

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA GASOLINA, DIÉSEL Y  
GAS EN EXPENDEDORES DE ESTACIONES DE SERVICIO Y EN EL MEDIO  
AMBIENTE CIRCUNDANTE**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**POR: DANA GABRIELA URQUIETA GEMIO**

**TUTOR:**

**M.Sc. Ximena Taborga Manrique**  
**Docente de la carrera de Bioquímica-UMSA**

**La Paz-Bolivia**

**2023**

### **DEDICATORIA:**

A Dios por amarme y guiarme ABBA PAPITO.

A mis hermanos en especial a mis ángeles preciosos mis padres que han sido mi fortaleza y que con su sacrificio diario han forjado en mí persona una mujer de bien.

A mi hija Mayte Fernanda que, con su hermosa sonrisa, ocurrencias que ilumina mis días oscuros y me da toda la fuerza para seguir remando en esta vida.

Si la vida es amor, bendita sea. ¡Quiero más vida para compartirla con ustedes!

Este logro alcanzado en mi vida va a la memoria de mi Abuelita Aida Mena que la recuerdo con mucho amor desde el cielo sé que está orgullosa de mí.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios mi padre celestial, por permitirme llegar a este punto de mi vida, por los momentos difíciles que me ha enseñado a valorar cada día más.

A mi familia por confiar en mí, ser el centro de mi vida y la motivación para cosechar éxitos personales y profesionales, agradecida por su apoyo incondicional como asesora de la tesis. A la Dra. Ximena Taborga por su comprensión, apoyo en la culminación de la tesis.

**INDICE**

**RESUMEN**

**Error! Bookmark not defined.ABSTRACT 9**

1.	INTRODUCCIÓN	Error! Bookmark not defined.	2.
	ANTECEDENTES		13
3.	JUSTIFICACIÓN	Error! Bookmark not defined.	4.
	OBJETIVOS		21
4.1	OBJETIVO GENERAL	Error! Bookmark not defined.	4.2
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS		21
5.	FUNDAMENTO TEÓRICO	Error! Bookmark not defined.	5.1
	CONTAMINACIÓN AMBIENTAL		22
5.2	CONTAMINANTES AMBIENTALES PROCEDENTES DE ESTACIONES DE SERVICIO	Error!	
	<b>Bookmark not defined.</b> 5.2.1	GASOLINA	23
	5.2.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA		23
	5.2.1.2 METABOLISMO DE LOS COMPONENTES DE LA GASOLINA		24
	5.2.1.3 POTENCIAL TÓXICO DE LA GASOLINA		26
	5.2.1.4 COMPONENTES ALTAMENTE TÓXICOS DE LA GASOLINA		26
	5.2.2 DIÉSEL		29
	5.2.3 GAS NATURAL VEHICULAR (GNV)		30
	5.2.4 GAS LICUADO DE PETRÓLEO (GLP)		30
5.3	GENOTOXICIDAD EN CÉLULAS HUMANAS Y EN OTROS ORGANISMOS	Error! Bookmark not	
	<b>defined.</b> 5.3.1	MICRONÚCLEOS	32
	5.3.1.1 FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS		32
	5.3.1.2 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS		35
	5.3.2 CÉLULAS BINUCLEADAS		36
	5.3.3 CARIORREXIS		36
	5.3.4 CARIÓLISIS		36
	5.3.5 NÚCLEO LOBULADO		37
	5.3.6 NÚCLEO PICNÓTICO		37
5.4	ALLIUM CEPA	Error! Bookmark not defined.	5.4.1
	TEST ALLIUM		38
5.5	EISENIA FÉTIDA	Error! Bookmark not defined.	5.5.1
	ENSAYOS CON EISENIA FETIDA		40
5.6	LACTUCA SATIVA	Error! Bookmark not defined.	5.6.1
	ENSAYOS CON LACTUCA SATIVA		41
6.	DISEÑO METODOLÓGICO	Error! Bookmark not defined.	6.1
	TIPO DE ESTUDIO:		41
6.2	LUGARES DE TOMA DE MUESTRA	Error! Bookmark not defined.	6.3
	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE MUCOSA YUGAL Y DATOS DE VOLUNTARIOS		42

6.4	RECOLECCIÓN Y PRE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SUELO DE ESTACIONES DE SERVICIO	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	6.5
	FLUJOGRAMAS DE TRABAJO		43
6.6	TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	6.6.1
	IDENTIFICACIÓN DE ANORMALIDADES NUCLEARES EN CÉLULAS DE DESCAMACIÓN DE TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO Y GRUPO CONTROL		44
6.6.2	EFECTO DE SUELO CONTAMINADO DE ESTACIONES DE SERVICIO SOBRE EISENIA FETIDA, ALLIUM CEPA Y LACTUCA SATIVA		46
6.6.2.1	ENSAYO CON EISENIA FOETIDA		46
6.6.2.2	TEST ALLIUM.		47
6.6.2.3	ENSAYO CON LACTUCA SATIVA		48
6.6.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO		48
7.	<b>RESULTADOS</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	7.1
	ANORMALIDADES NUCLEARES EN TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO		49
7.2	RELACIÓN DE MICRONÚCLEOS Y CARIORREXIS CON VARIABLES ANTROPOGÉNICAS	<b>Error!</b>	
	<b>Bookmark not defined.</b>		
7.3	ALTERACIONES EN LAS CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE ALLIUM CEPA PRODUCIDAS POR EXPOSICIÓN A AGUA CONTAMINADA CON GASOLINA		56
7.4	ANORMALIDADES NUCLEARES EN EISENIA FOETIDA POR EXPOSICIÓN A SUELOS CONTAMINADOS CON GASOLINA	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	7.5
	EFECTO DEL SUELO CONTAMINADO CON DERIVADOS DEL PETRÓLEO SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE LACTUCA SATIVA		61
7.5.1	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN RELATIVO		61
7.5.2	CRECIMIENTO PROMEDIO DE LA RADÍCULA		62
8.	<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	9.
	<b>CONCLUSIÓN</b>		72
10.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	

**TABLA 1.** PORCENTAJE DE GERMINACIÓN RELATIVA **Error! Bookmark not defined.** **TABLA 2.**  
CRECIMIENTO PROMEDIO DE LA RADÍCULA 62

**INDICE DE GRAFICOS**

<b>GRAFICO 1.</b> METABOLISMO DEL BENCENO.	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 2.</b>
ESQUEMA DE FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS.		34
<b>GRAFICO 3.</b> MORFOLOGÍA DE LA LOMBRIZ DE TIERRA.	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 4.</b>
ANATOMIA Y FISIOLOGIA DE LA LOMBRIZ ROJA CALIFORNIANA.		39
<b>GRAFICO 5.</b> CON MUESTRAS DE TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO Y GRUPO CONTROL.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 6.</b>
	CON MUESTRAS DE SUELO	
		44
<b>GRAFICO 7.</b> FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS EN TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIOS FRENTE A UN GRUPO CONTROL	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 8.</b>
MICRONUCLEOS EN CELULAS DE DESCAMACION DE LA MUCOSA ORAL DE TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO		50
<b>GRAFICO 9.</b> ANORMALIDADES NUCLEARES EN VOLUNTARIOS DE ESTACIONES DE SERVICIO FRENTE A UN GRUPO CONTROL	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 10.</b>
CÉLULAS CARIORRÉXICAS.		51
<b>GRAFICO 11.</b> CÉLULAS BINUCLEADAS	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 12.</b>
FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS Y CARIORREXIS SEGUN SEXO		53
<b>GRAFICO 13.</b> FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS SEGÚN EDAD	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 14.</b>
FRECUENCIA DE CARIORREXIS SEGÚN EDAD		54
<b>GRAFICO 15.</b> FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y CARIORREXIS SEGÚN ANTIGÜEDAD LABORAL.....	<b>Error!</b>	<b>Bookmark not defined.</b>
<b>GRAFICO 16.</b> SÍNTOMAS FRECUENTES EN TRABAJADORES DE ESTACIONES DE SERVICIO.....		56
<b>GRAFICO 17.</b> CÉLULAS MERISTEMÁTICAS EN MITOSIS DE CEBOLLAS TRATADAS CON AGUA CONTAMINADA CON SUELO DE ESTACIONES DE SERVICIO	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>GRAFICO 18.</b>
FRECUENCIA DE FASES MITÓTICAS DE CEBOLLAS TRATADAS CON AGUA CONTAMINADA CON GASOLINA		58
<b>GRAFICO 19.</b> FASES DE LA MITOSIS IDENTIFICADAS EN CÉLULAS APICALES DE <i>ALLIUM CEPA</i> , CON TINCIÓN PANÓPTICA: FOTOS 15 Y 16: PROFASE, FOTOS 17 Y 18: METAFASE, FOTOS 19 Y 20: TELOFASE.	<b>Error!</b>	<b>Bookmark not defined.</b>
<b>GRAFICO 20.</b> ANORMALIDADES NUCLEARES EN <i>EISENIA FOETIDA</i> EXPUESTA A SUELOS CONTAMINADOS CON DERIVADOS DE PETRÓLEO		60
<b>GRAFICO 21.</b> CELOMOCITOS	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	





## **RESUMEN**

Las estaciones de servicio expenden derivados de petróleo que son capaces de causar daño al ser humano y a los organismos que habitan en el entorno. La gasolina, diésel y otros productos similares, contienen sustancias químicas que ocasionan genotoxicidad y citotoxicidad cuando los organismos vivos están expuestos constantemente, debido a esto varias enfermedades pueden ser originadas, entre ellas el cáncer. Para prevenir el desarrollo de estas enfermedades en los trabajadores de estaciones de servicio es posible realizar un análisis celular para determinar anormalidades nucleares que suelen aparecer como consecuencia de rotura de doble hebra del DNA u otro tipo de daño en el DNA o en proteínas; de la misma forma, es posible analizar el efecto del suelo contaminado con los derivados del petróleo sobre organismos animales y vegetales que son utilizados como bioindicadores. En el presente trabajo se realizó la observación microscópica de muestras de mucosa oral de 60 trabajadores de estaciones de servicio con el propósito de identificar y cuantificar anormalidades nucleares. De la misma forma se determinó el efecto de suelo contaminado con derivados de petróleo procedente de estaciones de servicio sobre *Eisenia fétida* (lombriz de tierra), *Allium cepa* (cebolla) y *Lactuca sativa* (lechuga). Se observó un gran número de células cariorréxicas en personas y en celomocitos de lombriz de tierra, así como un incremento del número de anormalidades nucleares en relación con los grupos control. En cebolla se pudo determinar una disminución de la frecuencia de fases mitóticas en relación al control y en lechuga se verificó inhibición parcial de germinación y crecimiento radicular.

## **ABSTRACT**

Service stations sell petroleum derivatives that are capable of causing harm to humans and the organisms that inhabit the environment. Gasoline, diesel, and other similar products contain chemical substances that cause genotoxicity and cytotoxicity when living organisms are constantly exposed, because of that several diseases can be caused, including cancer. To prevent the development of these diseases in service station workers, it's possible to perform a cell analysis to determine nuclear anomalies that usually appear as a result of DNA double-strand breakage or other types of DNA or protein damage; In the same way, it is possible to analyze the effect of soil contaminated with petroleum derivatives on animal and plant organisms that are used as bioindicators. In the present work, the microscopic observation of

oral mucosa samples from 60 service station works was carried out to identify and quantify nuclear anomalies. In the same way, the effect of soil contaminated with oil derivatives from service stations on *Eisenia fetida* (earthworm), *Allium cepa* (onion), and *Lactuca sativa* (lettuce) was determined. A large number of karyorrhexic cells were found in humans and in earthworm coelomocytes, as well as an increased number of nuclear abnormalities relative to control groups was found. In onion, it was possible to determine a decrease in the frequency of the mitotic phase in the control. In lettuce, partial inhibition of germination and root growth was verified.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Algunos de los grandes problemas que enfrenta actualmente la población mundial son la contaminación ambiental y enfermedades que van en aumento como el cáncer, estas situaciones

se van incrementando paulatinamente y se tornan en preocupación creciente para la población mundial. Se debe tomar en cuenta, que gran parte de la contaminación de nuestro planeta es consecuencia de la actividad humana y que las grandes ciudades, especialmente las industrializadas, emiten enormes cantidades de contaminantes al medio ambiente, aunque también contribuyen los países en desarrollo. Parte de esta contaminación se debe a la emanación de gases de hidrocarburos, que se produce en las estaciones de servicio (gasolineras) (Wei *et al.*, 2010).

Existen muchas enfermedades producidas por la contaminación ambiental que no se presentan con sintomatología en las etapas iniciales; pero, cuando la exposición es continua, y el proceso es crónico, pueden dar lugar a enfermedades tan letales como el cáncer, el cual se caracteriza por ser una enfermedad que daña gravemente a diversos tejidos y es una enfermedad degenerativa, además, el número de casos va en aumento a nivel mundial, puede ser consecuencia de la actividad laboral y se encuentra asociado a hábitos deletéreos, tales como el consumo de tabaco, alcohol, alimentos procesados y falta de ejercicio (World Health Organization- Who, 2018).

