los plaguicidas, la proporción de las sustancias tóxicas que entran al cuerpo dependerá tanto de factores externos, ambientales y biológicos que determinan el ritmo de asimilación de las sustancias químicas en el organismo, la exposición ocurre a través de etapa prenatal, por leche materna, el ambiente y su comportamiento (Bolognesi, 2011 y Carroquino, 2013)

En etapa prenatal y por medio de leche materna se ha demostrado que el feto es vulnerable a la contaminación por sustancias químicas durante la gestación lo que se traduce en una exposición en el útero, y origina un inadecuado desarrollo, aunque sus consecuencias se manifiesten clínicamente en la pubertad o la edad adulta, por su parte la lactancia materna también puede ser el resultado de la exposición a productos químicos acumulados en la leche materna (Carroquino, 2013).

El ambiente: La proximidad de las viviendas de los niños a zonas industriales con alta generación de contaminación o la incidencia a estas zonas son fuentes de exposición a contaminantes en el medio ambiente. La extensión de la piel de los niños en relación con el peso corporal es superior a la de los adultos, y esto resulta en una mayor absorción de elementos en el ambiente, incrementándose hasta tres veces más (Bolognesi, 2011).

En cuanto al comportamiento de los niños se identificó el llamado “comportamiento mano-a-boca” de traer consigo elementos del suelo a la boca y jugar más cerca de la tierra, lo cual los pone en mayor riesgo de exposición, debido a que los niños mayores de 6 años tienen generalmente muy limitado el comportamiento mano-boca y tienen mayores niveles de ingestión del suelo y polvo que un adulto, el niño promedio puede ingerir entre 28 y 45 mg de tierra o polvo vía mano-boca, mientras que lo estimado para un adulto es de 10 mg.

Lo anterior, depende en gran medida del grado de actividad del niño respecto a su edad, estando más expuestos los niños de entre 1 y 6 años de edad (Lewandowski, 2013).

Ensayo de micronúcleos en células bucales

Este ensayo es un método mínimamente invasivo para el estudio de daño en el ADN, inestabilidad cromosómica, muerte celular y el potencial regenerativo de la mucosa bucal humana. Este método se utiliza cada vez más en los estudios epidemiológicos moleculares para investigar el impacto de la nutrición, el estilo de vida, la exposición a genotóxicas y el genotipo en el daño en el ADN, segregación cromosómica y la muerte celular. Los biomarcadores medidos en este ensayo se han asociado con un mayor riesgo de envejecimiento acelerado, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. La capacidad de regeneración de los tejidos y órganos del cuerpo es fundamental para un envejecimiento saludable. La regeneración es dependiente del número, la tasa de división de las células, proliferación (basal), estabilidad genómica y su propensión a la muerte. Estos eventos pueden ser estudiados en la mucosa bucal, que es un tejido de fácil acceso para el muestreo de células de una manera mínimamente invasiva. El uso de células de la mucosa bucal proporcionan una oportunidad única para estudiar la capacidad de regeneración del tejido epitelial, que es de origen ectodérmico en los seres humanos. El ensayo se ha utilizado con éxito para estudiar el daño del ADN, medido por micronúcleos (MNI) o por el uso de sondas fluorescentes para detectar aneuploidía, roturas cromosómicas y los cambios en la longitud del telómero. La proporción de células basales y células sometidas a la muerte celular en la mucosa bucal es una indicación de la capacidad de regeneración de este tejido (Thomas, 2009).

La mucosa bucal proporciona una barrera a carcinógenos potenciales que pueden ser metabolizados para generar productos potencialmente reactivos. Cerca de hasta el 90% de todos los cánceres parecen ser origen epitelial, la mucosa bucal se podría utilizar para monitorear eventos genotóxicos como resultado de carcinógenos potenciales que entran en el cuerpo a través de la ingestión o la inhalación. Células bucales exfoliadas se han

utilizado de forma no invasiva para mostrar con éxito los efectos genotóxicos de los factores de estilo de vida como el tabaquismo, tratamientos médicos, como la radioterapia, así como la exposición ocupacional a potencialmente mutagénicos y / o carcinogénicos productos químicos, y para estudios de quimioprevención del cáncer. Con respecto a la exposición a la radiación se ha demostrado por Moore et al. (1996) que este ensayo puede detectar el aumento de 16 veces en la frecuencia de micronúcleos en pacientes con cáncer oral después de la finalización del tratamiento con fotones. La mucosa bucal también tiene el potencial de ser utilizado para identificar la inestabilidad genómica heredada (Thomas, 2009)

Daño en el ADN

Se considera que las modificaciones en la secuencia de nucleótidos, como la alteración estructural de bases, su delección o inserción de manera incorrecta, así como cambios en la estructura de los cromosomas producto de rompimientos monocatenarios o bicatenarios, y la formación de entrecruzamientos ADN-proteína, representan daño a nuestro material genético. Estas alteraciones pueden ser producidas por agentes físicos, químicos o biológicos, y la forma en que se generan, así como sus consecuencias son de alto impacto en la salud humana (Araujo, 2013).

La reparación del ADN comprende los mecanismos de respuesta ante daño que tienen como objetivo mantener la estabilidad genómica. El daño al ADN puede resultar de la exposición a agentes exógenos (radiación y compuestos químicos), así como a agentes endógenos (productos intermediarios del metabolismo); adicionalmente puede ocurrir daño durante el proceso de replicación o de manera espontánea. El tipo de lesiones que se generan es muy amplio. Sin embargo, se pueden agrupar en: rupturas en las hebras de ADN (sencillas o dobles), formación de sitios abásicos, modificación de bases, formación de dímeros, enlaces en: rupturas en las hebras de ADN (sencillas o dobles), y de enlaces cruzados (Sancar, 2004).

La célula ha desarrollado distintos mecanismos de reparación dependiendo del tipo de daño que presente. Se requiere ejecutar al menos tres pasos para la reparación de rupturas de doble cadena: 1) detección del daño, 2) control del ciclo celular y de programas transcripcionales de respuesta a daño y 3) catálisis de la reparación del daño. Existen dos mecanismos principales de reparación de rupturas de doble cadena que se diferencian tanto en el proceso como en los requerimientos de secuencias homólogas de ADN. Uno de ellos es la unión de extremos no homólogos, que consiste en la reunión de dos extremos de las rupturas de doble cadena a través de un proceso independiente de homología de las secuencias, en consecuencia, este mecanismo está sujeto a error y puede producir aberraciones. En contraste, la recombinación homóloga repara usando secuencias homólogas, principalmente provenientes de la cromátida hermana del mismo cromosoma alterado y en menor grado del cromosoma homólogo; por esta razón este mecanismo es de alta fidelidad y no conlleva errores. La unión de extremos no homólogos predomina durante la fase G1 a S temprana; en tanto la recombinación homóloga ocurre en S tardía hacia G2, por la disponibilidad de un templado idóneo que es la cromátida hermana (Sancar, 2004; Lamarche, 2010).

Daño genotóxico

Un agente puede causar daño genotóxico cuando es capaz de interaccionar y modificar el ADN y estas interacciones o modificaciones producen alteraciones estructurales o funcionales en células de línea germinal o somática. Las transformaciones en células germinales son heredadas a la siguiente generación y son causa de padecimientos genéticos, así como, problemas de fertilidad en las personas expuestas a agentes tóxicos. Mientras las transformaciones en células somáticas pueden causar modificaciones en las funciones metabólicas o fisiológicas celulares, causando un crecimiento celular excesivo y desordenado, también pueden producir un envejecimiento prematuro y/o enfermedades vasculares (Pastor, 2002; Bagci, 2006 y Sisman, 2010).

La posibilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula de reparar o amplificar

el daño genético, la oportunidad de expresar cualquier alteración que se haya inducido y la capacidad de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes. Las células pueden reparar algunos de los daños al ADN de manera natural al disparar los mecanismos de necrosis o apoptosis, si el daño al ADN no se repara y la célula dañada se sigue dividiendo la transformación se da en células somáticas, se producen alteraciones en las funciones metabólicas o fisiológicas celulares, o bien el crecimiento celular desmesurado y desordenado (Arellano, 2012; Bolognesi, 2009).

Los micronúcleos

Los micronúcleos fueron descritos hace muchos años y entre los primeros autores en caracterizarlos se puede mencionar a Howell, en 1891, y Jolly, en 1907; ambos detallaron la presencia de pequeños cuerpos que se tenían como el núcleo celular en el citoplasma de eritrocitos, a los cuales nombraron como “fragmentos de material nuclear” y “corpúsculos intraglobulares”, respectivamente, hoy conocidas como cuerpos de Howell-Jolly por hematólogos (Müller y Streffer, 1994). Décadas después, “cuerpos” similares fueron descritos por Thoday en la década de 1950, mientras estudiaba el efecto de los rayos X y las partículas alfa en células de *Vicia faba*; fue él quien los denominó “fragmentos nucleares” o “micronúcleos”, los cuales siguieron apareciendo en experimentos subsecuentes, por lo que en 1959, Evans y colaboradores fueron los primeros en utilizar los micronúcleos como una medida de daño por exposición a radiación. Posteriormente, Matter y Schmid, en 1971, así como Heddle, en 1973, reportaron de manera independiente la inducción de micronúcleos *in vivo* en médula ósea de mamíferos, proporcionando un método para evaluar el daño al material genético en animales (Müller y Streffer, 1994).

Una de las pruebas más empleadas en estudios de genotoxicidad por exposición ambiental u ocupacional en poblaciones humanas, y para determinar el potencial genotóxico de diferentes compuestos, es la evaluación de micronúcleos (MNs). Esta prueba *in vitro* o *in vivo* combina facilidad en su realización, sencillez en la evaluación y una alta sensibilidad, características que han llevado a validar y recomendar su uso como prueba de genotoxicidad por instituciones como el Centro Europeo para la Validación de Métodos

Alternativos (Corvi et al., 2008) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2010).

La prueba de micronúcleos puede realizarse *in vitro* o *in vivo* en varios modelos eucariontes que incluyen tanto a plantas como a animales. En humanos la evaluación puede realizarse en células exfoliadas de epitelios y en linfocitos (Müller y Streffer, 1994). El empleo de células sanguíneas fue propuesto por Countryman y Heddle en 1976, y su rápida aceptación se debe a que representan una fuente de fácil acceso y que, al estar distribuidas por todo el cuerpo, constituyen un sistema de exposición sistémico, es decir, que pueden reflejar lo ocurrido en algún tejido blanco (Countryman y Heddle, 1976). Otra ventaja es la posibilidad de evaluar el daño genético por exposición crónica, permitiendo demostrar la acumulación de daño en poblaciones ocupacional o ambientalmente expuestas (Müller y Streffer, 1994; Norpa, 2004).

Además de los micronúcleos, otros eventos de daño como las gemaciones de cromatina y los puentes nucleoplásmicos pueden ser evaluados. Las primeras son estructuras parecidas a los MNs, pero, a diferencia de estos, permanecen unidas al núcleo (Araujo, 2013). Sobre su origen se ha propuesto la “amplificación” y posterior eliminación de algunas secuencias génicas, hipótesis planteada a partir de estudios en líneas celulares tumorales (Shimizu, Itoh, Utiyama y Wahl, 1998), aunque no se ha comprobado en ninguno de los protocolos que se tienen para la prueba de MNs utilizando cultivos de sangre entera o linfocitos aislados; de cualquier modo, su formación debe estar relacionada a la de los MNs. Por otra parte, se presume que los puentes nucleoplásmicos son formados por el rompimiento y posterior unión de cromosomas, dando paso a cromosomas dicéntricos y rearreglos cromosómicos (Fenech, 2006).

La capacidad regenerativa de los tejidos y órganos es fundamental para un envejecimiento saludable. La regeneración depende del número y la tasa de proliferación celular, su estabilidad genómica y su propensión a la muerte celular (Shojaei, 1998; Squier, 2001). Esos eventos pueden estudiarse en la mucosa bucal el cual es un tejido de fácil acceso para el muestreo de células por un método mínimamente invasivo y no produce tensión indebida

a los sujetos de estudio. Este método es cada vez más usado, el uso de células de la mucosa bucal proporciona una oportunidad única para estudiar la capacidad regenerativa del tejido epitelial que es de origen ectodérmico en los humanos (Thomas et al., 2009). La mucosa bucal provee una barrera a carcinogénicos que pueden ser metabolizados para generar productos potencialmente reactivos. Más del 90% de los cánceres parecen tener un origen epitelial, la mucosa bucal puede ser utilizada para monitorear eventos genotóxicos tempranos como resultado de la entrada al cuerpo de potenciales carcinogénicos por ingestión o inhalación (Holland, 2008; Cairns, 1975; Rosin, 1992). Las células de la mucosa bucal han sido utilizadas de forma no invasiva para demostrar con éxito el efecto genotóxico de factores del estilo de vida como fumar tabaco, tratamientos médicos, como radioterapia así como exposición ocupacional a químicos mutagénicos y/o carcinogénicos y para estudios de quimioprevención del cáncer (Holland, 2008; Stich et al., 1982; Stich & Rosin, 1983; Stich et al., 1988). El ensayo ha sido utilizado para medir diferencias distintivas entre perfiles del sistema celular asociados con envejecimiento normal, relativo al envejecimiento prematuro, resultados clínicos como síndrome de Down y enfermedad del Alzheimer. Estos estudios evidencian el potencial valor diagnóstico del enfoque del sistema celular para determinar eventos de inestabilidad genómica y medir la capacidad de regeneración (Thomas, 2007a; Thomas, 2007b).

Proyecto de Frecuencia de Micronúcleos en Poblaciones Humanas

El Proyecto de Frecuencia de Micronúcleos en Poblaciones Humanas HUMN, por sus siglas en inglés, es un proyecto de colaboración internacional. Fue organizado para coleccionar información sobre frecuencias de micronúcleos en diferentes poblaciones humanas y en diferentes tipos celulares. Los procedimientos para esta prueba considerados por el proyecto son: ensayo con linfocitos humanos (método del bloqueo de la citocinesis), exfoliado de células epiteliales y otros tipos celulares. La información recopilada se ha obtenido de un gran número de laboratorios alrededor del mundo y está siendo utilizado en una base de datos unificada. El proyecto fue creado para obtener información para: 1. Determinar los valores de variación “normal” en los diferentes laboratorios y la influencia de otros factores que potencialmente afectan la frecuencia normal de micronúcleos. 2.

Proveer información sobre el efecto de las variaciones en los protocolos para medición de la frecuencia de micronúcleos. 3. Diseñar y probar óptimos protocolos para diferentes tipos celulares. Y 4. Determinar los criterios para los cuales la frecuencia de micronúcleos es un biomarcador válido para envejecimiento y riesgo para enfermedades como cáncer (Fenech, 1999). Actualmente se ha logrado alcanzar estos objetivos y se ha desarrollado un protocolo óptimo para diferentes tipos celulares (Thomas, 2009; Fenech, 2011a; Fenech, 2011b; Fenech, 2002). El proyecto ha validado la metodología para células de exfoliado bucal, y se encuentra unificando información de laboratorios alrededor del mundo.

Ciudad de Guatemala

La Ciudad de Guatemala ha crecido más en la última década que en toda su historia previa. Y las proyecciones a futuro indican que el crecimiento continuará. De seguir el ritmo actual, el espacio urbanizado se duplicaría para el año 2020 y albergará los 3.3 millones de habitantes que se espera vivan en el área metropolitana. Este crecimiento poblacional y espacial se ha dado de una manera desordenada y el efecto parece acentuarse con el tiempo. Adicionalmente, y desde hace unas tres décadas, se ha evidenciado una creciente segregación espacial entre las áreas residenciales (ubicadas principalmente en el extrarradio metropolitano) y las otras actividades (ubicadas principalmente en el Municipio de Guatemala). De especial interés deben ser las zonas industriales, ya que estas se encuentran concentradas y ubicadas dentro del municipio de Guatemala.

Situación territorial de la Ciudad de Guatemala

El proceso de centralismo y del crecimiento espacial y poblacional de la Ciudad de Guatemala ha sido ampliamente documentado por diversos autores. Existe coincidencia sobre el aumento en la escala del desarrollo urbano en los últimos años y los efectos negativos que un crecimiento desordenado produce (Plan de Desarrollo Metropolitano 1995a y b).

En los últimos doce años se ha producido más suelo urbano que en los 218 años de ocupación urbana desde la fundación de la ciudad (AVANCSO 2003, 128). Las

estimaciones indican que el área urbana de la Ciudad se duplicará para el año 2020 si el ritmo de crecimiento espacial continúa al ritmo actual. Eso quiere decir que el área urbanizada y funcionalmente ligada al área metropolitana comenzaría a partir de aproximadamente el kilómetro 40 en poblados como Ciudad Vieja, Sumpango, Palín y Palencia. Existe un 11% del territorio del municipio por urbanizar y existe un 37% que, por razones ambientales o de riesgo, no debería urbanizarse. Esto hace suponer que, hoy por hoy, sólo el 52% del municipio está urbanizado (Plan de Desarrollo Metropolitano 2006).

Las zonas industriales, se concentran en tres agrupaciones: en el sector Atanasio zona 12, el sector Carretera al Atlántico zonas 17 y 18 y, como nueva zona industrial, el sector Periférico Metropolitano zona 25.

Delimitación de zonas urbanas en la ciudad de Guatemala

En el Plan de Ordenamiento Territorial se establecen seis zonas urbanas generales “G” bien definidas, que están ubicadas en un continuo de intensidad de edificación y en un rango desde lo más rural hasta lo más urbano. Las zonas G son las siguientes:

- a. Zona G0 - Zona natural-. Son aquellas áreas de reserva natural, donde por razones ambientales y de alto riesgo no se permite la construcción para la ocupación humana.
- b. Zona G1 - Zona rural-. Son aquellas áreas que aún son rurales o boscosas con un nivel intermedio de riesgo, donde se permite la construcción de edificaciones para la ocupación humana de muy baja densidad, pero donde predomina la preservación ambiental del entorno natural.
- c. Zona G2 - Zona semiurbana-. Son aquellas áreas donde por su ubicación o topografía sólo se permite la edificación de baja densidad en las que las edificaciones están más cercanas unas de otras, pero todavía predomina el verde de los jardines por sobre la masa edificada.

- d. Zona G3 - Zona urbana-. Son las áreas que componen la mayoría del área actualmente urbanizada de la ciudad, donde ya predomina la edificación unifamiliar de mediana densidad por sobre el verde de los jardines, y donde aún no prevalece la vivienda multifamiliar dentro del mismo lote.
- e. Zona G4 - Zona central-. Son las áreas de alta densidad donde predominan los edificios de mediana altura, usualmente en régimen de propiedad horizontal, donde la ocupación de la tierra por el edificio es prácticamente total y los espacios verdes son provistos usualmente en el espacio público.
- f. Zona G5 - Zona núcleo-. Son las áreas de muy alta densidad, donde predominan los edificios con torres bajo el régimen de propiedad horizontal que ocupan todo el lote y usualmente tienen sótanos de estacionamiento. Los espacios verdes generalmente sólo son provistos en el espacio público.