La exposición a hidrocarburos es muy evidente en estaciones de servicio, en estos lugares, los trabajadores están expuestos a vapores de hidrocarburos por el expendio de gasolina, diésel y gas vehicular, productos que contienen benceno, tolueno y xileno (BTX) que representan un gran riesgo para la salud y el medio ambiente por el daño genotóxico y citotóxico que producen. Los BTX causan, además, efectos agudos y crónicos en el Sistema Nervioso Central, pueden generar intoxicación aguda produciendo cefalea, náuseas, mareos, irritación respiratoria (tos y dolor de garganta), desorientación e inquietud (Hayashi *et al.*, 1991).

Las mezclas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) que son derivadas del petróleo, ocasionan ciertas patologías de origen mutagénico y carcinogénico, las cuales producen estrés oxidativo a nivel nuclear, implicando daño en los mecanismos de reparación del ADN y predisponiendo al desarrollo de enfermedades (Gonzalez Torres *et al.*, 2015).

Los disolventes orgánicos interactúan con los ácidos nucleicos produciendo un efecto genotóxico, que pueden dar lugar a graves patologías (Speit *et al.*, 1996). El efecto de un

agente genotóxico puede ser diferente entre individuos, pero en el 80% de los casos el desarrollo de cáncer es el resultado de una mayor exposición a carcinógenos ambientales (Van Damme et al., 1995).

El biomonitoreo genético es una herramienta primordial para la evaluación de riesgos asociados a agentes genotóxicos, el cual nos permite identificar no solo los riesgos, sino también a la población implicada, las medidas de prevención de enfermedades y la delimitación de la exposición a sustancias genotóxicas. Se debe tomar en cuenta también que los ensayos citogenéticos son de gran utilidad para determinar el daño genético inicial que da lugar a una etapa neoplásica (diagnóstico preventivo) (Speit, *et al.*, 1996). Para realizar un buen biomonitoreo se necesita contar con procedimientos precisos, sensibles y, si es posible, fáciles y rápidos.

Una técnica que cumple con los requisitos mencionados es el ensayo de micronúcleos, a través del cual se puede identificar la rotura cromosómica y la pérdida de cromosomas en células binucleadas (Kirsch Volders & Fenech, 2001). El ensayo de micronúcleos realizado en células bucales, exfoliadas ha resultado de gran utilidad y es mínimamente invasivo y ampliamente utilizado para controlar el daño genético en seres humanos y en otros organismos, con este propósito ha sido empleado desde 1980, especialmente para evidenciar los efectos citogénicos de la exposición ambiental y ocupacional, además de la interacción de otros factores, como el estilo de vida, deficiencias dietéticas y el efecto de algunas enfermedades (Fenech *et al.*, 1999). El ensayo de micronúcleos representa la citometría del bloqueo de la citocinesis, es un sistema que sirve para determinar rotura en el ADN que se manifiesta cuando la célula se está dividiendo durante la citocinesis, una de las dos células resultantes puede tener un micronúcleo. De esta manera, este ensayo, es un biomarcador de la ruptura de cromosomas o bien de la incapacidad de un cromosoma completo de alinearse en el ecuador del huso acromático durante la metafase.

Además de los micronúcleos, se puede identificar otras anormalidades nucleares (AN) en las células epiteliales de la mucosa oral, las cuales suelen producirse por efecto de periodos prolongados de inducción de lesión en el ADN, disminución de la reparación de la lesión, o como consecuencia de procesos inflamatorios o necróticos. Entre las anormalidades nucleares que pueden ser consecuencia de la exposición a genotóxicos se ha identificado las

siguientes: cariorrexis, cariólisis, núcleo picnotico, núcleo lobulado, célula binucleada. (Torrez *et al*, 2013). Las células con puentes nucleoplásmicos también han sido identificadas como biomarcadores de reparación incorrecta del ADN y las células con núcleo lobulado, son consideradas como biomarcadores de la eliminación del ADN amplificado (Fenech, 2007).

A través de este trabajo se determinó el efecto genotóxico producido por la exposición a la gasolina, diésel y gas en las personas que se dedican al expendio de dichos productos y en el medio ambiente, mediante pruebas de laboratorio, a través de las cuales se realizó la identificación de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en trabajadores de estaciones de servicio, expuestos a gasolina, diésel y gas; por otro lado, y con el propósito de explorar el efecto de los hidrocarburos asentados en el suelo sobre otras especies, se identificaron anormalidades cromosómicas mediante el test *Allium*, en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa*), se vio el efecto citostático en raíces de *Lactuca sativa* y se identificaron anormalidades en celomocitos de *Eisenia foetida*.

## **2. ANTECEDENTES**

La contaminación ambiental producida por el petróleo y sus derivados ha sido estudiada por varios investigadores, utilizando diferentes biomarcadores animales y vegetales y se ha demostrado que afecta significativamente diversas estructuras macroscópicas y microscópicas, así como varias funciones celulares y orgánicas. Se infiere que un efecto similar se produce en las personas que viven o trabajan en lugares contaminados y que un efecto parecido se produce en los muchos tipos de vida que comparten estos ecosistemas con el ser humano. Los siguientes son algunos ejemplos de los trabajos de investigación que han sido realizados para demostrar el efecto tóxico mencionado.

Arul et al., en el año 2017 realizaron un estudio en India donde evaluaron la genotoxicidad de la gasolina con la prueba de micronúcleos en células epiteliales bucales exfoliadas de la mucosa oral, en 50 trabajadores de estaciones de servicio y 50 trabajadores del personal administrativo de un hospital, como grupo control. Los resultados que obtuvieron fueron que los trabajadores presentaron una frecuencia media de micronúcleos significativamente mayor que la de los controles, concluyendo que los trabajadores de estaciones de servicio se

encuentran en riesgo significativo de daño citogenético y que los micronúcleos son biomarcadores útiles para la determinación de exposición ocupacional a químicos genotóxicos.

Shaikh *et al.*, en el año 2018 estudiaron las muestras de 70 trabajadores de una estación gasolinera y 70 hombres sanos también en la India, los trabajadores estuvieron expuestos entre 8 a 12 horas a los vapores de la gasolina, todos los días por un tiempo de 14 a 30 años, como resultado obtuvieron una alta prevalencia de todos los tipos de anormalidades nucleares, excepto de células binucleadas, este resultado implica mayor grado de apoptosis, necrosis y muerte celular.

Xiong *et al.*, en el año 2016 en China analizaron el estrés oxidativo y genotoxicidad de la exposición ocupacional a largo plazo a niveles bajos de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) en trabajadores de estaciones de servicio (BTEX son importantes compuestos de la gasolina que se encuentran en niveles bajos en la atmósfera de estos centros laborales). El estudio fue realizado en 200 trabajadores de estaciones de servicio y 52 trabajadores del área administrativa como control, pudieron encontrar como consecuencia de la exposición, la reducción de la capacidad antioxidante y el daño genético que generan los niveles bajos de BTEX en los trabajadores de las áreas de reabastecimiento de la estación de servicio, resultado que fue significativo en relación a los trabajadores del área administrativa.

Gowdappa Doddawad *et al.*, en el año 2019 realizaron una investigación en India para la evaluación, mediante la prueba de micronúcleos, en personas que trabajan con petróleo y que, por tanto, se encuentran expuestas a las sustancias tóxicas de la mezcla de hidrocarburos que representa el petróleo. Recolectaron muestras de 30 trabajadores de bombas de petróleo y 30 muestras de individuos sanos como control, el resultado que obtuvieron fue que la frecuencia de micronúcleos aumentó drásticamente en comparación al grupo control, por lo que se concluyó que los trabajadores de petróleo se encuentran en riesgo laboral importante y, por tanto, se deben tomar las medidas de bioseguridad para prevenir el desarrollo de enfermedades de origen genético.

Aércio Maciel *et al.*, en el año 2019 en Brasil, estudiaron el daño que genera el benceno en trabajadores de estaciones de servicio, analizaron las muestras de la mucosa oral de 126 trabajadores de estaciones de servicio distribuidos en seis grupos, incluyendo los controles.

Como resultado obtuvieron que la frecuencia de micronúcleos es elevada en los trabajadores de servicio en comparación con los trabajadores que no se encontraron expuestos al benceno, por lo cual la frecuencia de micronúcleos fue significativamente mayor, pero la frecuencia fue aún más elevada en los trabajadores que consumían alcohol con regularidad.

Butt *et al.*, en el año 2017 realizaron una investigación en Pakistán para analizar, mediante la prueba de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa oral, la frecuencia de toxicidad citogenética en trabajadores de estaciones de servicio. La población estuvo compuesta por 100 trabajadores de estaciones de servicio y 100 individuos que no estuvieron expuestos a gasolineras, como resultado obtuvo un aumento de frecuencias de diferentes tipos de anomalías celulares. A través de este trabajo también se vio que incrementan la genotoxicidad, variables como tiempo de trabajo, edad y hábitos de fumar.

Mazzeo Christofolletti, en el año 2009, realizó un estudio en Brasil para la evaluación de los efectos de sustancias citotóxicas, genotóxicas y mutagénicas, como son los BTEX, usando la prueba de *Allium cepa*, evaluó el efecto en cinco concentraciones de BTEX biorremediadas y no biorremediadas por microorganismos seleccionados de aguas residuales sin tratar de una refinería de petróleo, encontró una reducción significativa de las concentraciones de BTEX en las muestras biorremediadas y pudo determinar que BTEX puede provocar daños en el material genético de las células de *Allium cepa*.

Da Silva Souza, en el año 2010, realizó una investigación en Brasil que tuvo como objetivo investigar los efectos de la adición de dos residuos agroindustriales, cáscara de arroz y vinaza, en la biorremediación, genotoxicidad y mutagenicidad en suelo de cultivo de una refinería de petróleo, usando la prueba de anomalías mitóticas y cromosómicas del test *Allium*, los resultados que obtuvo mostraron una frecuencia estadísticamente significativa por la frecuencia de puentes cromosómicos en todos los experimentos y la inducción de adherencias y roturas cromosómicas.

Oliveira-Martins y Grisolia, en el año 2009, también en Brasil, estudiaron la toxicidad y genotoxicidad mediante la prueba de *Allium cepa*, por la cual evaluaron las aberraciones cromosómicas, mala segregación cromosómica y el índice mitótico en las células de la raíz de esta planta, el resultado que encontraron fue que ninguna de las muestras de aguas

residuales fue genotóxica para la raíz de *Allium cepa* pero su proliferación celular fue inhibida significativamente principalmente con las concentraciones elevadas.

Mazzeo *et al.*, en el año 2011, en Brasil, evaluaron el potencial genotóxico y mutagénico de los derivados de petróleo (BTEX), en el desarrollo de biodegradación, mediante la prueba de *Allium cepa*. Se analizaron aberraciones cromosómicas y la presencia de micronúcleos en células meristemáticas. Como resultado obtuvieron una frecuencia significativa de aberraciones cromosómicas y nucleares, así como un valor significativo de puentes y roturas cromosómicas.

Hoshina & Marin-Morales, en el año 2009, evaluaron la calidad del agua del río Atibaia (Brasil) que se encuentra en un área receptora del efecto de una refinería de petróleo, mediante las pruebas de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*. Para este trabajo germinaron semillas de *Allium cepa* en aguas que recolectaron en cinco lugares diferentes relacionados con la refinería, usando como control negativo agua ultra pura, los resultados demostraron el efecto tóxico del agua contaminada por la refinería, debido a que el efluente que se encontraba más próximo a la refinería causó mayor número de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas.

Morais Leme *et al.*, en el año 2008, también en Brasil, analizaron los mecanismos de acción de los agentes químicos presentes en aguas contaminadas con petróleo en el río Guacá, ya que sus aguas se encontraban contaminadas por una fuga de un oleoducto. Utilizaron la prueba de *Allium cepa* para ensayos de aberraciones cromosómicas. Los resultados que encontraron fueron significativos por la presencia de aberraciones clastogénicas y aneugénicas para las raíces que fueron expuestas a las aguas contaminadas, dando lugar a la muerte celular.

Tamada *et al.*, en el año 2012, realizaron una investigación en Brasil, sobre los derivados de biodiesel, considerándolos un riesgo ambiental cuando son desechados en suelos, debido a que hay pruebas de toxicidad que indican que estos residuos afectan de manera brusca al medio ambiente. Para el análisis de fitotoxicidad utilizaron la prueba de *Lactuca sativa* para analizar la germinación de semillas en muestras de suelo contaminado, el cual realizaron en cuatro periodos diferentes de biodegradación en el suelo, los contaminantes en estudio fueron el aceite de soja y biodiesel, la evaluación de ambos contaminantes les dio como resultado



una mayor toxicidad a medida que ocurría la biodegradación, pero identificaron al biodiesel como más tóxico entre ambos contaminantes.