JUSTIFICACIÓN

Los químicos en el ambiente son capaces de interaccionar con el material genético, dañándolo, y si esta lesión no es reparada correctamente se puede originar una serie de efectos, como enfermedades degenerativas, abortos, descendencia con alteraciones genéticas, cáncer, entre otras. La identificación de estos cambios genéticos es un punto clave y esencial antes de llegar a mayores consecuencias. Muchos estudios han demostrado la aparición de alteraciones cromosómicas en los individuos que están en contacto con plaguicidas. El daño potencial que pueden sufrir los organismos al estar expuestos a los diferentes productos debería controlarse. Si se tuvieran los valores de la exposición a agentes genotóxicos y los cambios que estos hubieran provocado, se podría estimar la probabilidad de padecer una determinada enfermedad genética. Pero como esto no es posible de determinar, se emplean métodos comparativos en el análisis de los agentes genotóxicos. Los niños son particularmente vulnerables a contaminantes ambientales, la alta susceptibilidad deriva principalmente de sus características biológicas únicas, que caracterizan las distintas etapas de desarrollo, desde la concepción hasta la adolescencia,

ocurriendo un rápido crecimiento y desarrollo celular, el cual puede ser fácilmente alterado por exposición a tóxicos. El crecimiento celular es particularmente rápido en embriones proporcionando mayor oportunidad a los tóxicos a causar mutaciones y anomalías congénitas. Durante los primeros años de vida por ejemplo se da el desarrollo de la mayor parte del sistema nervioso, si las células son dañadas por químicos en etapas de vulnerabilidad existe un alto riesgo que la disfunción resultante sea permanente e irreversible, pudiendo ser causa de pérdida de la inteligencia y alteraciones del comportamiento normal (Pastor, 2002).

Por tanto los individuos en las distintas etapas de su desarrollo ya sea como fetos o infantes tienen diferentes tipos de vulnerabilidad al daño celular que los adultos y en general son entonces los individuos en edad temprana más susceptibles a sufrir daño celular (Tamburlini, G., Ehrenstein, O., & Bertollini, 2002). Los niños son proporcionalmente más fuertemente expuestos, por unidad de peso corporal a las toxinas ambientales, que los adultos, ya que beben más agua, consumen más alimentos y respiran más aire que los adultos en relación a su peso corporal además de tener preferencias alimenticias distintas y mayores requerimientos energéticos (Snodgrass, 1992; Bearer, 1995; Ryu, 1983). Está demostrada desde hace mucho tiempo la asociación entre la supresión de la respuesta inmune y el aumento en la incidencia de infecciones y cáncer. También está probado que la exposición ambiental a sustancias químicas, pueden alterar el funcionamiento del sistema inmunitario, provocando inmunodeficiencias que pueden acarrear enfermedades más severas (Pastor, 2002).

Existe una segregación socioespacial de la población y de distribución de los distintos usos del suelo y el crecimiento desordenado y de baja densidad en el área metropolitana. La Ciudad de Guatemala tiene una alta centralidad con respecto al resto de poblaciones del país, es la segunda más alta de Latinoamérica, de acuerdo a AVANCSO (2003), el índice de primacía urbana de Guatemala es de 84.3, el cual únicamente es superado por Montevideo, Uruguay, con un índice de 85.4. Entre otros efectos estas condiciones tienen repercusiones directas en la población como: ocupación de áreas de alto riesgo de sismos, deslizamiento e inundación para la vivienda, tanto en el sector formal como informal, lo cual en parte incide

en la pérdida de cobertura forestal; fuerte presión sobre el medio ambiente por contaminación de cuencas, disposición de desechos sólidos, erosión del suelo y tala de árboles, producto de la expansión y ocupación desordenada del territorio; aumento del tiempo perdido, de la contaminación auditiva y del aire, del estrés y del consumo de energía por las necesidades de movilidad diarias requeridas; deterioro de la calidad de vida, aumento del costo de vida y segregación social y familiar de los habitantes del área metropolitana. Es por esto que se hace necesario evaluar si el creciente desarrollo de la ciudad de Guatemala tiene un efecto directo en la salud de las personas.

OBJETIVOS

2.1 General

Describir el daño celular causado al material genético en una población infantil expuesta al medio ambiente urbano en la ciudad de Guatemala.

2.2 Específicos

- a) Determinar la frecuencia de micronúcleos en un grupo de niños expuestos al medio ambiente urbano en la ciudad de Guatemala y en niños no expuestos
- b) Identificar la frecuencia de otros marcadores de daño celular, como: células binucleadas, células con cromatina condensada, cariorrexis, cariólisis y células picnóticas, en niños expuestos y en niños no expuestos.

HIPÓTESIS

La exposición al medio ambiente urbano en la ciudad de Guatemala produce daño del material genético en individuos de edad infantil expresado como un aumento de la frecuencia de micronúcleos y alteraciones nucleares de mucosa bucal en comparación con los niños no expuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo

La población la constituyen niños de edad escolar que viven en condición urbana de la ciudad de Guatemala en el departamento de Guatemala.

Las escuelas en las cuales se obtuvo las muestras de niños que residen en áreas urbanas para este estudio están ubicadas en las zonas 12 y 18 del departamento de Guatemala, las cuales corresponden a las zonas de mayor actividad industrial y también con mayor carga ambiental clasificadas en las categorías G4 y G5. La localización exacta de cada una de las escuelas y proveniencia de los niños/as incluidos en el estudio no se indicarán ya que se acordó total confidencialidad de la información de origen, en ambos grupos tanto expuestos como no expuestos se verificó que los niños tuviesen asistencia mínima e ininterrumpida al centro educativo y que la distancia del centro de estudios a su casa no fuera mayor a 5 kilómetros.

Muestra

El grupo a estudiar correspondió a niños de edad escolar que tenían una asistencia mínima de un año a una institución educativa, ubicada en el municipio de Guatemala, la cual se constituyó en la población fuente, los centros educativos fueron elegidos al azar seleccionando puntos en un mapa, los cuales se obtuvieron de las capas de cobertura de

escuelas del departamento de Guatemala, proporcionados por la Secretaria de Seguridad Alimentaria y Nutricional –SESAN-. Se eligieron centros educativos públicos ubicados en zonas urbanas de la ciudad. Se consideró a niños que residían en las zonas urbanas delimitadas por el Plan de Ordenamiento territorial para el municipio de Guatemala.

Se consideró a un grupo externo que correspondió a individuos de edad escolar, con residencia en un área de predominancia rural del departamento de Guatemala, con similares condiciones que el grupo estudiado, considerando que posee una similar composición étnica. La selección se realizó utilizando mapas de plan de ordenamiento del territorio del municipio de Guatemala, el cual, caracteriza y clasifica las áreas geográficamente de acuerdo a su estado de urbanidad.

A criterio se consideró un total de 65 niños en el estudio, de los cuales 35 corresponden a niños que viven en un área geográfica urbana y 30 corresponden a niños que viven un área geográfica rural, considerando el plan de ordenamiento territorial para el municipio de Guatemala.

Población expuesta: 35 niños/as sanos que asisten a escuelas primarias localizadas en zonas urbanas centrales y zonas urbanas núcleo G4 y G5.

Población no expuesta: 30 niños/as sanos de escuelas primarias localizadas en zonas rurales G1.

Criterios inclusión para niños que viven en áreas urbanas

- Se consideraron niños y niñas de edad escolar que viven en condición urbana de la ciudad de Guatemala en el departamento de Guatemala con edades comprendidas entre los 4 y 11 años.
- Los niños y niñas deben cumplir con una asistencia mínima de dos años a una institución educativa, ubicada en una zona urbana en el municipio de Guatemala.

- Contar con el consentimiento de los padres y asentimiento del niño para la toma de la muestra y para la inclusión de la muestra en el estudio.

Criterios exclusión para niños que viven en áreas urbanas

- Niños y niñas con anomalías genéticas diagnosticadas, enfermedades que requieran tratamiento médico y estuviesen consumiendo medicamentos desde tres meses antes de la prueba no se incluyeron.
- Niños que no accedan participar en el estudio, o que sus padres no firmen el consentimiento informado.
- Extendidos celulares con menos de 1000 células.

Criterios inclusión para niños que viven en áreas rurales

- Se consideró niños y niñas de edad escolar que viven en condición rural en el departamento de Guatemala con edades comprendidas entre los 4 y 11 años.
 - Los niños y niñas deben cumplir con una asistencia mínima de dos años a una institución educativa, ubicada en una zona rural en el departamento de Guatemala.
- Contar con el consentimiento de los padres y asentimiento del niño para la toma de la muestra y para la inclusión de la muestra en el estudio.

Criterios exclusión para niños que viven en áreas rurales

- Niños y niñas con anomalías genéticas diagnosticadas, enfermedades que requieran tratamiento médico y estuviesen consumiendo medicamentos desde tres meses antes de la prueba no se incluyeron.
- Niños que no accedan participar en el estudio, o que sus padres no firmen el consentimiento informado.
- Extendidos celulares con menos de 1000 células.

Muestra

Por cuota y conveniencia.

Obtención de la muestra

Para la obtención de todas las muestras se consideró el asentimiento de los niños y que los padres o tutores legales de todos los individuos proporcionaron la autorización de la toma y de la manipulación de las muestras biológicas bajo los procedimientos éticos estándar (ver documento: Consentimiento Informado en Anexos).