Banks & Schultz, en el año 2005, en Estados Unidos, compararon la germinación de diferentes plantas cuando son expuestas a contaminantes, entre ellas *Lactuca sativa* y *Allium cepa*. Si bien todas las plantas fueron afectadas por el efecto tóxico, la *Lactuca sativa* mostró mayor sensibilidad, probando que esta especie es idónea para pruebas de toxicidad de germinación en suelos contaminados por petróleo y sus derivados; sin embargo, Bamgbose & Anderson, en el año 2015, realizaron otro estudio en Estados Unidos con el objetivo de conocer la [fitotoxicidad](#) de tres tipos de biodiésel de origen vegetal, para la evaluación de la fitotoxicidad utilizaron semillas de cuatro plantas: *Lactuca sativa*, *Medicago sativa*, *Raphanus sativus* y *Triticum aestivum*. Se analizó la germinación de semillas en muestras de suelo contaminado y como resultado se evidenció la toxicidad producida por diésel y biodiesel cuando se encontraba en altas concentraciones, lo cual produjo una germinación lenta. Llamó la atención la tolerancia a la contaminación de *Lactuca sativa*, que alcanzó de un 80 a 100%.

Cruz *et al.*, en el año 2014, efectuaron una investigación en China para determinar la biodegradación de suelos contaminados con biodiesel, diésel y petróleo, con microorganismos autóctonos y con la prueba de *Lactuca sativa*, evaluaron la fitotoxicidad en suelo recientemente contaminado y después de 240 días para establecer si la fitotoxicidad persistía. Observaron que, en el suelo contaminado con biodiesel, a medida que pasa el tiempo la fitotoxicidad se reduce; en cambio, en el suelo contaminado con petróleo y diésel, la contaminación persiste.

Balseiro-Romero & Monterroso, en el año 2014 en España determinaron el efecto de suelos contaminados con combustible sobre la germinación, supervivencia y crecimiento temprano de seis plantas, entre las cuales estaba *Lactuca sativa*. Se halló que la toxicidad del diésel fue muy elevada en comparación con la toxicidad de la gasolina y que afectó tanto a la germinación como a la supervivencia de las plantas. Se determinó también, que el crecimiento de las raíces fue más afectado que el crecimiento de los brotes, la biomasa vegetal, el alargamiento y la ramificación, todo lo cual también resultó afectado.

El año 2003 Banks *et al.*, evaluaron contaminantes tóxicos a diferentes concentraciones durante la fitorremediación en la base naval de Estados Unidos cuyo suelo estaba contaminado con petróleo (diésel y aceite pesado), se estudiaron terrenos contaminados con y sin vegetación. El estudio se llevó a cabo por dos años y se escogieron especies de plantas que lograron germinar en ese terreno, al que, además, se había integrado lombrices (*Eisenia foetida*). Las lombrices de los terrenos con vegetación fueron afectadas muy poco por la contaminación, mientras que las lombrices que se encontraban en terrenos sin vegetación fueron afectadas en gran manera. El efecto tóxico se determinó realizando recuento de anomalías nucleares y evaluando la germinación de las plantas.

Shin *et al.*, en el año 2005, realizaron una prueba de ecotoxicidad en Corea con *Eisenia fetida* para hacer el seguimiento de la remoción del diésel y la variación de toxicidad durante el proceso de ozonización. La prueba de toxicidad en lombrices demostró que las concentraciones de diésel en el suelo superiores a 10.000 mg/kg causan pérdida de peso y aumento en la frecuencia de muerte.

Liu *et al.*, en el año 2010, en China, evaluaron el estrés oxidativo y daño del ADN en la lombriz de tierra *Eisenia fétida*, ambos inducidos por tolueno, etilbenceno y xileno. Los tres contaminantes llegaron a provocar estrés en sus enzimas, generando sensibilidad a los contaminantes, además también se demostró daño en el ADN por los tres contaminantes, pero sobre todo por tolueno.

Li *et al.*, en el año 2020, en China, reportaron la contaminación con petróleo del suelo, determinada a través de *Eisenia fétida*. Los resultados obtenidos fueron: disminución del peso de las lombrices, genotoxicidad, estrés oxidativo y disminución en la tasa de reproducción.

El año 2016 Anyanwu & Semple, en Nigeria estudiaron el efecto del fenantreno y sus análogos heterocíclicos nitrogenados envejecidos, en suelos, utilizando la lombriz de tierra *Eisenia fétida*. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, homocíclicos (HAP) y sus análogos (N-HAP) se hallaron en el medio ambiente, después de su descarga producida por actividades vinculadas con el procesamiento del petróleo. Para evaluar la ecotoxicidad se expuso a las lombrices, a este suelo contaminado por 21 días, después se evaluó el estado de

salud, la mortalidad y la biomasa. Concluyeron que los N-HAP son muy tóxicos para *Eisenia foetida*, en especial la benzo quinolina.

Bamgbose y Anderson, en el año 2020, en Estados Unidos, evaluaron el impacto tóxico de biodiesel y diesel usando tres pruebas ecotoxicológicas, en una de las cuales se utilizó lombriz de tierra (*Eisenia foetida*). La prueba con las lombrices consistió en exponerlas al suelo contaminado durante 14 días, el resultado fue que el biodiesel es menos tóxico que el diésel porque produjo menos mortandad en las lombrices, el mayor efecto tóxico del biodiesel también se determinó a través de la pérdida de peso, enrollamiento, fragmentación anterior y posterior de las lombrices, liberación excesiva del líquido celómico y disminución significativa de la reproducción.

Ramadass *et al.*, en el año 2017, en Australia evaluaron la ecotoxicidad del suelo contaminado con diésel utilizando lombrices (*E. fétida*). Tomaron en cuenta criterios de supervivencia de las lombrices y actividad de la deshidrogenasa y la ureasa en el suelo. Como resultado, pudieron observar anomalías morfológicas como hinchazón y rizado del clitelo de la lombriz, especialmente frente a concentraciones elevadas de diésel, así mismo encontraron un incremento significativo de deshidrogenasa (38- 58%) y de ureasa, dando a entender que las lombrices mejoraron la actividad enzimática en el suelo aún a expensas de su propia integridad física y genética.

Los trabajos de investigación mencionados avalan el uso de los bioindicadores elegidos para el estudio del efecto genotóxico de los hidrocarburos en seres humanos y en otros organismos (animales y vegetales), fue, por tanto, propósito del presente trabajo, determinar si las condiciones medioambientales establecen una diferencia en el resultado de la exposición a hidrocarburos, de seres humanos, lombrices de tierra, cebolla y lechuga.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La incidencia de cáncer a nivel mundial es elevada, según GLOBOCAN alcanza a 19.292.784 millones y 9.958.133 millones de personas mueren anualmente por esta enfermedad y más de 25 millones de personas viven con cáncer durante varios años (Global cancer observatory, 2022). En Bolivia, el cáncer se constituye en un problema creciente, se registran valores de 18.600 pacientes nuevos con cáncer cada año, por lo cual, esta

enfermedad se ha vuelto uno de los problemas prioritarios de la salud pública del país (Pérez, 2017). Según datos del Ministerio de Salud, al año se diagnostica 7.276 pacientes de sexo femenino y 3.918 pacientes varones y por año mueren 27 por ciento, la principal razón para este alto número de muertes es que no se realiza una detección oportuna, generalmente por falta de recursos económicos. (La Tasa Del Padecimiento de Cáncer Aumenta En Bolivia, 2018).

Las estaciones de servicio, donde se expende gasolina, diésel y gas, contribuyen considerablemente a la contaminación del medio ambiente y predisponen al desarrollo de enfermedades como la citada anteriormente. Los propios trabajadores son los que están más expuestos a los contaminantes, pero también otras personas que viven o trabajan en el área próxima a las estaciones de servicio. Además, debido a que estos hidrocarburos contienen genotóxicos volátiles que penetran fácilmente en los tejidos de las personas que los manipulan y se dispersan por la zona circundante, pueden dañar a todo ser vivo (animales y plantas) que habiten en estas zonas. La gamma de enfermedades que puede generar es muy grande, pero una de las más letales resulta el cáncer.

Se debe tomar en cuenta que una de las causas para desarrollar cáncer es estar expuesto constantemente a sustancias genotóxicas, ejemplo de las cuales son los hidrocarburos que pueden generar células con anormalidades nucleares y de otro tipo, estas células son bioindicadores de riesgo de mutagénesis, a corto plazo, y carcinogénesis a largo plazo.

Por lo expuesto, el presente trabajo de investigación tiene dos propósitos: 1) evidenciar el daño genético que está produciendo el expendio de gasolina, diésel y gas a las personas, que, por razones laborales, están expuestas constantemente y 2) determinar si la contaminación de la tierra circundante a las estaciones de servicios, representa riesgo genotóxico.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto genotóxico de la gasolina, diésel y gas en expendedores de estaciones de servicio y en el medio ambiente circundante.

## 4.2 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia y tipo de alteraciones nucleares en células epiteliales de la mucosa oral de expendedores de gasolina, diésel y gas.
- Determinar, a través de una encuesta, qué factores personales (edad, sexo, hábitos nocivos, condiciones de trabajo) agravan el efecto genotóxico de la gasolina, diésel y gas en expendedores.
- Establecer el potencial genotóxico del suelo contaminado por los hidrocarburos expendidos en estaciones de servicio a través de la evaluación de alteraciones en la mitosis en *Allium cepa* y el efecto citostático en *Lactuca sativa*.
- Identificar las alteraciones nucleares producidas en lombrices (*Eisenia foetida*) como consecuencia de la exposición a suelo contaminado con gasolina, diésel y gas.

## 5. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 5.1 Contaminación ambiental

El aire atmosférico en las ciudades está compuesto por una mezcla de contaminantes ambientales, día a día se va incrementando con mayor frecuencia la contaminación ambiental debido a agentes químicos, físicos y biológicos, que se generan por distintos medios de emisión, tales como son las fábricas industriales, el parque automotor, los rellenos sanitarios, la quema de basura, la radiación, los metales pesados, los fertilizantes, etc. Estos agentes ocasionaran diversos problemas de salud en el ser humano, que se manifiestan con signos y síntomas variados, como por ejemplo problemas respiratorios, cefalea, y malestar general, y aumentan la vulnerabilidad de las vías respiratorias para ser colonizadas por virus, hongos o bacterias, dando como resultado, complicaciones en diversos sistemas y órganos y generando enfermedades que pueden llegar a causar incluso la muerte de la persona. Además, así como afecta al ser humano, afecta también al ecosistema (Baquerizo, Escobar & Guaman Chisaguano, 2018).

Uno de los tipos de contaminación constante, es la contaminación del suelo, debido a la descarga de desechos industriales y municipales, al uso inapropiado de ciertos fertilizantes químicos y pesticidas, a aguas residuales, etc., constituyéndose por ello, en un peligro para la seguridad alimentaria, para la salud humana y para el medio ambiente.

Entre los contaminantes del suelo se encuentran también los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que han sido relacionados con el aumento de la incidencia de diversos tipos de cáncer, pero especialmente con el cáncer de mama (Song *et al.*, 2017). La contaminación por hidrocarburos es un problema de tipo mundial porque afecta una extensa región geográfica en la que se incluyen suelos, lagos y ríos, y, habiendo sufrido transformaciones biológicas y físicas, afecta también a los mares y a los océanos (Gonzales Bellido, 2018).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) forman parte de la gasolina, la mayoría de estos componentes sufren de fotooxidación, proceso a través del cual son liberados al medio ambiente. Los PAHs pueden ser cancerígenos o no dependiendo de la reacción que tengan con otras sustancias las cuales pueden llegar a formar sustancias altamente cancerígenas. Los PAHs se encuentran en el aire, en la tierra y en el agua, pero especialmente donde se libera altas concentraciones de PAHs es durante la combustión de fósiles, combustión de residuos de los vertidos de petróleo, ya sea crudo o refinado. En menores cantidades también se encuentran en el humo de cigarrillo, los alimentos cocinados a la parrilla, los alimentos ahumados y los fritos (Mastandrea *et al.*, 2005).

## **5.2 Contaminantes ambientales procedentes de estaciones de servicio**

### **5.2.1 Gasolina**

#### **5.2.1.1 Composición química**

La gasolina está compuesta por especies de hidrocarburos que se clasifican en parafinas, isoparafinas, compuestos aromáticos, nafténicos y olefinas (Rodríguez Martínez, 2019). Entre los compuestos nafténicos se encuentran los siguientes: nafta ligera, nafta pesada, nafta debutanizada, nafta tratada y nafta reforzada. Las características de la gasolina pueden variar ligeramente dependiendo de los tipos de hidrocarburos que contiene, la composición depende de su origen, uso y los procesos de refinado (Encalada Cajisaca & Ñauta Uzhca, 2010).

Los hidrocarburos que constituyen la mezcla compleja conocida como gasolina, son inflamables y volátiles, derivados del petróleo crudo, estos hidrocarburos son de dos tipos, los alifáticos que se caracterizan por tener un número de carbonos entre 4 y 12 y entre los aromáticos están el benceno, tolueno, etilbenceno, y xilenos isoméricos (BTEX), estos

compuestos se caracterizan por su elevada toxicidad. (Silva *et al.*, 2009; Poveda Paredes & Chavez Diaz, 2016). Los compuestos monoaromáticos se encuentran en una baja cantidad, entre 0,12 a 3,5 %, el naftaleno entre 0,09 a 0,49 % y el que se encuentra en porcentajes altos es el tolueno, que alcanza hasta 21,8%, pero, en general, los BTEX se encuentran en altas concentraciones en la gasolina (Lesser & Saval, 2001; Boluda *et al.*, 2019).

En años anteriores solía utilizarse el plomo como antidetonante, pero la Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero (ARCH) prohibió su uso debido a que es un elemento agresivo para la salud; sin embargo, no se tiene certeza de que la gasolina actualmente comercializada no contenga este metal (Poveda Paredes & Chavez Diaz, 2016).

### **5.2.1.2 Metabolismo de los componentes de la gasolina**

El metabolismo de estos componentes requiere de un proceso de activación metabólica, que principalmente se produce a través de monooxigenasas, entre las cuales es clave la función del citocromo P450. Los genes que codifican a las enzimas que participan en estas rutas, son muy polimórficos, debido a que se evidenció que su actividad y la inducibilidad de las enzimas es diferente de una persona a otra. Estas enzimas tratan de volver hidrosolubles a los diferentes xenobióticos para eliminarlos del organismo, pero, en este proceso, los activan, transformándolos en procarcinógenos. La CYP1A1 es uno de los principales citocromos que participa de la primera fase de la ruta metabólica de eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos del benzopireno. Se considera que, en la población de raza blanca, un 10% tiene un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón entre el grupo de fumadores debido a que la enzima, por ser altamente inducible, puede generar más fácilmente procarcinógenos. Las personas que están expuestas a componentes de la gasolina o sus derivados y fuman, pero tienen un genotipo de CYP1A1 que es altamente inducible, generan un riesgo mayor a desarrollar cáncer de pulmón.

La enzima glutatión S-transferasa (GST) participa activamente en la detoxificación ocasionada por los hidrocarburos aromáticos policíclicos, pero se ha encontrado que en un 50% de personas de raza blanca, existe una delección en el gen que codifica esta proteína, predisponiendo al desarrollo de cáncer de pulmón y vejiga, principalmente en personas expuestas a hidrocarburos y más aún si también lo están al humo del tabaco.

No todas las variaciones en la activación de los carcinógenos o en el proceso de detoxificación tienen como base central la genética, también existen otros factores de riesgo como la edad, la alimentación, el sexo, estos factores y otros determinan que los carcinógenos actúen por la acumulación de distintos agentes tóxicos (Ordóñez León, 2013), que son catalizados por enzimas de familia del citocromo p450 (CYP) y de otras enzimas que actúan en la segunda fase de la ruta de degradación de xenobióticos, entre ellas la glutatión S-transferasas (GST). Estas enzimas están implicadas en la respuesta adaptativa al ataque de sustancias tóxicas ya que son encargadas de desintoxicar de mutágenos como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosamidas, los fenoles, el cloroformo, el nitrocloroetileno, el benceno, el tolueno y otros disolventes orgánicos. Los cuales son marcadores de susceptibilidad (Torres *et al.*, 2008).

Cuando los genes de las enzimas mencionadas sufren mutaciones en el momento de la división o antes, si no son reparados, las células hijas son portadoras de esta mutación, según la teoría de la clonación, esto favorece la formación de células cancerosas. Por lo general, los genes supresores de tumores se encargan de reparar el daño antes de que se forme un clon mutante, evitando, de esta manera, la posibilidad de cáncer, al inhibir la proliferación celular excesiva; sin embargo, cuando el gen supresor de tumores sufre una lesión o mutación, aumenta la probabilidad de la formación de tumores, debido a que un gen supresor tumoral alterado tiene características similares de un oncogén. Las enzimas involucradas en el proceso de desintoxicación de compuestos químicos como lo son glutatión -S-transferasa y algunas isoenzimas de citocromo p450, también pueden sufrir alteraciones estructurales y funcionales, dando lugar a inestabilidad genómica que puede coadyuvar en el desarrollo de neoplasias. Se debe tomar en cuenta también que la acumulación de mutaciones en las células germinales puede generar enfermedades hereditarias; por otro lado, si existe dicha acumulación en células somáticas, se favorece el desarrollo de cáncer (Zuluaga Quintero *et al.*, 2009).

Los genotóxicos tienen distintos mecanismos de acción que pueden ser clasificados como intrínsecos, por ejemplo, el estrés oxidativo, o extrínsecos como la radiación solar, este proceso además es influido estrechamente por el estilo de vida de la persona y el entorno que lo rodea. Entre los componentes con mayor actividad genotóxica de la gasolina se encuentran



los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales producen diversos tipos de enfermedad debido a que tienen una marcada actividad citotóxica, mutagénica y carcinogénica, este tipo de sustancias ocasiona el desarrollo de estrés oxidativo el cual afecta directamente al ADN y a sus mecanismos de reparación; en el DNA produce rompimiento de una o de las dos hebras, cuando el daño afecta a los cinetocoros, un cromosoma entero puede quedar excluido del conjunto que se procesa durante la mitosis, pero también existe la posibilidad de que se produzca rotura de un fragmento de cromosoma, en ambos casos, una de las células tendrá un micronúcleo cuyo tamaño depende de su origen . Por otro lado, también se pueden producir otro tipo de anormalidades nucleares, como consecuencia de puentes de anafase dando lugar a la formación de micronúcleos y otras anormalidades nucleares que son consecuencia de procesos inflamatorios, así como daño de la integridad de las membranas celulares y alteración de la estructura y función enzimática. (Aguilar De Prada, 2019).

### **5.2.1.3 Potencial tóxico de la gasolina**

Todos los componentes de la gasolina representan un riesgo para la salud de los trabajadores, pero se ha establecido mayor evidencia de actividad tóxica en los hidrocarburos alifáticos, el plomo, el benceno y los derivados. La alta exposición a estos compuestos, la carencia de protección y las largas jornadas de trabajo predisponen el desarrollo de muchas enfermedades, incluso cuando la exposición es baja pero constante, se ha establecido que representa un riesgo para la salud.

Los efectos de la exposición constante a la gasolina se relacionan principalmente con hipoxia, asma, lesiones pulmonares que, a la larga, dan origen a problemas respiratorios, bronquitis, tos crónica defectos en la síntesis de hemoglobina, anemia, nefropatías, abortos, daño cerebral y pueden contribuir a la formación de tumores y leucemias (Poveda Paredes & Chavez Diaz, 2016). Por otro lado, también se ha demostrado que ocasionan efectos tóxicos en la piel, especialmente dermatitis aguda y crónica que se manifiesta con irritación, resequedad, ardor, edema, grietas que pueden infectarse rápidamente y también se produce despigmentación. Los componentes de la gasolina irritan los ojos, generando un lagrimeo constante, fotofobia, edema en los párpados e hiperemia conjuntival (Mastandrea *et al.*, 2005).

#### **5.2.1.4 Componentes altamente tóxicos de la gasolina**

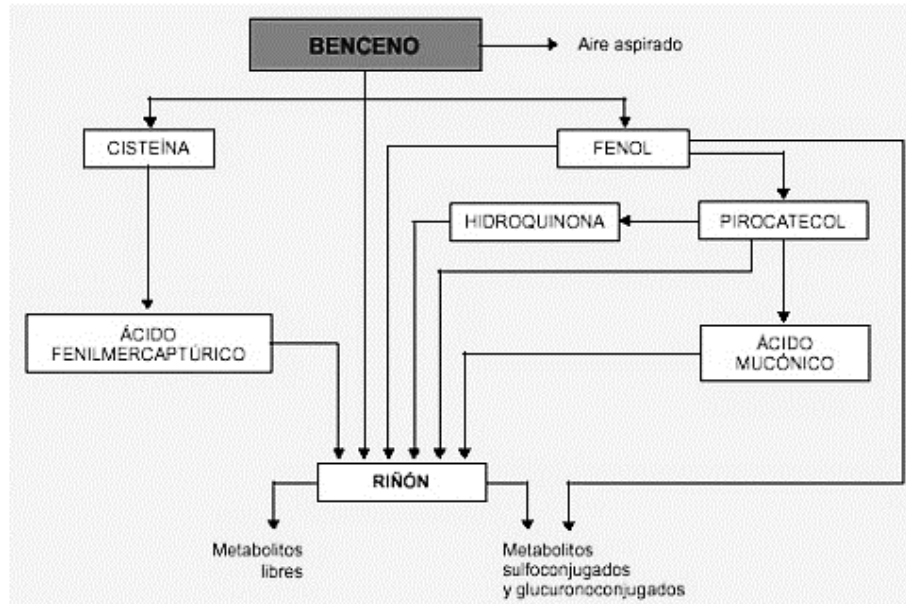
Entre los componentes altamente tóxicos de la gasolina se encuentran el benceno, tolueno, xileno (BTX) que son compuestos volátiles que corresponden al grupo de los hidrocarburos aromáticos, estos compuestos suelen encontrarse en estado de vapor a temperatura ambiente y son insolubles en agua, pero son solubles en compuestos orgánicos, son considerados como contaminantes del medio ambiente y altamente tóxicos debido al daño directo que puede causar sobre el DNA y sobre otras biomoléculas y a la formación de metabolitos tóxicos como efecto del proceso metabólico dentro de los seres vivos. (Garcia Zarate, 2013).

##### **5.2.1.4.1 Benceno**

El benceno es un componente altamente tóxico que es liberado al medio ambiente por medio de los vapores de los escapes de los autos y la evaporización del combustible, pero, la liberación del benceno va acompañada también de la liberación de sus derivados (Boluada *et al.*, 2019). El benceno es utilizado como producto intermedio de otros productos químicos como son el etilbenceno, cumeno, ciclohexano, nitrobenceno, etcétera. También se lo puede encontrar en detergentes, plaguicidas e incendios forestales. (Garcia Zarate, 2013).

Se ha demostrado que el benceno genera mucho daño genético, clasificándose, por tanto, como un mutágeno. El benceno ocasiona el desgaste de la médula ósea y daño hematológico, originando, por tanto, anemia aplásica, leucemia y mieloma múltiple (Ortiz Caicedo, 2021). Además, puede dar origen a ciertos sitios neoplásicos debido a la presencia de radicales de oxígeno que son los responsables de la toxicidad, las moléculas reguladoras deben actuar con cuidado antes de generar cambios ante la exposición a este agente químico (Yardley-Jones *et al.*, 1991).

El metabolismo del benceno es complejo, se producen conjugados de glucurónido y sulfato de fenol, quinol, catecol, ácido L-fenilmercaptúrico y muconaldehído y ácido trans, trans-mucónico por escisión del anillo. El quinol se llega a oxidar a p-benzoquinona, el cual se une a componentes celulares vitales o bien sufre ciclos redox dando lugar a radicales libres de oxígeno (Yardley-Jones *et al.*, 1991).



**GRAFICO 1.** Metabolismo del benceno.

**Fuente:** Ministerio de trabajo y asuntos sociales España

El muconaldehído y la p-benzoquinona que son tóxicos, se conjugan con el glutatión, ocasionando el decaimiento de esta molécula a nivel intracelular.

#### 5.2.1.4.2 Tolueno

El tolueno, otro componente de la gasolina, es menos tóxico que el benceno debido a que su composición es elevada de octanos (Boluada *et al.*, 2019). El tolueno se incorpora a los combustibles como antidetonante, tiene también la utilidad de disolver pinturas, revestimientos, hule, resinas, etc., (Garcia Zarate, 2013). El tolueno, cuando ingresa al organismo, se acumula en el tejido adiposo, produciendo temblores, ataxia, daño a nivel hepático, alteración del comportamiento hepático, etc. (Ortiz Caicedo, 2021).

#### 5.2.1.4.3 Xileno

El xileno es un líquido incoloro e inflamable con un olor muy parecido al tolueno, se encuentra en los gases de coque, tiene gran importancia en el funcionamiento de motores, por lo cual se considera que sería ventajoso elevar el contenido de xileno en la gasolina, en la cual, actualmente, se encuentra en baja proporción. Cuando el xileno, que en condiciones normales se encuentra al estado gaseoso, es inhalado, puede producir dolor de cabeza, náuseas y malestar general (Garcia Zarate, 2013).

La organización mundial de la salud (OMS) informó que hay elevados niveles de mortalidad por contaminantes ambientales, es así que más de 7 millones de personas perdieron la vida por la exposición a estos componentes tóxicos que son, a la vez, contaminantes ambientales, altamente riesgosos para la salud. Cabe señalar que estos compuestos son inhalados y posteriormente expulsados por la nariz, son metabolizados por el hígado y desechados por vía renal, lo cual depende del metabolismo de cada persona y da lugar a otros metabolitos que, en algunos casos, resultan más tóxicos. Los daños que ocasionan a la salud se producen cuando en el medio ambiente se encuentran en una concentración elevada, lo cual, además, se relaciona con la reducción parcial de oxígeno (Ortiz Caicedo, 2021).