Variables

Variable dependiente

Micronúcleos y anormalidades nucleares

Variable independiente

Exposición a ambiente urbano

Factores de variabilidad

Edad

Sexo

Índice de masa corporal (IMC)

Antecedentes patológicos

Antecedentes toxicológicos

Materiales

Reactivos

- a) Tris-HCl
- b) Sal de sodio del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- c) Cloruro de sodio
- d) Solución de hipoclorito de sodio
- e) Dimetil sulfóxido (DMSO), Hybri-Max™, esterilizado por filtración
- f) Ethanol
- g) Ácido acético glacial
- h) Ácido clorhídrico 5 M (HCl)
- i) Reactivo de Schiff
- j) Solución acuosa 0.2% Colorante Light Green
- k) Medio de montaje
- l) Polietilenglicol

Equipo y suministros

- a) Cepillos citológicos
- b) Contenedores de poliestireno de 30 ml
- c) Pipetas estériles graduadas de 10 ml
- d) Sistema de purificación de agua
- e) Contenedores de poliestireno TV-10
- f) Pipetas Pasteur estériles 900 (22–23 cm)
- g) Viales de conteo 5 ml
- h) Citocentrífuga

- i) Tazas de Citocentrifuga
- j) Laminas para microscopia, extremo esmerilado, 76 mm x 26 mm, 1 mm grueso.
- k) Jarras de Coplin, (75 mm x 25 mm).
- l) Estante de tinción de portaobjetos de polipropileno (70 mm x 86 mm x 21 mm)
- m) Cubreobjetos, no. 1, 22 mm x 50 mm
- n) Microscopio de campo brillante y para examen de fluorescencia con magnificación de 1,000x.
- o) Cajas de almacenamiento de laminas
- p) Parafilm
- q) Guantes de nitrilo

Metodología

Implicaciones Bioéticas

Este estudio se apegó a los principios éticos para investigación médica en seres humanos de la Declaración de Helsinki propuesta por la Asociación Médica Mundial (AMM).

Se respetó las siguientes reglas y/o normas:

Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio.

No se identificará al sujeto y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad, es decir, que se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando éste o su tutor/responsable lo autoricen.

Población de estudio

Los sujetos incluidos en este estudio fueron elegidos intencionalmente de forma no probabilística, y únicamente después de que aceptaron participar por consentimiento informado, se procedió de la siguiente forma: se pidió autorización a directores de Escuelas Primarias para reunir e informar a padres de familia sobre el estudio, una vez obtenido el permiso, se impartió una plática informativa sobre la importancia y metodología del estudio a los padres y niños. Los padres que consintieron la participación de sus hijos en este estudio, firmaron el consentimiento informado, previo de la toma de muestras cada uno de los niños dio su asentimiento.

Posteriormente, se realizó una entrevista cerrada al niño acompañado de su padre o tutor. Se registró su edad, sexo, talla, peso, antecedentes de salud (preguntas realizadas a la madre o tutor) y hábitos toxicológicos. Se realizaron preguntas específicas relacionadas con la exposición: tiempo de residencia en la comunidad, ocupación de los padres, actividades de los niños.

Procedimiento de toma de muestras celulares y procesamiento de la muestra

Se trabajó de acuerdo al protocolo de Thomas et al. (2009), con algunas modificaciones, el cual se resume y describe a continuación:

Se procedió a la toma de muestra de células epiteliales exfoliadas de mucosa con un cepillo estéril, se colectaron las muestras en fijador de Saccomanno que contiene etanol y polietilenglicol diluido en agua, en contenedores plásticos estériles, se asignó un número de registro para cada muestra el cual se asignó en el cuestionario. Las muestras colectadas se colocaron a 4°C para su transporte hasta el laboratorio en donde se procedió a lavar las células en suspensión, con solución tamponada por dilución, para lo cual, se centrifugó la

solución y se eliminó la mezcla de fijador y solución tamponada, se resuspendió en solución tamponada, este proceso de lavado por centrifugación y resuspensión se repitió cuatro veces. Luego se vuelven a centrifugar las células, con lo cual se separan de la solución taponada y se resuspenden adicionándoles después del último lavado Dimetilsulfóxido (DMSO). Luego se fijó las células en etanol: ácido acético glacial, 3:1. Se goteó la suspensión celular en una lámina para microscopía y se dejó secar, para luego someterla a hidrólisis con HCl 5M por 30 minutos, posteriormente se lavó con agua y se dejó secar. Se colorearon con reactivo de Schiff por 30 minutos en oscuridad, se lavó y se contrastó con colorante Light Green por 20-30 segundos finalmente se lavó en agua y se dejó secar. Se preservó con medio de montaje.

Análisis celular

Las células de mucosa celular fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x/1.25. El conteo de micronúcleos y células micronucleadas se realizó manualmente y a ciegas por el mismo observador por fluorescencia y en campo claro. Se realizó el conteo de 1000 células por paciente y se registraron en una base de datos las células con micronúcleos (MN) o con alguna anormalidad nuclear (AN), de acuerdo a los criterios establecidos por Tolbert et al. (1991). Con el objetivo de contar tanto células normales como células micronucleadas o con otra anormalidad nuclear empleando los criterios de HUMNxl (Tolbert et al., 1991; Thomas et al., 2009; Torres-Burgarín et al., 2014). Brevemente descritos aquí: Células Normales (CN) cuando los núcleos tiñen uniformemente con formas ovales o circulares, son más pequeños que los citoplasmas y hay ausencia de cualquier otra estructura a los alrededores del núcleo que contenga ADN, esas células se consideran como completamente diferenciadas. Células micronucleadas (MN) se caracterizan por la presencia de un núcleo principal y estructuras más pequeñas denominadas micronúcleos. Un micronúcleo tiene forma oval o circular y su largo esta entre 1/3 y 1/6 del tamaño del núcleo principal; la intensidad de la tinción, textura y el plano es igual en ambas estructuras. Las características de un micronúcleo son las siguientes: perímetro redondeado y suave que sugiere una membrana, menor a un tercio del

diámetro del núcleo pero lo suficientemente grande como para diferenciarlo en forma y color la intensidad de la tinción es igual a la del núcleo, igual textura que el núcleo, igual plano focal que el núcleo y ausencia de traslape con el núcleo, o algún puente hacia el núcleo. Células binucleadas (CB) son células con dos núcleos principales y usualmente ambos núcleos están cercanos o incluso en contacto, ambos tienen similar forma y tinción que un núcleo normal. La formación de células binucleadas para estar relacionado a interferencias al final de la división celular. Cariorrexis (CR) se caracteriza por agregación de la cromatina nuclear y fragmentación de la membrana nuclear, se visualiza como un patrón nuclear manchado, indicador de la fragmentación nuclear lo cual conduce a la desintegración nuclear. Cromatina Condensada (CC) cuando el núcleo se ve intensamente teñido con agregaciones de cromatina y la membrana está intacta con un patrón nuclear manchado o estriado. Es evidente que la cromatina está agregada en algunas regiones del núcleo mientras otras áreas carecen de la presencia de la cromatina. Cuando la condensación está extendida se observa como un núcleo fragmentado, estas justo como las células con cariorrexis terminan con fragmentación nuclear lo cual conduce a una eventual desintegración del núcleo. Células con núcleos picnóticos (CP) tienen un núcleo con un diámetro de aproximadamente $1/3$ de los núcleos normales, con alta densidad de material nuclear el cual está uniformemente distribuido pero altamente teñido. Cariolisis (CL) se da cuando el núcleo tiene completa ausencia de ADN, la cual probablemente representa una etapa avanzada de muerte celular. Botones Nucleares (BN) el núcleo se observa con una fuerte constricción en uno de sus extremos, sugiriendo un proceso de eliminación del material nuclear por formación de botones o yemas. El lóbulo tiene características similares en morfología a la del núcleo pero es más pequeño ($1/3$ a $1/4$ del núcleo principal).

Análisis estadístico

Por propósitos descriptivos algunos datos están expresados como la media más una desviación estándar. Las células micronucleadas y con otras anomalías nucleares se expresan como media más una desviación estándar y se reportan como el número de ocurrencias por cada mil células. Con el objetivo de determinar diferencias entre la aparición de células micronucleadas y otras anomalías nucleares los datos se tabularon

y analizaron en el programa R. Las diferencias estadísticas entre la aparición de micronúcleos y anormalidades nucleares, en niños expuestos y no expuestos se llevó a cabo mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (para muestras independientes) con valores exactos del valor de p. La estimación puntual del efecto se analizó con un intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS

Características de la población

La ciudad de Guatemala está ubicada a una latitud 14.6229, longitud -90.5315 con una superficie de 996,000 km² y una altitud promedio de 1590 m. Un total de 65 niños fueron evaluados, se incluyeron niños y niñas sanos/as que asisten a escuelas primarias localizadas en zonas urbanas centrales y zonas urbanas núcleo que corresponde a las zonas G4 y G5 y niños y niñas sanos/as que asisten a escuelas primarias localizadas en zonas rurales G1. Los niños ubicados en áreas urbanas y rurales tienen una distribución de edad similar (Ver Cuadro 1).

Cuadro no. 1. Características de los niños evaluados que viven en ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala y niños que viven en ambientes rurales.

Variables		Niños en ambientes urbanos n = 30	Niños en ambientes rurales n = 35
Edad		7.2 ± 2.1	8.3 ± 1.8
Peso		27.5 ± 8.4	31.5 ± 10.9
Talla		119.9 ± 13.0	129.0 ± 12.0
IMC		17.4 ± 2.59	18.4 ± 3.8
Sexo	♀	17	13
	♂	18	17

Índice de Masa Corporal IMC

Frecuencia de células micronucleadas y anomalías nucleares

Se compararon las frecuencias entre los niños que residen en áreas urbanas y niños que residen en áreas rurales. Entre los niños que están potencialmente expuestos a ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala se presentó mayor frecuencia de micronúcleos y de células con anomalías nucleares, las diferencias fueron significativas para la aparición de células con micronúcleos y células binucleadas ($p < 0.001$) con relación a los niños que viven en áreas rurales (Ver cuadro 2).