### **5.2.2 Diésel**

El Diésel es conocido como “gasóleo” o “gasoil”, es un hidrocarburo líquido que se obtiene principalmente de la destilación del petróleo. Es empleado como combustible en motores de combustión, tiene una relación C/H muy alta y quema muy lentamente (Cortés Del Pino, 2014).

El diésel es un hidrocarburo que integra compuestos parafínicos, naftalénicos y aromáticos, que se encuentran en los carbonos C10 y C20 (Zárate, 2014), además tienen una alta concentración de cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Celis Huaiquilaf, 2009). Se estima que el diésel es un hidrocarburo de fracción media, lo cual se debe a la refinación del petróleo que se somete a una temperatura 280 a 380°C, además que están incluidos compuestos con cadena de 10C a 18C. Tiene como contaminante al azufre, por lo cual, en el proceso de la combustión, da lugar al óxido de azufre que, al interactuar con la humedad del aire, se va a transformar en ácido sulfúrico. Así mismo contiene nitrógeno que se libera como óxido nitroso, tanto este óxido como el óxido de azufre son componentes principales de la lluvia ácida (Zárate, 2014). El índice cetano cuantifica la cantidad de azufre en el momento de la, a menor cantidad de azufre el diésel es más puro y es menos contaminante (Zárate, 2014).

La combustión del diésel a elevadas temperaturas da lugar a un material particulado carbonoso que produce óxido nitroso (NOx) por la reacción del oxígeno molecular con el nitrógeno molecular en el aire (Drumm *et al.*, 2014).

### **5.2.3 Gas Natural Vehicular (GNV)**

Su composición química es metano al 80 a 90%, asimismo contiene otros gases como etano (4 a 10%), propano (2 a 3%), butano (0.5 a 2%), nitrógeno (0.5 a 6.5 %), dióxido de carbono (< 1.5 % ), además que contiene impurezas como vapor de agua y tiene trazas de sustancias más pesadas como mercaptanos, gases nobles, etc. (Álvarez Borrero & Jaramillo Chamba, 2016).

Los derivados del azufre son depurados hasta concentraciones muy bajas para evitar la corrosión, formación de olores y emisiones de dióxido de azufre tras su combustión (Lopez Chalarca, 2013). En Bolivia el gas natural se produce libre de compuestos sulfurados, es por ello que se conoce como gas dulce (Núñez *et al.*, 2012).

### **5.2.4 Gas licuado de petróleo (GLP)**

El gas licuado de petróleo (GLP) es una mezcla de hidrocarburos en la que los componentes principales son el propano, butano, isobutano, propileno y butenos. Más comúnmente este término se aplica a mezclas de propano y butano, asimismo contienen componentes livianos como ser etanos y pesados como pentanos (Martinez Fernández, 2006).

EL GLP es una mezcla de aproximadamente 30.1% de propano-propilenos (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>), 67.4% de butano-butilenos, 2.1% de pentanos y 0.4% de etano. Estos gases se manejan en forma líquida y, por lo tanto, es un conjunto de gases licuados de petróleo (Di Pelino *et al.*, 2002). El uso de GLP tiene ciertas ventajas, debido a que es un combustible de fácil acceso, transporte y almacenamiento en comparación a otros gases como el gas natural vehicular y otros combustibles. Se extrae a partir de corrientes de petróleo crudo y gas natural, la producción puede ser de tres orígenes: 1) de gas natural a partir de un depósito de gas, 2) de gas e hidrocarburos líquidos livianos desde un yacimiento de gas condensado o 3) de petróleo crudo y gas de un yacimiento combinado de petróleo y gas (Silva Leal, 2014).

Los derivados de petróleo mencionados pueden ocasionar distintos tipos de enfermedades y daño a la salud de personas que están constantemente expuestas, por ejemplo, de los trabajadores de estaciones de servicio. El daño mencionado se manifiesta después que se ha producido cambios en el equilibrio fisiológico del cuerpo, a través de un aumento de la sensibilidad a otros agentes químicos, que al ser inhalados en forma de vapores dan lugar al

inicio a varias enfermedades. El daño se inicia en el sistema respiratorio, continua en el sistema digestivo, sistema circulatorio y sistema nervioso (Cacoango Vacacela & Guamán Mocha, 2016).

### **5.3 Genotoxicidad en células humanas y en otros organismos**

La genotoxicidad producida por contaminantes ambientales puede ser determinada empleando una gran cantidad de bioindicadores. En el ser humano, el estudio microscópico de los núcleos celulares es una alternativa fácil, rápida, accesible y económica que permite, incluso, predecir el posible desarrollo de enfermedades neoplásicas. Al mismo tiempo, suelen ser utilizados muchos otros organismos, tanto animales como vegetales con el propósito de determinar alteraciones morfológicas o fisiológicas, al comparar con grupos control.

Existe diverso tipo de anormalidades nucleares, cuyo origen puede ser una respuesta a agentes genotóxicos, clatogénicos o aneuploidógenos o a un proceso inflamatorio. En el primer caso, los mecanismos de reparación de las células son incapaces de corregir la rotura del DNA, mientras que el proceso inflamatorio puede causar varias alteraciones morfológicas celulares tendientes a eliminar rápidamente a la célula que se encuentra dañada.

Las anormalidades nucleares tienen diferente origen, algunas son producto de inestabilidad genómica, la mutación en un gen puede dar origen a nuevas mutaciones generando daño al ADN. Existe dos tipos de inestabilidad genómica: 1) inestabilidad microsatélital, que son cambios de nucleótidos y 2) la inestabilidad cromosomal, que es debida a las anormalidades nucleares. En cualquiera de los casos mencionados se puede generar, posteriormente, enfermedades como ser el cáncer (Valdespino-Gómez & Valdespino-Castillo, 2010).

El estudio microscópico de las anormalidades nucleares es utilizado con frecuencia, es, además, muy aceptado por ser inocuo y mínimamente invasivo para el monitoreo del daño genético en poblaciones que se encuentran en riesgo. Esta técnica sirve cuantificar las anomalías nucleares (Flores-García *et al.*, 2018), las cuales suelen ser utilizadas como indicadores del daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular, ya que, como consecuencia de la exposición a genotóxicos se produce alteraciones en la morfología de la células, especialmente en el núcleo. Las anormalidades nucleares son: micronúcleos, cariorrexis, cariólisis, células binucleadas, núcleo picnótico y cromatina condensada.

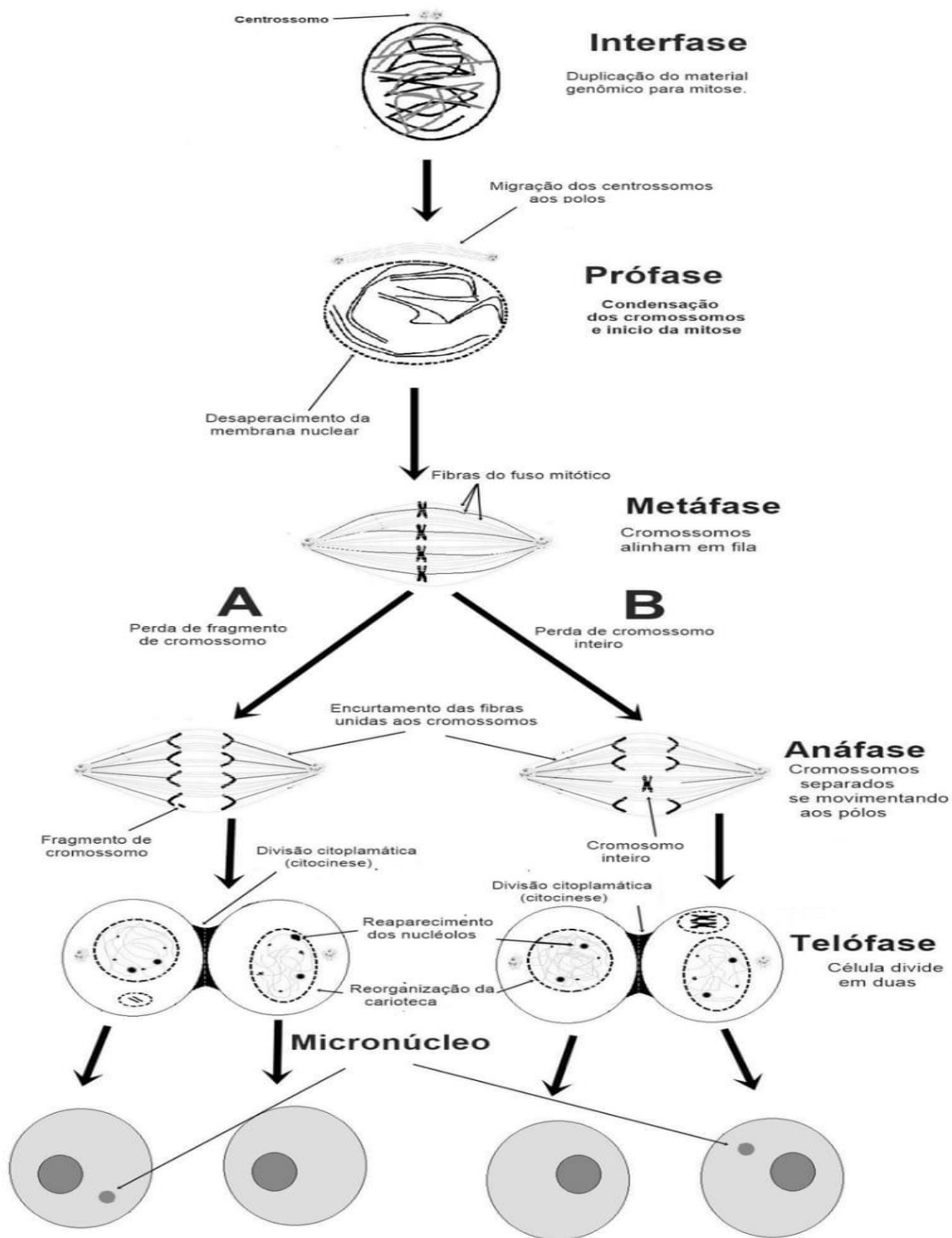
Diversos eventos de daño genético pueden ser deducidos por la presencia de anomalías nucleares:

- La presencia de mayor cantidad de micronúcleos y núcleos lobulados es un indicador de daño en el ADN.
- La presencia de varias células binucleadas se debe a defectos en la citocinesis.
- Indica muerte celular, la presencia de células con cromatina condensada, cariorrexis, núcleo picnótico y cariólisis.
- Caracteriza a la necrosis la presencia de células con núcleo picnótico, cromatina condensada, cariorrexis y cariólisis.
- y las células que indican daño celular contienen núcleo picnótico y cromatina condensada (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013).

### **5.3.1 Micronúcleos**

#### **5.3.1.1 Formación de micronúcleos**

La formación de los micronúcleos se realiza a partir de la división celular el material genético que está en el núcleo, el cual se replica y divide equitativamente durante la mitosis produciendo, como resultado, a dos células hijas idénticas. Diversos factores intervienen en este proceso en forma negativa, por ejemplo, los errores en la replicación, roturas cromosómicas y efectos genotóxicos, el resultado es la división no equitativa del material genético y la pérdida de un fragmento cromosómico o un cromosoma entero, este material nuclear que se separa, queda rezagado en el núcleo de la célula hija, y da lugar a la formación a un nuevo núcleo de menor tamaño que el principal el cual es llamado micronúcleo, cuyo tamaño varía de 1/16 a 1/33 del tamaño del núcleo dependiendo de su origen (González Martínez & Solano Mora, 2013) los micronúcleos son anomalías nucleares ocasionadas por sustancias genotóxicas, son una masa de cromatina que se encuentra de forma redonda u ovalada, son fragmentos y cromosomas enteros rezagados que se origina en la transición de la metafase- anafase de la mitosis (P.A. *et al.*, 2017).



**GRAFICO 2.** Esquema de formação de micronúcleos.

Fuente: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Esquema-de-formacao-de-micronucleos->



Los micronúcleos se producen como consecuencia de la fragmentación de un brazo cromosómico o pueden llegar a formarse por mutaciones en los genes que codifican las proteínas del cinetocoro, o huso acromático dando lugar a cromosomas rezagados, que no lograron incorporarse al núcleo de las células hijas. Ambos eventos dan lugar a núcleos pequeños (Kirsch Volders & Fenech, 2001).