La frecuencia de células micronucleadas se utilizó como el punto final principal; sin embargo, el marcador del número de micronúcleos también se puede usar como una medida separada para mostrar si las células con múltiples micronúcleos están presentes, aunque dada la rareza de las células que llevan más de un solo micronúcleo no hay diferencias sustanciales entre los dos enfoques, aunque la medición de la frecuencia de células micronucleadas es más estable y se prefiere. La frecuencia de micronúcleos y todos los otros criterios de valoración se expresaron como el número de eventos por cada 1.000 células, independiente de la cantidad de células, se encontró en los niños expuestos hasta un número máximo de 9 micronúcleos por cada mil células.

Cuadro no. 2. Micronúcleos y anomalías nucleares en células de mucosa bucal en niños expuestos a ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala y niños que viven en ambientes rurales.

Variab les	Niños en ambientes rurales n = 30	Niños en ambientes urbanos n = 35	Significancia (Valor de p)*
Micronúcleo	0.30 ± 0.7	2.57 ± 1.9	<0.001
Células Binucleadas	0.73 ± 1.3	2.29 ± 2.1	<0.001
Núcleos Lobulados	0.33 ± 0.6	0.34 ± 0.8	0.833
Cromatina Condensada	13.50 ± 11.7	13.71 ± 12.2	0.992
Picnosis	6.50 ± 4.7	5.00 ± 4.3	0.132
Cariorrhexis	18.20 ± 15.8	26.54 ± 22.6	0.177
Cariolisis	26.90 ± 23.4	39.00 ± 32.5	0.085
Total Anomalías nucleares	66.50 ± 40.7	89.46 ± 55.3	0.086

Se expresan los datos como media desviación estándar M ± DE

* U de Mann –Whitney

La presencia de células binucleadas refleja tanto daño genotóxico como muerte celular, con relación a las anomalías nucleares, algunos investigadores sugieren que la presencia de células binucleadas es un indicador de daño genotóxico, mientras el resto de anomalías nucleares pueden considerarse daño citotóxico (Bolognesi *et. al.*, 2013).

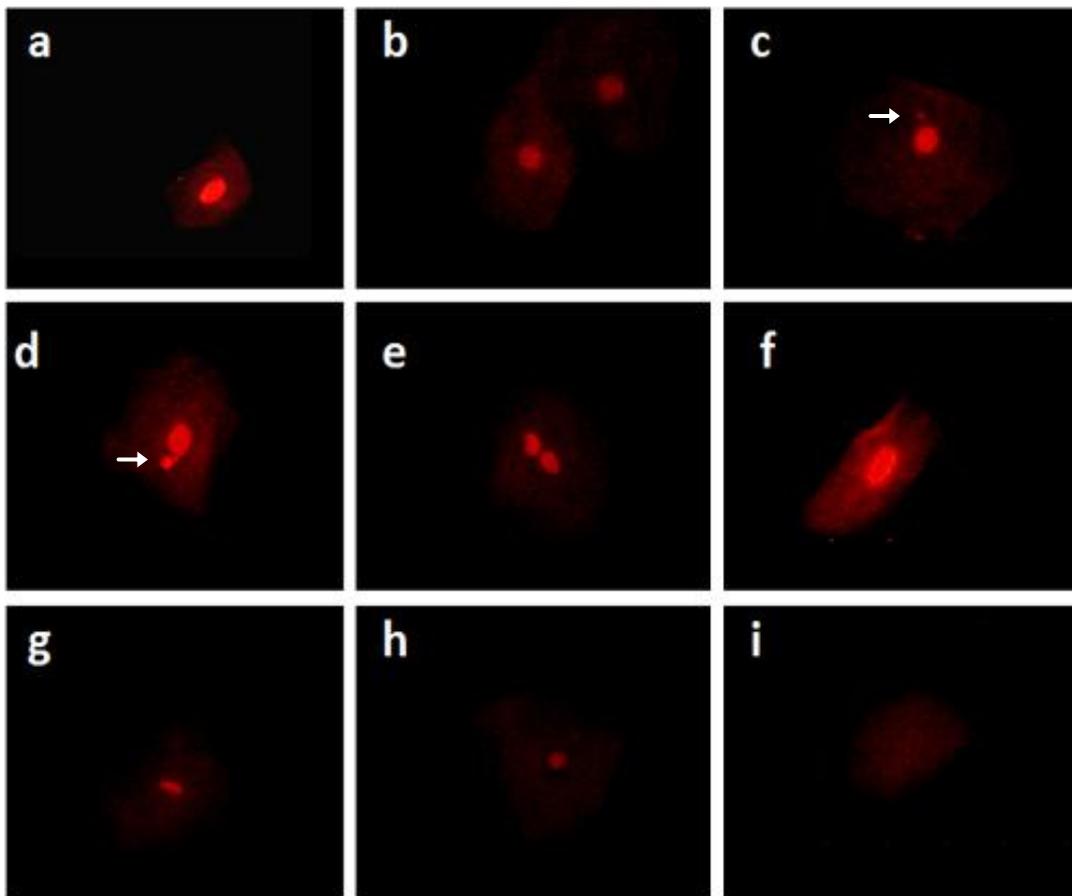
Cuadro no. 3. Resultados del ensayo de mucosa bucal en niños que viven en ambientes urbanos en la ciudad de Guatemala y niños que viven en ambientes rurales.

	Micronúcleos	Núcleo lobulado	Células Basales	Células Binucleadas	Cromatina condensada	Cariorexix	Cariolisis	Picnosis	TAN
<i>Ambiente rural</i>									
Mínimo	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00	2,00	0,00	22,00
Percentil 25%	0,00	0,00	6,25	0,00	4,00	8,00	13,25	3,00	38,75
Mediana	0,00	0,00	9,00	0,00	12,00	14,50	19,50	5,00	52,50
Percentil 75%	0,00	0,00	10,75	1,00	19,50	24,00	32,25	8,00	88,25
Máximo	3,00	2,00	20,00	5,00	56,00	83,00	111,00	19,00	204,00
Media	0,30	0,33	9,30	0,73	13,53	18,17	26,90	6,53	66,50
Desviación estándar	0,70	0,66	4,71	1,28	11,78	15,81	23,37	4,79	40,66
Error estándar	0,13	0,12	0,86	0,23	2,15	2,89	4,27	0,87	7,42
IC Inferior al 95% de la media	-0,25	-0,24	-1,69	-0,46	-4,21	-5,66	-8,36	-1,71	-14,55
IC Superior al 95% de la media	0,25	0,24	1,69	0,46	4,21	5,66	8,36	1,71	14,55
<i>Ambiente urbano</i>									
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	3,00	0,00	29,00
percentil 25%	1,00	0,00	5,50	0,50	5,50	10,50	18,50	2,00	42,00
Mediana	2,00	0,00	8,00	2,00	10,00	16,00	29,00	4,00	70,00
percentil 75%	3,00	0,00	13,50	3,50	18,00	40,50	61,00	6,50	129,00
Máximo	9,00	3,00	29,00	8,00	56,00	93,00	152,00	19,00	241,00
Media	2,57	0,34	10,06	2,29	13,71	26,54	39,00	5,00	89,46
Desviación estándar	1,88	0,80	6,36	2,09	12,21	22,59	32,46	4,32	55,32
Error estándar	0,32	0,14	1,07	0,35	2,06	3,82	5,49	0,73	9,35
IC Inferior al 95% de la media	-0,62	-0,27	-2,11	-0,69	-4,04	-7,48	-10,75	-1,43	-18,33
IC Superior al 95% de la media	0,62	0,27	2,11	0,69	4,04	7,48	10,75	1,43	18,33

Los resultados que se muestran son medias por cada mil células

Figura no 1. Imágenes de las diferentes células teñidas usando Fielgen y Light Green vistos por fluorescencia con filtro rojo lejano

(a) Célula basal; (b) Célula diferenciada; (c) Célula con micronúcleo (flecha); (d) Célula con botón nuclear; (e) Célula Binucleada; (f) Célula con cromatina condensada; (g) Célula con cariorrexis; (h) Célula picnótica; (i) Célula carioliótica. Todas las imágenes fueron tomadas a 1,000x aumentos.



DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó la técnica de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral con el propósito de determinar la presencia de micronúcleos y anomalías nucleares, esta técnica es mínimamente invasiva y se recomienda para estudios de poblaciones pediátricas (Bonassi et al., 2011). Una característica importante de las poblaciones pediátricas es que su exposición ambiental a tóxicos es distinta a la de los adultos, las tasas de detoxificación, procesos de reparación de ADN y proliferación celular son distintos también, por ello niños y adultos aun en el mismo ambiente pueden experimentar diferentes exposiciones. Es bien conocido que los niños deben tener un bajo nivel de daño genético ya que no tienen hábitos de riesgo, no fuman (aunque algunos pueden ser fumadores pasivos), no consumen alcohol o drogas, no presentan exposición laboral a químicos peligrosos y su dieta suele ser menos variada (Neri et al., 2005). Por estas razones entre otras se espera encontrar un bajo nivel de daño celular cuando se estudian poblaciones pediátricas.