### **5.3.1.2 Prueba de micronúcleos**

Para determinar daño en el DNA se utilizan diversos biomarcadores, entre estos se encuentra la prueba que evidencia la presencia de micronúcleos por microscopía. Se puede utilizar cualquier tipo de célula nucleada procedente de un organismo que haya sido expuesto a genotóxicos; sin embargo, el uso de las células exfoliadas de la mucosa yugal tiene muchas ventajas, por ejemplo, que son fácilmente afectadas por los contaminantes ambientales, por lo que permiten identificar y evaluar los factores de riesgo que son asociados a diversas enfermedades, ya que, aproximadamente el 90% de los cánceres tienen origen epitelial. El tejido epitelial es idóneo para la identificación de anomalías nucleares, debido a que el daño en el ADN sucede, con mayor facilidad, en células de la capa basal (Rey-Henao *et al.*, 2020). El epitelio oral se conserva en una renovación celular continua en la cual las células nuevas que se producen en la mitosis de la capa basal, migran a la superficie para sustituir a las células que se desprenden, debido a lo cual, la mucosa está compuesta por poblaciones de células progenitoras y en maduración (Çelik *et al.*, 2003).

La prueba de micronúcleos es una alternativa óptima para el seguimiento del daño genético en poblaciones, además es clara, precisa, confiable, efectiva, rápida y sencilla y no necesita de cultivos celulares (Torres Bugarín & Carillo Gómez, Catherine Scarlett Armijo Gómez, 2019). La técnica de micronúcleos es de mucha utilidad debido a su alta confiabilidad para la detección de daño genotóxico e inestabilidad genómica en humanos (Flores-García *et al.*, 2018).

### **5.3.2 Células binucleadas**

Las células binucleadas poseen dos núcleos principales, por lo general estos núcleos se encuentran muy cercanos o incluso juntos, tienen una misma morfología y se tiñen igual, son muy parecidos a un núcleo normal (Castro *et al.*, 2004).

Al finalizar la mitosis se produce la cariocinesis (separación de los núcleos de las células hijas) pero el citoplasma no se divide. Cuando la célula binucleada pertenece a un epitelio de revestimiento, es excluida del tejido, pero si se trata de una célula epitelial basal, ambos núcleos de la célula binucleada ingresaran a una nueva mitosis al mismo tiempo, entonces cuando se desintegran las membranas nucleares, simultáneamente los cromosomas de ambos núcleos quedan incorporados en el mismo huso, por lo cual son atraídos juntos, de manera que cuando se concluye la castromitosis, existen dos células con material genético duplicado, o bien, una célula tetraploide, si se produce el fenómeno de interrupción de la citocinesis (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013).

### **5.3.3 Cariorrexis**

También es conocida como desintegración nuclear. Para la formación de esta anomalía nuclear, la membrana del núcleo desaparece y la cromatina se observa condensada en grupos que, paulatinamente se van haciendo más pequeños a medida que el núcleo se va desintegrando (Flores-García *et al.*, 2018; Torres-Bugarín *et al.*, 2013).

### **5.3.4 Cariólisis**

Las células con cariólisis son conocidos como nucleos fantasmas porque son nucleos completamente vacíos, existe una ausencia total del ADN, por lo tanto, no se consideran nucleos verdaderos (Torres-bugarín *et al.*, 2013). En estas células en las que se ha producido disolución nuclear, la membrana nuclear se conserva (Castro *et al.*, 2004), es probable que represente una etapa muy avanzada en el proceso de muerte celular. Cuando existe correlación entre células picnóticas y células con cariólisis, esto parece indicar que las células con cariólisis proceden de células con cromatina condensada, o indirectamente, de células picnóticas (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013).

### **5.3.5 Núcleo lobulado**

Este tipo de núcleo es conocido también como prolongación nuclear o “broken eggs” (huevo quebrado). La forma del núcleo se caracteriza por la presencia de una protuberancia de tamaño variable (Castro *et al.*, 2004) que, en el lugar de unión al núcleo presenta una constricción, parece estar relacionado con un proceso de eliminación de material nuclear por gemación, por lo cual también son conocidas como “nuclear buds” (brotes nucleares). El

lóbulo posee las mismas características del núcleo, del cual difiere únicamente en el tamaño, tiene entre  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{3}$  del tamaño del núcleo. Algunos investigadores consideran a los núcleos lobulados presentes en linfocitos como indicadores de genotoxicidad, pero en las células exfoliadas de la mucosa oral, su rol no está dilucidado, debido a que habitualmente en diversas enfermedades aparecen vinculadas con mayor frecuencia a los micronúcleos y no a las células con núcleo lobulado y se especula que posiblemente estén relacionados con procesos degenerativos de la primera capa de células epiteliales (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013).

### **5.3.6 Núcleo picnótico**

El núcleo picnótico es un núcleo pequeño, con una alta concentración de material nuclear que es uniforme pero intensamente teñido, su tamaño aproximado es de  $\frac{1}{3}$  del tamaño del núcleo (Torres-bugarín *et al.*, 2013). Probablemente el núcleo picnótico se forma como respuesta a una lesión o daño celular (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013).

## **5.4 Allium cepa**

*Allium cepa* es el nombre científico de la cebolla, es una planta herbácea, anual, bienal o perenne, forma parte de la familia *Liliaceae*. Es una planta que se caracteriza por ser de pequeña altura, que está compuesto por un tallo aplanado del cual proceden, por debajo, las raíces y por encima, las hojas que, inicialmente son carnosas y de color claro, lo cual forma el bulbo. El olor y sabor que son característicos de esta especie, se deben a productos azufrados, los cuales son liberados cuando se destruye a sus células.

El sistema radicular es fasciculado, las raíces son abundantes, cortas, blancas y tienen muy pocas ramificaciones. El bulbo es globoso, elipsoideo o aplanado, a partir del cual continúan las hojas que son largas y cilíndricas. Las flores, agrupadas en umbelas, son pequeñas y de color claro (InfoAgro, sf).

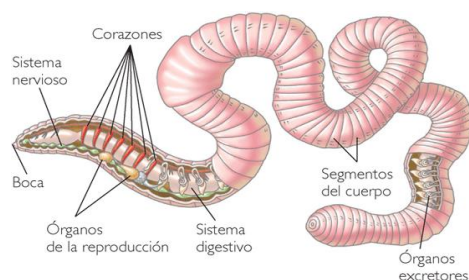
### **5.4.1 Test Allium**

Los ensayos biológicos, como el test *Allium*, son valiosos para la evaluación del efecto tóxico a nivel ambiental porque brindan gran cantidad de ventajas para el análisis ecotoxicológico. Estos bioensayos son herramientas simples, rápidas, económicas, en las que se utilizan plantas de fácil disponibilidad, de preferencia que tengan una germinación rápida, tal como

ocurre con la cebolla (*Allium cepa*). El daño provocado por un agente genotóxico da lugar a mutaciones cromosómicas del ápice radicular de la cebolla, debido a la alta sensibilidad de las raíces de esta especie para la detección de sustancias nocivas tanto para la salud del ser humano como para el ecosistema, además la prueba permite evaluar distintas concentraciones y tiempos de exposición (Urteaga & Lallana, 2005; Caritá & Marín-Morales, 2008). El test *Allium* es reconocido como un modelo genético cuantitativamente favorable para detectar la toxicidad de las aguas residuales industriales, aguas de ríos y suelos contaminados, así como también para realizar un seguimiento cuando se realiza tratamiento de descontaminación de suelos (Munawar et al., 2019).

### 5.5 Eisenia fétida

Está formada por un cuerpo blando, cilíndrico, largo, de 15 a 25 cm, el cual presenta segmentos debido a anillos transversales que ayudan a que se dilate y contraiga. Por lo general, el cuerpo de la lombriz es húmedo, cualidad que ayuda a la respiración cutánea. El color de la lombriz de la lombriz depende de la especie, varía entre marrón claro, violeta, rosa pálido, amarillo y rojo brillante. El cuerpo de algunas lombrices presenta sedas, pelos o quetas, que son estructuras que se usan para ayudar al transporte. En uno de los extremos se encuentra la cabeza que no posee ojos, dientes, ni orejas, pero tienen una piel muy sensible a la luz, por lo cual, tienden a tener ftofobia. Existe unos orificios en la superficie del cuerpo que son los genitales, que, además son excretores. El segmento más ancho se llama clitelo y está relacionado con la función de reproducción. (Animales Itonids, 2022, Ibañez, 2011).



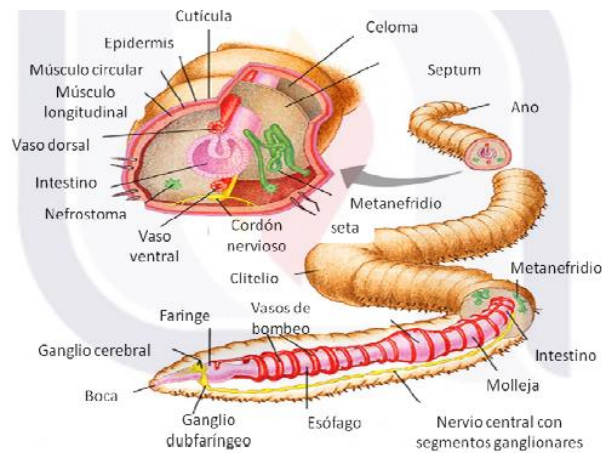
**GRAFICO 3.** Morfología de la lombriz de tierra.

*Fuente: Rodríguez Galvez*

**GRAFICO 4.** Anatomía y fisiología de la lombriz roja californiana.

*Fuente: <https://jolocado.wordpress.com/2011>*

La pared exterior del cuerpo de la lombriz esta revestida por una membrana delgada y transparente llamada “mucus” cuya composición es nitrógeno, por lo cual es un importante nutriente para las plantas, el último segmento es el pigidio conocido también como ano (Animales Itonids, 2022).



El cuerpo posee una cavidad llamada celoma, el cual constituye un espacio comprendido entre la pared externa y el aparato digestivo, en el interior se encuentra un líquido muy parecido al producido por el páncreas. El líquido celómico contiene celomocitos que tienen una función análoga a los leucocitos de los vertebrados, por tanto, son células de defensa. El líquido celómico tiene varias funciones debido a la presencia de enzimas proteolíticas, hemolíticas, antibacteriales, aglutinantes y citotóxicas, una de las proteínas excretadas en este compartimiento, es, por ejemplo, la lisenina que ocasiona la lisis de las células extrañas (Animales Itonids, 2022; Maldonado Godina, 2011; Claros Guzmán, 2015).

### **5.5.1 Ensayos con Eisenia fetida**

Existe una diversidad grande de sustancias químicas que contaminan el suelo y producen efectos tóxicos en los organismos que habitan este tipo de ecosistema, como consecuencia, se producen cambios en la diversidad, población y actividad de los organismos del suelo. La

evaluación de la contaminación del suelo se realiza con especies que son consideradas como “centinelas”, son diverso tipo de lombrices de tierra como *Eisenia fétida*, *Eisenia andrei*, *Lombricus terrestris*, etc. La mayoría de las lombrices de tierra degradan compuestos orgánicos disminuyendo los posibles efectos tóxicos para el entorno biótico (Singh & Kalamdhad, 2016), por lo cual estas especies son consideradas útiles en biorremediación, por ejemplo, *Eisenia fetida* es útil para la mejora de suelos afectados por petróleo; sin embargo, la lombriz desarrolla anomalías nucleares que son consecuencia de daño en su ADN, las principales anomalías nucleares que se ha encontrado por efecto del petróleo han sido los micronúcleos (Martinkosky *et al.*, 2017). Las lombrices de tierra, por su capacidad detritívora, la habilidad de absorción de su tegumento y su alta frecuencia en casi cualquier tipo de terreno, constituyen un muy buen bioindicador para evaluar las alteraciones de los ecosistemas o hacer ensayos en el laboratorio (Neuhauser *et al.*, 1985).

## **5.6 Lactuca sativa**

Lechuga es el nombre común de *Lactuca sativa*, esta es una planta pertenece a la familia *Compositae*, se compone de: raíz, hojas, tallo, inflorescencia y semillas. La raíz tiene un tamaño que no sobrepasa los 25 cm de profundidad es pivotante corta y poco ramificada; las hojas son de formas variadas, el borde de los limbos es ondulado o liso. El tallo suele tener forma cilíndrica y con varias ramificaciones. Las flores forman una inflorescencia de flores amarillas ya sea en racimos o corimbos y las semillas se encuentran en un vilano plumoso (Valdivia & Almanza, 2016).