La Ciudad de Guatemala ha crecido más en la última década que en toda su historia previa, las proyecciones indican que el crecimiento continuará. De seguir el ritmo actual, el espacio urbanizado se duplicaría para el año 2020 y albergará los 3.3 millones de habitantes que se espera vivan en el área metropolitana, este crecimiento poblacional y espacial se ha dado de una manera desordenada. Desde hace unas tres décadas, se ha evidenciado una creciente segregación espacial entre las áreas residenciales y las otras actividades. Lo cual obliga a buena parte de la población a moverse diariamente entre periferia y centro, aun así, las áreas de actividad industrial y comercial también son áreas de residencia además estas áreas por ausencia de un sistema de planificación albergan escuelas públicas y privadas las cuales quedaron ubicadas sobre o cercanas a las principales vías vehiculares, esto genera enormes ineficiencias y problemas sociales, ambientales y económicos, tanto para los individuos como para la ciudad en su conjunto (POT, 2006). La población y sus actividades, así como la actividad industrial en la ciudad de Guatemala en los últimos años ha ido en aumento lo cual crea una carga ambiental que no ha sido cuantificada en ninguna forma, no existen datos sobre la calidad del aire, agua, suelo o cualquier parámetro ambiental que sean

información pública que nos permita tener idea si existen riesgos de salud sobre las personas que viven en la Ciudad de Guatemala, pero es evidente que los niveles de contaminación en suelo, agua y aire aumentan constantemente y la ciudad aún carece de un plan, ordenamiento o regulación que establezca parámetros ambientales mínimos para los desechos y emisiones tanto para ciudadanos como para la industria y comercio. Manzano *et. al.* (2013) encontró que las aeropartículas contaminantes de la Ciudad de México inducen deleciones del ADN en ratones, lo cual no puede ser muy distinto a lo que sucede en humanos que se ven obligados a permanecer en estas áreas de alta contaminación. Se encontró un número mayor de micronúcleos en niños que viven en zonas urbanas en la ciudad de Guatemala (2.57 ± 1.9) que aquellos que viven en zonas rurales (0.30 ± 0.7), lo cual hace evidente que existe un aumento significativo y que la exposición a los ambientes urbanos de la Ciudad de Guatemala puede inducir daños en el ADN, por su parte la aparición de fallas en la división celular es significativamente diferente entre los niños expuestos (2.29 ± 2.1) y los no expuestos (0.73 ± 1.3). Castañeda-Yslas *et al.* (2016) encontró las más altas frecuencias de células micronucleadas en niños expuestos a pesticidas por actividades agrícolas o por vivir en áreas aledañas a zonas agrícolas con valores de 2.5 (media) \pm 2.5 (desviación estándar) similares a los encontrados en niños que viven en la ciudad de Guatemala, otros estudios en México (Gómez-Arroyo *et al.*, 2013) y Sur América (Benítez *et al.*, 2010; Bernardi *et al.*, 2015) han encontrado valores similares en el incremento de células micronucleadas en niños expuestos a pesticidas. Los niños especialmente susceptibles al daño genotóxico ya que difieren de los adultos en su metabolismo, comportamiento y fisiología, los niños tienen mayor consumo por kilogramo de peso corporal de comida, agua y aire, por lo cual, pueden tener proporcionalmente mayor consumo de agentes tóxicos en el ambiente, a esto también debe agregarse un incremento a la exposición ambiental en niños dado por su comportamiento “mano a boca” lo cual les confiere mayor oportunidad de ingerir compuestos tóxicos presentes en el agua, suelo y polvo. Finalmente las tasas de detoxificación, procesos de reparación de ADN y proliferación celular son distintas. La división celular es distinta ya que la migración celular presenta diferentes tasas de acuerdo a la edad y es influenciada por los flujos hormonales (Neri *et al.*, 2003; Holland, 2011)

Macawile y Sia (2013) evaluaron la aparición de micronúcleos en dos provincias una considerada rural y la otra de tipo urbano, sin encontrar diferencias significativas encontraron mayor ocurrencia (66.3%) en los niños que asisten a escuelas públicas que en aquellos que asisten a escuelas privadas (33.7%), además encontraron que existe mayor frecuencia de micronúcleos en aquellos niños que caminan hacia sus centros de estudios (52.6%) y los que toman el servicio de transporte público (33.1%) que aquellos que se transportan en vehículos con aire acondicionado (14.3%) lo cual puede indicar que la condición socioeconómica del individuo podría predisponerlo a distintas tasas de exposición, en este estudio solo se evaluó niños que asisten a escuelas públicas por lo que incluir el enfoque socioeconómico debiera considerarse en estudios posteriores. En un estudio realizado en Brasil en escolares, Sisenando *et al.* (2012) encontraron que la exposición a contaminación en el aire por quema de biomasa en la Región del Amazonas se veía incrementada encontrando medias para la aparición de micronúcleos entre 0.83 ± 0.56 y 0.87 ± 0.54 comparados con los escolares no expuestos 0.19 ± 0.31 y 0.29 ± 0.46 , estos valores son incluso más bajos a los encontrados aquí, es importante considerar que los valores encontrados en los niños que viven en zonas no expuestas a contaminantes fuertes en el aire son similares los encontrados en niños en Ciudad de Guatemala (0.30 ± 0.7) y coincidentes por lo reportado por Holland *et al.* (2008) para el proyecto en Células Exfoliadas en Mucosa Bucal (HUMN_{XL}). Al comparar entre áreas expuestas y no expuestas a contaminación se ha encontrado que los niños expuestos a contaminación tienen una frecuencia más alta de micronúcleos, resultados semejantes a los que se han encontrado en India, Rusia y Estados Unidos (Lahiri *et al.*, 2000; Maimulov *et al.*, 1998; Huen *et al.*, 2006 y Chen *et al.*, 2006). En la Ciudad México se encontró al comparar niños de varias edades que el efecto de la contaminación en el aire era más fuerte en relación a la frecuencia de micronúcleos en los niños más jóvenes, lo cual se relaciona con la mayor sensibilidad que tienen los niños a la exposición ambiental (Valverde *et al.* 1997 y Wild, 2003). Factores genotóxicos incluyendo mezclas desconocidas en el ambiente, humo de tabaco, nano partículas en el aire, contaminantes en los alimentos (pesticidas y químicos generados al cocinar), combustión de aceite y carbón, así como radiación ionizante y no ionizante han sido estudiados y se ha comprobado su efecto en el incremento de micronúcleos en niños al comprarlos con referentes (Holland *et al.*, 2011). Además al

comparar la frecuencia de micronúcleos la expresión de genes diferenciados, se ha demostrado que existe un pequeño traslape al nivel de transcriptoma entre niños y adultos, y las dos funciones más importantes moduladas en niños pero no en adultos son el nucleosoma y la respuesta inmune, la expresión de múltiples genes se ha podido relacionar significativamente con la frecuencia de micronúcleos en niños aun así debe realizarse más estudios (Van-Leeuwen et al., 2008).

Según Thomas *et al.* (2009) es razonable considerar que los valores individuales que están más allá de dos desviaciones estándar de la media del biomarcador deben considerarse como anormales cuando se comparan los resultados con grupos de similares edades, tomando en cuenta esto puede decirse que el 69% de los niños evaluados que viven en áreas urbanas tiene valores anormales en la aparición de células micronucleadas en relación a los niños que no viven en estas zonas urbanas G4 y G5 de la ciudad de Guatemala. El significado clínico de la presencia de otras anomalías nucleares no está completamente elucidado, en los intentos por entender el significado biológico por otros investigadores de las anomalías nucleares, estas han sido asociadas con la presencia de diversas enfermedades crónicas y degenerativas así como a la exposición a químicos peligrosos. En general la presencia micronúcleos está relacionada con inestabilidad cromosómica o daño en el ADN. La aparición de Células binucleadas es reflejo de un fallo en la citocinesis así como defectos en la formación de los microfilamentos o por arresto del ciclo celular por la mal segregación de los cromosomas o disfunción de los telómeros. Y el resto de anomalías nucleares como cromatina condensada, cariorrexis, células picóticas y cariólisis están asociados a muerte celular (Bolognesi et al., 2013).

La media de la frecuencia de micronúcleos para niños no expuestos (media 0.30%) es más alta que la observada en niños sanos sin exposiciones considerables (Bonassi et al., 2011). Esta media es más alta que la encontrada en niños en áreas rurales (media 0.17%) y urbanas (media 0.22%) en Calcuta (Lahari et al., 2000), y similar a la observada en niños expuestos a quema de biomasa en Brasil (0.29%), y la observada por Ceretti et al. (2014) en Italia (0.29%). De acuerdo con otros investigadores una frecuencia en un intervalo entre 0.03% y 0.17% de micronúcleos puede ser considerado como un rango de aparición espontánea en c

élulas exfoliadas de mucosa oral en niños no expuestos (Bonassi et al., 2011). Chen et al. (2006) estima un intervalo entre 0.05% y 0.08% para personas saludables, al comparar esto con lo encontrado en este estudio tenemos que la media de la frecuencia de micronúcleos encontrados en niños no expuestos es de tres a cuatro veces el valor estimado como referencia para niños en edades similares y que los niños expuestos presentan frecuencias mucho más altas. Estos resultados podrían indicar que existen contaminantes en el ambiente en áreas rurales en la ciudad de Guatemala y apoya los hallazgos que indican que los contaminantes en el ambiente en zonas industriales o urbanas pueden tener efectos genotóxicos en la mucosa oral (Ceretti *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

El ambiente urbano tiene un efecto en el incremento de células micronucleadas y células binucleadas en los niños evaluados que residen en la ciudad de Guatemala

La frecuencia de aparición de micronúcleos es mayor en niños que residen en áreas urbanas en relación con aquellos que viven en áreas rurales en el departamento de Guatemala.

Los resultados del estudio sugieren daño citogenético relacionado a ambientes urbanos en el departamento de Guatemala

RECOMENDACIONES

El estudio tiene un carácter exploratorio, la muestra no es lo suficientemente representativa para generalizar los resultados a la población guatemalteca pero nos permite tener una primera aproximación a lo que pueda estar sucediendo con la población pediátrica en la ciudad de Guatemala, los hallazgos sugieren la existencia de daño citogenético en los niños que residen en ambientes urbanos, por lo que se considera la necesidad de ampliar la muestra e investigar las causas del daño. Se recomienda estudios de biomonitorio para evaluar el efecto de la exposición directa e indirecta, en las habilidades cognitivas y conductuales de los niños; en la prevalencia de alteraciones ginecológicas y en el desarrollo de cáncer entre otros efectos, por lo que se recomienda evaluar grados de exposición, estilo de vida, nutrición y función inmune con el objetivo de poder determinar cuáles podrían ser los mecanismos que generan la formación de micronúcleos durante la infancia y la vida adulta.