### **5.6.1 Ensayos con Lactuca sativa**

Como muchos otros organismos, las lechugas son afectadas por la contaminación ambiental, especialmente por fumigaciones, son muy vulnerables a los plaguicidas de manera directa o indirecta, razón por la cual se las usa como bioindicadores de tóxicos ambientales (Manrique *et al.*, 2011). Los ensayos de toxicidad que se basan en la germinación de semillas y la elongación radicular, se pueden realizar con distintas especies de plantas, estas técnicas son económicas, accesibles, relativamente rápidas y se puede obtener información sobre el efecto que está causando un tóxico en especies vegetales, estos estudios pueden ser realizados en el ambiente que se necesita evaluar, en condiciones ya establecidas, o en forma experimental modificando las condiciones ambientales: concentración de la sustancia tóxica, tiempo de

exposición, interferencia de factores ambientales como la luz, temperatura, etc. (Rodríguez Romero *et al.*, 2014)

Los bioensayos de toxicidad con semillas de lechuga son considerados como pruebas de toxicidad aguda, a través de los cuales se puede evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos tóxicos solubles puros, aguas residuales industriales y domésticas, lixiviados de suelos, sedimentos u otras materias sólidas. La evaluación consiste en establecer el poder, de la sustancia a evaluar, de inhibir la germinación y la elongación de la radícula y el hipocótilo (Sobrero & Ronco, 2004), la ventaja de *Lactuca sativa* es su capacidad de sobrevivir en ambientes que contienen ciertas concentraciones de sustancias tóxicas, es por ello que esta especie es considerada como un buen bioindicador, muy sensible a contaminantes ambientales (Romero Gómez & Prieto Zapata, 2014).

## **6. DISEÑO METODOLÓGICO**

En el presente trabajo se ha considerado dos áreas: 1) El efecto de contaminantes atmosféricos en trabajadores de estaciones de servicio y 2) El efecto del suelo, de estos centros de trabajo, sobre lombrices de tierra, cebolla y lechuga.

### **6.1 Tipo de estudio:**

Transversal, correlacional, experimental, descriptivo.

### **6.2 Lugares de toma de muestra**

Debido a la aceptación de los dueños y el personal para la realización de este trabajo, las muestras fueron tomadas en las siguientes estaciones de servicio:

- 1) Estación de servicios Mundial, ubicada en la autovía La Paz – Oruro, en la zona de Ventilla de la ciudad de El Alto.
- 2) Estación de servicio San Sebastián, ubicada en la autovía La Paz – Oruro, en la zona Senkata de la ciudad de El Alto.
- 3) Estación de servicio Petroal, ubicada en la avenida Ladislao Cabrera, Carretera a Viacha de la ciudad de El Alto.
- 4) Estación de servicio Las Rosas, ubicada en la Av. Ladislao Cabrera, Viacha, El Alto.

### **6.3 Recolección de muestras de mucosa yugal y datos de voluntarios**

En las mencionadas estaciones de servicios se obtuvo células de descamación de la mucosa yugal de 60 expendedores de combustibles, que hayan cumplido con los criterios de inclusión y que hayan estado de acuerdo en participar como voluntarios. A estas personas también se les hizo una encuesta, previa firma del consentimiento informado (anexos 1 y 2). El mismo tipo de muestra fue tomada a otro grupo de 60 voluntarios, de ambos sexos, que no habían estado expuestos a factores de riesgo para el desarrollo de anomalías nucleares. La edad de este grupo de personas está comprendida los 18 y los 33 años.

El procedimiento para la selección de los voluntarios, recolección de datos y toma de muestra, fue el siguiente: Se explicó acerca del trabajo de investigación, se solicitó la firma del consentimiento informado, después de lo cual se procedió a realizar la encuesta. Finalmente, para la toma de muestra, se solicitó el enjuague de la boca con agua a fin de eliminar artefactos que pudieran interferir en la identificación de características de los núcleos celulares. Con las muestras así obtenidas se realizó un frotis en un portaobjetos, que fue fijado con fijador de cabello.

Cabe aclarar que se consideraron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

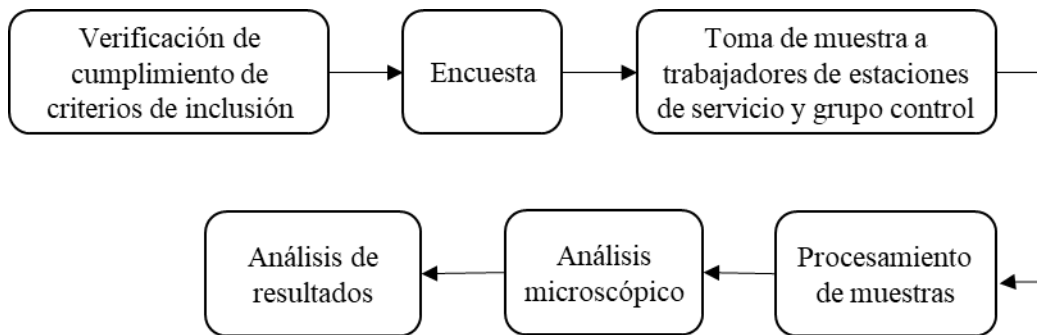
- **Criterios de inclusión:** Expendedores de gasolina, diésel y gas de ambos sexos y de cualquier edad, que accedan a participar en el presente trabajo de investigación.
- **Criterios de exclusión:** Personas que sufran una enfermedad neoplásica, estén en tratamiento antineoplásico o estén expuestos a otros genotóxicos, o tengan la costumbre de “acullicar”.

### **6.4 Recolección y pre procesamiento de muestras de suelo de estaciones de servicio**

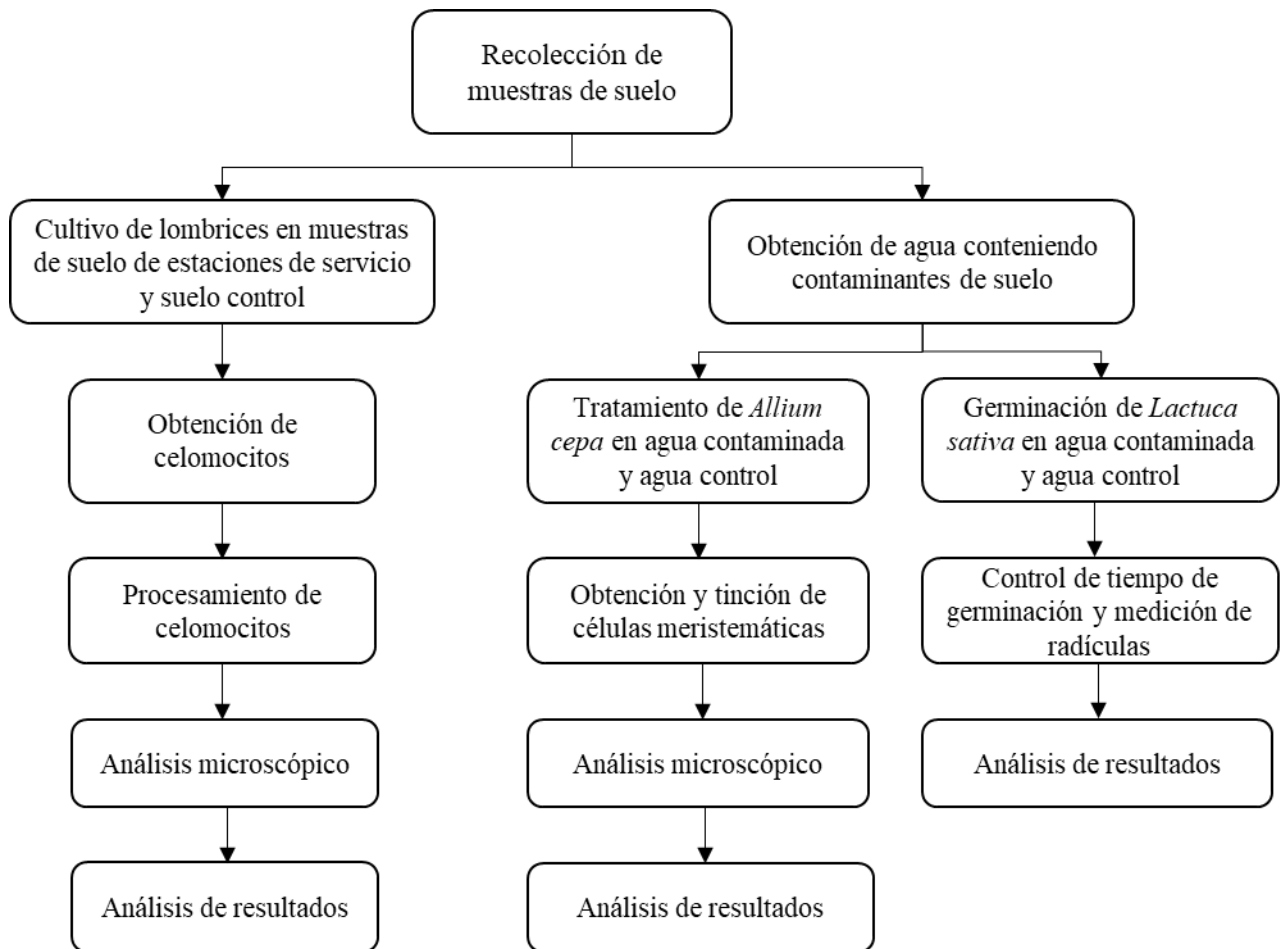
En cada una de las estaciones de servicios se recolectó cuatro muestras de suelo, cada una de aproximadamente 1 Kg: La primera a 2,5 metros de un surtidor de combustible, la segunda a 5 metros, la tercera a 7,5 metros y la cuarta a 10 metros, por lo tanto, el total de muestras de suelo recolectadas alcanzó a 16. 500 gramos de cada muestra se utilizaron para el análisis con *Eisenia fétida* y a los otros 500 gramos se añadió 2 litros de agua, con el propósito de extraer los contaminantes adheridos a la muestra. El agua obtenida fue utilizada para el test *Allium* y para la inducción de la germinación de *Lactuca sativa*.



## 6.5 Flujogramas de trabajo



**GRAFICO 5.** Con muestras de trabajadores de estaciones de servicio y grupo control  
**Fuente:** Elaboración propia



**GRAFICO 6.** Con muestras de suelo

**Fuente:** Elaboración propia

## 6.6 Técnicas y procedimientos

### 6.6.1 Identificación de anomalías nucleares en células de descamación de trabajadores de estaciones de servicio y grupo control

Las muestras, que fueron obtenidas por raspado de la mucosa oral con bajalenguas, se fijaron en un portaobjetos, se fijaron con fijador de cabello y se tiñeron con tinción panóptica.

Se realizó un recuento de 1000 células, de cada persona (voluntarios y grupo control) observando las características de los núcleos de cada una a 40X. Para evitar cometer errores en la identificación de anomalías nucleares, se consideraron a las células en los siguientes casos:

- Células solapadas (sobrepuestas).
- Células dobladas.
- Células en las que no se pueda observar claramente el citoplasma y el núcleo.
- Células que no estén perfectamente teñidas.
- Células en las que se observe la sobreposición de alimentos, bacterias agrupadas u otros artefactos.

En los dos primeros casos el colorante suele producir manchas que pueden ser confundidas con micronúcleos o células binucleadas.

Para la identificación de cada una de las anormalidades nucleares, se consideró los siguientes criterios (Fenech, 1985, Torres-Bugarín, 2013):

### **Micronúcleos**

- Ubicación intracelular: citoplasma, cerca del núcleo o alejado de él.
- Tamaño: 1/16 a 1/3 del tamaño del núcleo.
- Color: El mismo color del núcleo, morado con la tinción panóptica.
- Textura: Similar al núcleo.
- Forma: Esférica o alargada.
- Presencia de membrana micronuclear.

### **Células binucleadas**

- Número de núcleos: Dos
- Ubicación: citoplasma, generalmente próximos entre sí.
- Color, textura, forma, tamaño y presencia de membrana nuclear normales en los dos núcleos.

### **Cariólisis**

- Número de núcleos cariolióticos: Uno por célula,
- Color: Tenue y compacto, producto de la degradación del material genético (razón por la que se los conoce también como “núcleos fantasma”).
- Membrana celular: normal o degradada.
- Tamaño: el mismo de un núcleo normal.

## **Cariorrexis**

- Número de núcleos cariorrécicos: Uno por célula
- Apariencia del núcleo: Cromatina agrupada y teñida dentro del núcleo, espacios sin teñir, debido a que son consecuencia de la degradación de la cromatina.
- Membrana nuclear: Diferentes grados de degradación
- Tamaño: el mismo que un núcleo normal

## **Células con núcleo lobulado**

- Apariencia: Núcleo con constricción en un extremo que origina un fragmento de núcleo unido al núcleo.
- Tamaño de la lobulación: 1/3 a 1/4 del tamaño del núcleo
- Otras características similares a las del núcleo.

## **Células con núcleo picnótico**

- Número de núcleos picnóticos: uno por célula
- Tamaño: variable, aproximadamente 1/3 del tamaño del núcleo, dependiendo del grado de picnosis.
- Apariencia de la membrana nuclear: arrugada
- Color: Intenso por la condensación del material genético

### **6.6.2 Efecto de suelo contaminado de estaciones de servicio sobre *Eisenia foetida*,**

#### ***Allium cepa* y *Lactuca sativa***

##### **6.6.2.1 Ensayo con *Eisenia foetida***

Para determinar si el suelo de estaciones de servicio posee actividad tóxica sobre los organismos que lo habitan, se utilizó *Eisenia foetida* (lombriz de tierra), 5 lombrices por cada muestra de suelo recolectada, 20 lombrices por estación de servicio, haciendo un total de 80 lombrices que fueron expuestas a suelos supuestamente contaminados. También se utilizó un grupo control que estuvo conformado por cinco lombrices por cada estación de servicio, 20 en total.

Cada grupo de lombrices fue depositado en un recipiente de plástico que contenía 500 gramos de muestra de suelo de las estaciones de servicio (a 2,5 m, 5 m, 7,5 m y 10 m de distancia de un surtidor de combustible) y se añadió 50 gramos de composta el cual es utilizado por las lombrices como fuente alimenticia. Las lombrices se mantuvieron en estos recipientes, alejadas de la luz solar, durante 7 días.

Para la obtención de los celomocitos, las lombrices fueron enjuagadas con agua destilada y se las cortó a la altura del clitelo, la muestra fue obtenida por escurrimiento, se realizó un extendido en un portaobjeto, después de se fijó con spray y tiñó con tinción panóptica.

Se observaron 1000 células por cada lombriz, a través de un microscopio (a 40 X) identificando alteraciones nucleares.

#### **6.6.2.2 Test Allium.**

Para el Test *Allium* se utilizó el agua cuyo proceso de obtención fue descrito anteriormente. Por cada muestra de agua contaminada con las muestras de suelo recolectadas, se utilizaron 5 bulbos de cebolla: un bulbo sirvió como control negativo, el cual fue incubado en agua purificada de mesa y los cuatro restantes fueron incubados en agua contaminada. Cada uno de los bulbos de cebolla se sumergieron en vasos de plastofomo conteniendo las aguas mencionadas. Se mantuvo a una temperatura de 19° durante 7 días, realizando el cambio de agua día por medio durante el tiempo ya mencionado.

Después de los 7 días, se procedió a cortar los ápices de las raíces y se las tiñó con orceina acetoacética siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

1. Se cortó cada una de las raíces a 3 mm del extremo apical, estos fragmentes de raíz fueron colocados en un vidrio de reloj.
2. Se hidrolizó los ápices con ácido clorhídrico 1 N durante 5 minutos, manteniendo a una temperatura de 60°C con la ayuda de un mechero. Después del tiempo mencionado se desechó el ácido clorhídrico.
3. Posteriormente se utilizó orceina acetoacética para teñir los ápices tratados con ácido clorhídrico, para lo cual se calentó el vidrio de reloj, conteniendo los ápices, hasta la emisión de vapores blanquecinos y se enfrió por 5 minutos. Este proceso se repitió

tres veces. Para preparar la orceina acetoacética, se colocó 0.3 gramos de orceina de una solución compuesta de 6.75 ml de ácido láctico y 8.25 ml de ácido acético glacial.

4. Se depositaron los ápices teñidos en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se presionó con el propósito de dispersar las células y lograr una monocapa.
5. Finalmente se realizó la observación microscópica de las muestras procesadas, realizando un recuento de 500 células a 100X, e identificando las anormalidades cromosómicas, mitóticas y nucleares en cada una de las muestras.

#### **6.6.2.3 Ensayo con *Lactuca sativa***

Para el ensayo con *Lactuca sativa* se utilizó también el agua contaminada con las muestras de suelo de las estaciones de servicio. El objetivo fue estimular la germinación de semillas para lo cual se utilizó 5 frascos, 4 frascos para las muestras de suelo y uno para el control negativo que contenía agua purificada de mesa. En cada frasco se depositó 10 semillas y se mantuvo a una temperatura de 19°C durante 15 días. Después de ese tiempo se procedió a medir las raíces.

#### **6.6.3 Análisis estadístico**

El programa estadístico SPSS fue utilizado para analizar los resultados obtenidos. A través del estadístico T de student se realizó la correlación entre la frecuencia de anormalidades nucleares y la exposición a hidrocarburos, también se realizó una correlación entre la frecuencia de anormalidades nucleares, especialmente micronúcleos y los datos obtenidos a través de la encuesta.

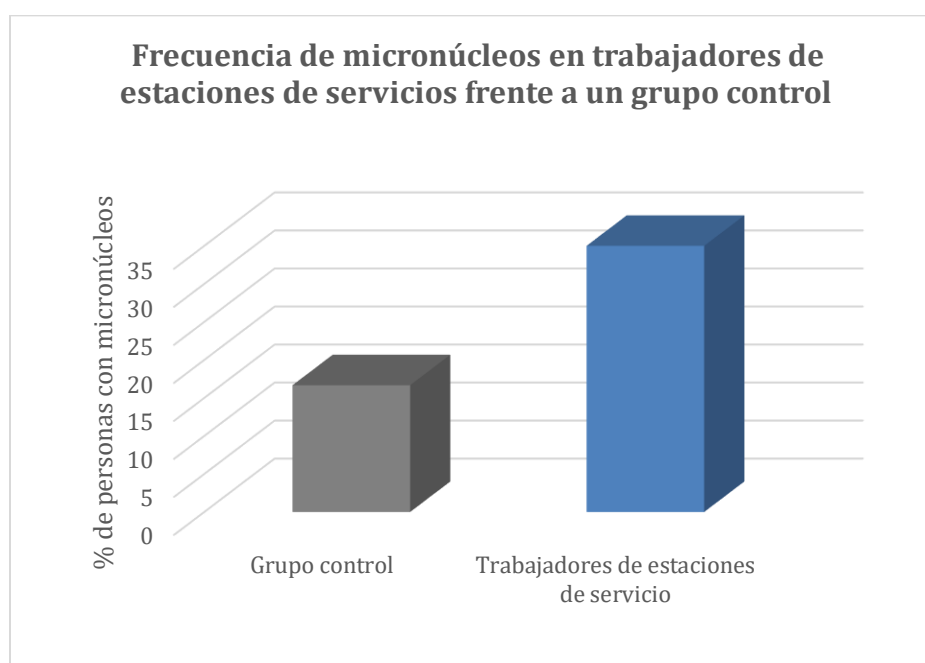
El mismo tipo de análisis de correlación fue realizado entre la presencia de anormalidades nucleares en celomocitos de lombriz de tierra y la exposición a contaminantes del suelo de las estaciones de servicio; entre la frecuencia de fases mitóticas en células meristemáticas de *Allium cepa* y la exposición a los contaminantes mencionados y, finalmente, entre la frecuencia de germinación y el crecimiento de las radículas de *Lactuca sativa* y la exposición a contaminantes.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Anormalidades nucleares en trabajadores de estaciones de servicio

Se analizaron las células de descamación de la mucosa oral de 60 trabajadores, de 4 estaciones de servicio, de ambos sexos, cuyas edades fluctuaron entre 18 y 58 años. A este grupo también se le hizo una encuesta para conocer algunos datos antropogénicos y exposición a factores de riesgo que pueden incidir sobre el resultado del presente estudio.

También se contó con un grupo control de 60 personas, de ambos sexos, con edades entre 18 y 33 años que usualmente no se encuentran expuestos a la acción de agentes genotóxicos o citotóxicos.

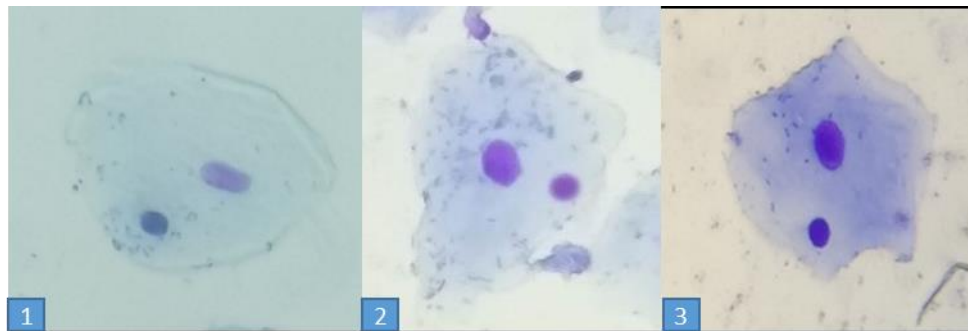


**GRAFICO 7.** Frecuencia de micronúcleos en trabajadores de estaciones de servicios frente a un grupo control

**Fuente:** Elaboración propia

En la gráfica 7 se puede ver que se encontró micronúcleos en el 35% de los trabajadores de estaciones de servicio, frente a 17,67% de personas que presentaron esta anomalía nuclear en el grupo control. A pesar de la diferencia entre estos resultados, el estadístico  $p$  es de 0,228, por lo cual el resultado se considera no significativo.

En el grupo procedente de estaciones de servicio se encontró hasta 2 células micronucleadas en las 1000 células observadas por persona (en promedio 0,042%); mientras que en el grupo control se encontró un promedio de 0,027% en la misma cantidad de células observadas.

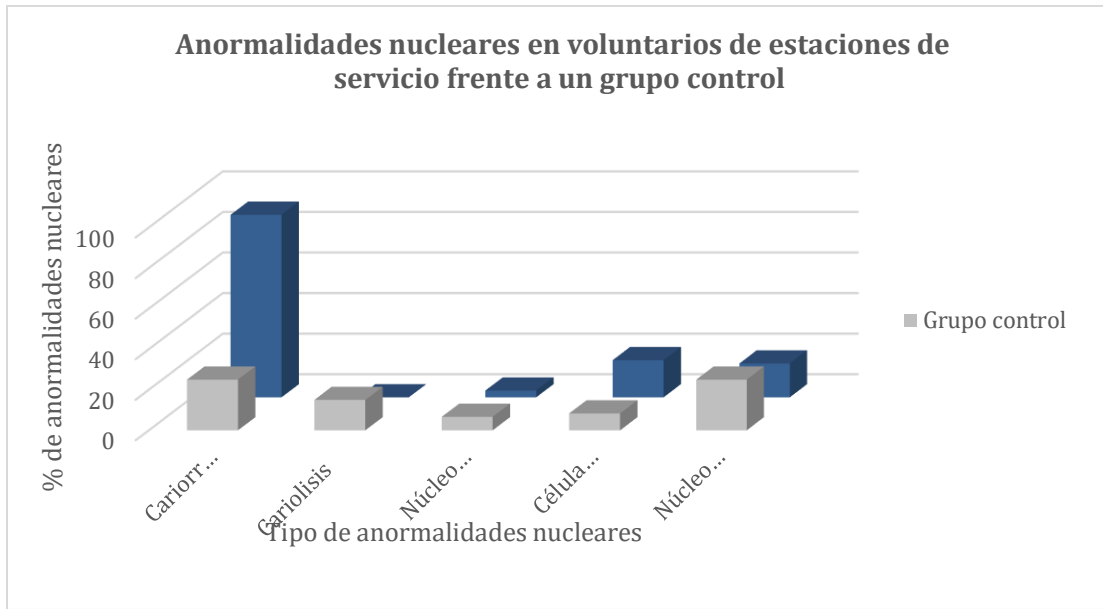


**GRAFICO 8.** Micronucleos en células de descamación de la mucosa oral de trabajadores de estaciones de servicio

Fotos 1, 2 y 3. Micronúcleos en células de descamación de la mucosa oral de trabajadores de estaciones de servicio. Siguiendo los criterios, no se encuentran solapadas, ni dobladas, los micronúcleos se encuentran en el citoplasma y poseen las mismas características de los núcleos.

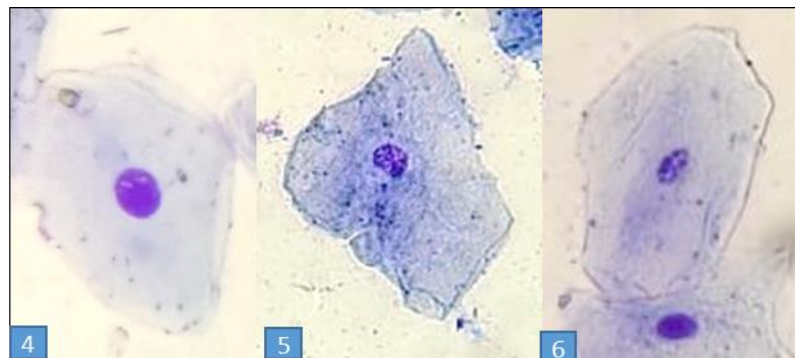
En la gráfica 9 se muestran las frecuencias encontradas de otros tipos de anormalidades nucleares, diferentes a los micronúcleos, encontradas en los trabajadores de estaciones de servicio y en el grupo control. Se encontró, entre 0 y 7 células con núcleos cariorréxicos en las 1000 células observadas en trabajadores de estaciones de servicio, en un 90% de estas personas; mientras que en el grupo control se encontró sólo en el 25%, aunque el número de células cariorréxicas por persona fue menor (entre 0 y 4), por lo tanto, este resultado es estadísticamente significativo ( $p = 0,000$ ).





**GRAFICO 9.** Anormalidades nucleares en voluntarios de estaciones de servicio frente a un grupo control

**Fuente:** Elaboración propia