REFERENCIAS

1. Angerer, J., Ewers, U. & Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: State of the art. *Int. J. Hyg. Environ.-Health*. 210: 201–228.
2. Arellano, G. M. E., Camarena, O. L., Von-Glascoe, Ch. A., Ruiz, R. B., Zúñiga, V. E. & Montaña, S. T. (2012). Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California. *Salud ambient.*; 12 (2): 93-101.
3. AVANCSO (2003). *El proceso de crecimiento metropolitano de la Ciudad de Guatemala*. Cuadernos de Investigación 18. Guatemala: AVANCSO.
4. Bagci, E. Z., Vodovotz, Y., Billiar, T. R., Ermentrout, G. B. & Bahar, I. (2006). Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2 and mitochondrial permeability transition pores. *Biophysical Journal*; 90 (5): 1546-1559
5. Bearer, C.F. (1995). How are children different from adults?. *Environmental Health Perspectives*, 103(6), 7–12.
6. Benítez, S., Macchi, M.L., Fernández, V., Franco, D., Ferro, E.A., Mojili, A., ... y Sales, L. (2010). Daño Celular en una Población Infantil Potencialmente Expuesta a Pesticidas, *Pediatría (Asunción)*, 37(2). 97-106.
7. Bernardi, N., Gentile, N., Mañas, F., Méndez, À., Gorla, N. y Aiassa, D. (2015). “Assessment of the level of damage to the genetic material of children exposed to pesticides in the province of Cordoba”. *Archivos Latino-Americanos de Pediatría*, 113(2), 26–131.
8. Bolognesi, C., Carrasquilla, G., Volpi, S., Solomon, K. R. & Marshall, E. J. P. (2009). Biomonitorización del riesgo genotóxico en agricultores de cinco regiones colombianas: asociación con la exposición ocupacional al glifosato. Disponible en: <http://www.odc.gov.co/Portals/1/Docs/pesig/PS06012013-biomonitorizacion-riesgo-genotoxic-agricultores-cinco-regione-colombianasglifosato.pdf>
9. Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., & Marcos, R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*; 26: 19-26.

10. Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., y Fenech, M., (2013). “The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay—an update and expanded photogallery,” *Mutation Research*, 753(2), 100–113.
11. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, ... Fenech, M. (2011). The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 728(3), 88-97.
12. Cairns, J. (1975). Mutation Selection and the natural history of cancer. *Nature* 255, 197–200.
13. Carroquino, M. J., Posada, M. & Landrigan, P.J. (2013). Environmental Toxicology: Children at Risk. Chapter 11. E.A. Laws (ed.), *Environmental Toxicology: Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*, DOI 10.1007/978-1-4614-5764-0_11.
14. Castañeda-Yslas, I., Arellano-García, M., García-Zarate, M., Ruíz-Ruíz, B., Zavala-Cerna, M. y Torres-Bugarín, O. (2016). Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology*, 2016 (2016), 1-8. Article ID 7934257. doi: 10.1155/2016/7934257.
15. Ceretti, E., Feretti, D., Viola, G., Zerbini, I., Limina, R., Zani, C., ... y Gelatti, U. (2014). DNA Damage in Buccal Mucosa of Pre-School Children Exposed to High Levels of Urban Air Pollutants. *PLoS ONE*, 09(5), C96524. doi:10.1371/Journal.pone.0096524.
16. Chen C, Arjomandi M, Qin H, Balmes J, Tager I, y Holland N. (2006). Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis*, 21(2), 131-137.
17. Corvi, R., Albertini, S., Hartung, H., Hoffmann, S., Maurici, D. y Pfueller, S. (2008). ECVAN retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis*, 23, 271-83.

18. Countryman, P. I. y Heddle, J. A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 321-32.
19. Fenech, M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today*, 7, 1128-37.
20. Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, 600, 58-66.
21. Fenech, M. (2008). The Micronucleus Assay Determination of Chromosomal Level DNA Damage. *Environmental Genomics*. 185-216.
22. Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang W. P., Burgaz, S., Thomas, P., ... Bonassi, S. (2011a). The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis*, 26, 239-45.
23. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., ... Thomas, P. (2011b). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26, 125-32.
24. Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Calvo-González, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S.M., Calderón-Segura, M.E., ... y Lagarda-Escarrega, A. (2013). “Assessing the genotoxic risk for Mexican children who are in residential proximity to agricultural areas with intense aerial pesticide applications”, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(3), 217–225.
25. Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., y Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 659(1-2), 93-108.
26. Holland, N., Fucic, A., Merlo, D., Sram, R. y KirschVolders, M. (2011). “Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables,” *Mutagenesis*, 26(1), 51–56.

27. Huen, K., Gunn, L., Duramad, P., Jeng, M., Scalf, R., y Holland, N. (2006). Application of a geographic information system to explore associations between air pollution and micronucleus frequencies in African American children and adults. *Environ Mol Mutagen*, 47(4), 236-246.
28. Lahiri, T., Roy, S., Basu, C., Ganguly, S., Ray, M. R. y Lahiri, P. (2000). Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *Indian J. Med. Res.*, 112, 21–26.
29. Lamarche, B.J., Orazio, N.I., Weitzman, M.D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* 584(10): 3682-3695.
30. Lewandowski, T. A. (2013). Factors Influencing Pesticide Risks for Children. Chapter 17. Simeonov, L.I. (eds.), *Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe, NATO Science for Peace and Security*.
31. Macawile, J., y Sia, G. (2014). Epithelial Micronuclei Occurrence Among the School Children in the Province of Cavite, Philippines. *Advances in Environmental Biology*, 7(14), 4901-4904.
32. Maimulov, V. G., Kitaeva, L. V., Vereshchagina, T. V., Mikheeva, E. A. y Shelomova, L. F. (1998). Cytogenetic aberrations in somatic cells of children living in areas with various levels of environmental pollution. *Tsitologiya*, 40, 686–689.
33. Manzano-León N., Villanueva-Sánchez O., Vázquez-López I., Quintana R., Reyes-Martínez N., Yoldi-Vidal A., ... y Osornio-Vargas A.R. (2013). Las aeropartículas contaminantes de la ciudad de México inducen deleciones del DNA en ratones C57BL/6Jpun/pun. *Revista Bio Ciencias* 24(2), 85
34. Moore, L.E., Warner, M.L., Smith, A.H., Kalman, D. y Smith, M.T. (1996). Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen* 27, 176–184.
35. Müller, W. y Streffer, C. (1994). Micronucleus assays. En G. Obe (Ed.), *Advances in Mutagenesis research* 5 (pp. 1-108). Berlín: Springer-Verlag.

36. Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L.E., ... y Merlo, D. F. (2006). Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation. Research.*, 612(1), 14–39.
37. Norpa, H. (2004). Cytogenetic biomarkers. En P. Buffler, J. Rice, R. Baan, M. Bird y P. Boffetta (Eds.), *Mechanisms of carcinogenesis: contribution of molecular epidemiology* (pp. 179-196). Lyon: IARC Scientific Publications.
38. OECD. (2010). *In vitro* mammalian cell micronucleus Test (MNvit). OECD Guideline for Testing of Chemicals, 487. Recuperado de: <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/50108793.pdf>
39. Pastor, S. (2002). *Biomonitorización citogenética de cuatro Poblaciones Agrícolas Europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el Ensayo de Micronúcleos. Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
40. Plan de Desarrollo Metropolitano (1995a). *Guatemala y el contexto internacional: Primer Estudio Base*. Guatemala: Municipalidad de Guatemala.
41. Plan de Desarrollo Metropolitano (1995b). *Guatemala y el contexto nacional: Segundo Estudio Base*. Guatemala: Municipalidad de Guatemala.
42. Rosin, M. (1992). The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutation. Research.* 267(1), 265 - 276.
43. Ryu, J.E., Ziegler, E.E., Nelson, S.E. y Fomon, S.J. (1983). Dietary intake of lead and blood lead concentration in early infancy. *Am J Dis Child*, 137(1), 886.
44. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 73: 39-85.
45. Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H. y Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified ADN by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell. Biol.*, 140(1), 1307-20.
46. Shojaei, A. (1998). Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm. Pharmaceut. Sci.* 1(1), 15-30.

47. Sisman, T. & Türkez, H. (2010). Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. *Toxicologic and Industrial Health*; 26 (10): 641-648.
48. Snodgrass, W.R. (1992). *Physiological and biochemical differences between children and adults as determinants of toxic exposure to environmental pollutants, in Similarities and differences between children and adults: Implications for risk assessment* (edited by P.S. Guzelian, C.J. Henry and S.S. Olin), ILSI Press, Washington, DC, 35–42.
49. Squier, C., y Kremer, M. (2001). Biology of oral mucosa and esohagus. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 7-15.
50. Stich, H., Curtis, J., y Parida, B. (1982). Application of the micronucleous test to exfoliated cells of high cancer risk groups: Tobacco chewers. *International Journal of Cancer*, 30, 553-559.
51. Stich, H.F., y Rosin, M.P. (1983). Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *International Journal of Cancer*, 31, 305–308.
52. Stich, H. F., Rosin, M. P., Hornby, A. P., Mathew, B., Sankaranarayanan, R. y Nair, M. K. (1988). Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *International Journal of Cancer*, 42, 195–199. doi: 10.1002/ijc.2910420209
53. Tamburlini, G., Ehrenstein, O., y Bertollini, R. (2002). Children’s health and environment: A review of evidence. A joint report from the European Environment Agency and the WHO Regional Office for Europe. *World Health Organization. Environmental issue report* No 29; 223pp.
54. The cell within cytomics. (2004). Recuperado de: <http://www.uv.es/cytomics/caceres-2004.htm>
55. Thomas, P. y Fenech, M. (2007a). Chromosome 17 and 21 aneuploidy in buccal cells is increased with ageing and in Alzheimer’s disease. *Mutagenesis* 23, 57–65.
56. Thomas, P., Hecker, J., Faunt, J., y Fenech, M. (2007b). Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer’s disease. *Mutagenesis* 22, 371–379.

57. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E.,... y Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, 4, 825–837.
58. Tolbert, P., Shy, C., y Allen, J. (1991). “Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users,” *American Journal of Epidemiology*, 134(8), 840–850.
59. Torres-Bugarín, O. Zavala-Cerna, M., Nava, A., Flores- García, A., y Ramos-Ibarra, M. (2014). “Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells”. *Disease Markers*, 2014(1), ArticleID956835.
60. Valverde, M., Lopez, D., Lopez, M., Sanchez, I., Fortoul, I., Ostrosky-Wegman, T.I., y Rojas, E. (1997). DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30, 147–152.
61. Van-Leeuwen, D. M., Pedersen, M., Hendriksen, P. J., Boorsma, A., VanHerwinjnen, M., Gottschalk, R., ... Kleinjans, J. (2008). Genomic analysis suggests higher susceptibility of children to air pollution. *Carcinogenesis*, 29(5), 977–983. doi: 10.1093/carcin/bgn065
62. Wild, C. P., y Kleinjans, J. (2003). Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy? *Cancer Epidemiol. Biomarkers*, 12, 1389–1394.

ANEXO 1. Consentimiento informado**CONSENTIMIENTO INFORMADO****Universidad de San Carlos de Guatemala****Centro de Investigaciones Biomédicas**No. *“Daño celular en una población infantil expuesta al medio ambiente urbano en la Ciudad de Guatemala”***CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Usted ha sido seleccionado para ser informado respecto al trabajo de investigación que estamos realizando en la Universidad de San Carlos de Guatemala. El propósito de hablar con usted es invitarlo a participar en este trabajo de investigación con el fin de identificar daño celular en edad temprana.

El estudio durará 3 meses y su participación será UNA ÚNICA VEZ, vamos a examinar a 100 distintos niños. Si usted acepta que el niño niña menor de edad, bajo su tutela, participe en el estudio, su participación consiste en: autorizarnos a tomar una muestra de células del epitelio bucal (región interna de la mejilla), para analizar en ella si su hijo o menor bajo su tutela, tiene algún indicio de daño celular.

Si usted no lo desea, no es necesario que participe en este estudio. Usted es libre de decidir el momento que quiera retirarse del estudio si usted se arrepiente o no se siente cómodo con las preguntas que se le realizarán. Así mismo, usted acepta que la muestra sea utilizada en estudios posteriores en relación a esta investigación. Los resultados del análisis de epitelio bucal, son confidenciales, se le proporcionarán únicamente a usted.

He tenido conocimiento y he leído el consentimiento sobre el estudio que se está realizando en el Centro de Investigaciones, he recibido respuestas a mis preguntas y dudas, deseo participar voluntariamente aunque si cambio de parecer y ya no quiero, me puedo retirar.

Nombre: _____ Firma o Huella _____

No. DPI: _____ Fecha _____

***En caso que el padre o madre no sepa leer y/o escribir**

Nombre del Testigo _____ Firma oHuella _____

No. DPI: _____ Firma _____

**Enfermedad
neurodegenerativa**

No ()

si ()

Relación _____

Enfermedades recientes

Medicamentos

8). Ocupación

Padre _____

Madre _____

9). Exposición

Químicos

no ()

si ()

Tipo _____

(Anestesia, Herbicidas,
fungicidas, otros)

Rayos X

no ()

si ()

¿Hace cuánto tiempo? _____

Antenas

de _____

telecomunicación

no ()

si ()

Distancia de la casa _____

Tiempo de exposición _____

Otro _____

10). Tipo de Sangre

A+

A-

AB+

AB-

B+

B-

O+

O-

ANEXO 3. Conteo individual de micronúcleos y alteraciones nucleares de niños de áreas urbanas.

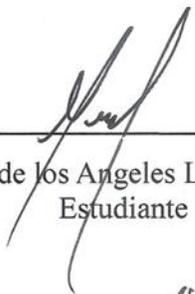
No.	MN	NL	BA	BN	CC	CR	CL	PN	TAN
1	3	0	18	2	8	15	15	2	45
2	1	0	9	4	15	12	20	4	56
3	2	0	23	2	8	42	68	10	132
4	2	0	13	3	3	8	15	2	33
5	4	0	11	2	4	11	9	2	32
6	6	0	29	0	4	24	29	6	69
7	1	0	6	0	4	6	26	0	37
8	2	0	9	2	8	21	27	10	70
9	0	0	18	0	12	3	6	9	30
10	9	1	18	4	26	46	66	4	156
11	1	0	7	1	19	16	36	3	76
12	2	0	13	0	16	24	18	7	67
13	4	0	10	1	18	54	62	8	147
14	1	0	15	0	5	50	70	0	126
15	2	0	8	6	18	10	20	0	56
16	3	1	19	1	6	55	65	19	150
17	1	0	4	0	8	23	33	4	69
18	3	0	7	0	0	14	19	3	39
19	1	0	7	0	2	3	21	2	29
20	5	0	8	2	2	10	16	2	37
21	5	0	8	2	16	35	29	5	92
22	3	0	9	2	13	66	152	5	241
23	1	0	4	3	7	93	98	2	204
24	2	0	6	6	15	27	36	2	88
25	1	3	14	5	27	4	3	11	54
26	1	0	0	0	0	11	19	1	32
27	2	2	7	4	10	20	35	3	76
28	2	1	3	8	24	57	68	6	166
29	3	1	3	3	25	13	44	3	92
30	5	0	5	3	8	73	60	5	154
31	3	3	3	2	7	9	12	1	37
32	2	0	5	5	44	14	23	13	101
33	0	0	15	1	56	15	31	13	116
34	2	0	5	5	30	6	7	5	55
35	5	0	13	1	12	39	107	3	167
Media ± DE	2,6 ± 1.9	0,3 ± 0.8	10,1 ± 6.4	2,3 ± 2.1	13,7 ± 12.6	26,5 ± 22.6	39,0 ± 32.5	5,0 ± 4.3	89,5 ± 55.3

Micronúcleos (MN); Núcleo Lobulado (NL); Basales (BA); Binucleada (BN); Cromatina Condensada (CC); Cariorrexis (CR); Cariolisis (CL); Pcnosis (PN); Total de Alteraciones Nucleares (TAN)

ANEXO 4. Cuento individual de micronúcleos y alteraciones nucleares de niños de áreas rurales.

No.	MN	NL	BA	BN	CC	CR	CL	PN	TAN
1	0	0	20	5	9	10	13	15	59
2	3	0	9	2	20	8	10	0	53
3	1	2	9	0	17	5	2	2	51
4	0	1	15	4	4	4	7	8	57
5	1	1	10	3	24	30	27	11	43
6	0	0	8	0	2	5	12	3	90
7	0	0	3	1	0	16	22	2	105
8	0	0	2	0	4	83	111	6	83
9	1	0	7	1	16	14	19	7	51
10	0	0	15	1	13	20	13	12	139
11	2	1	14	0	4	24	17	5	108
12	0	0	4	0	6	17	20	8	128
13	0	0	3	0	5	24	20	8	69
14	0	0	20	0	8	15	15	5	71
15	0	1	7	0	20	28	36	5	38
16	0	0	9	0	25	35	40	5	37
17	0	0	8	1	17	22	33	10	52
18	1	2	9	1	18	10	15	4	100
19	0	0	9	0	56	40	24	19	28
20	0	0	10	0	28	18	45	17	35
21	0	0	14	0	12	25	89	2	24
22	0	2	9	1	28	5	30	3	59
23	0	0	8	0	14	7	37	13	53
24	0	0	7	0	24	2	8	4	51
25	0	0	11	2	4	10	19	2	57
26	0	0	4	0	12	14	19	7	43
27	0	0	6	0	12	30	55	3	90
28	0	0	17	0	2	8	14	4	105
29	0	0	6	0	1	8	24	2	83
30	0	0	6	0	1	8	11	4	51
Media ± DE	0.3 ± 0.7	0,3 ± 0.7	9.3 ± 4.7	0.7 ± 1.3	13.5 ± 11.8	18.2 ± 15.8	26.9 ± 23.4	6.5 ± 4.8	66.5 ± 40.7

Micronúcleos (MN); Núcleo Lobulado (NL); Basales (BA); Binucleada (BN); Cromatina Condensada (CC); Cariorrexis (CR); Cariolisis (CL); Picnosis (PN); Total de Alteraciones Nucleares (TAN)



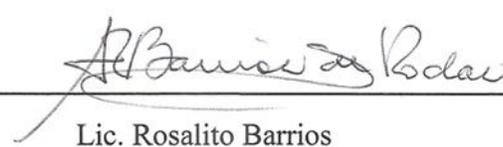
María de los Angeles Lima Ibarra
Estudiante



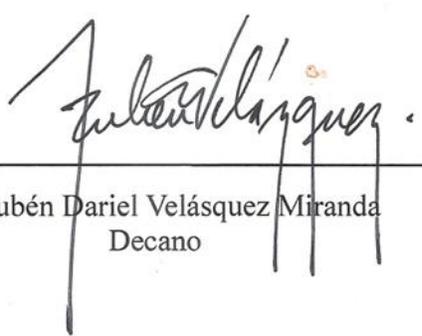
Dr. Gabriel Silva Arévalo
Asesor



PhD. Sergio Alejandro Melgar
Revisor



Lic. Rosalito Barrios
Directora de Escuela



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano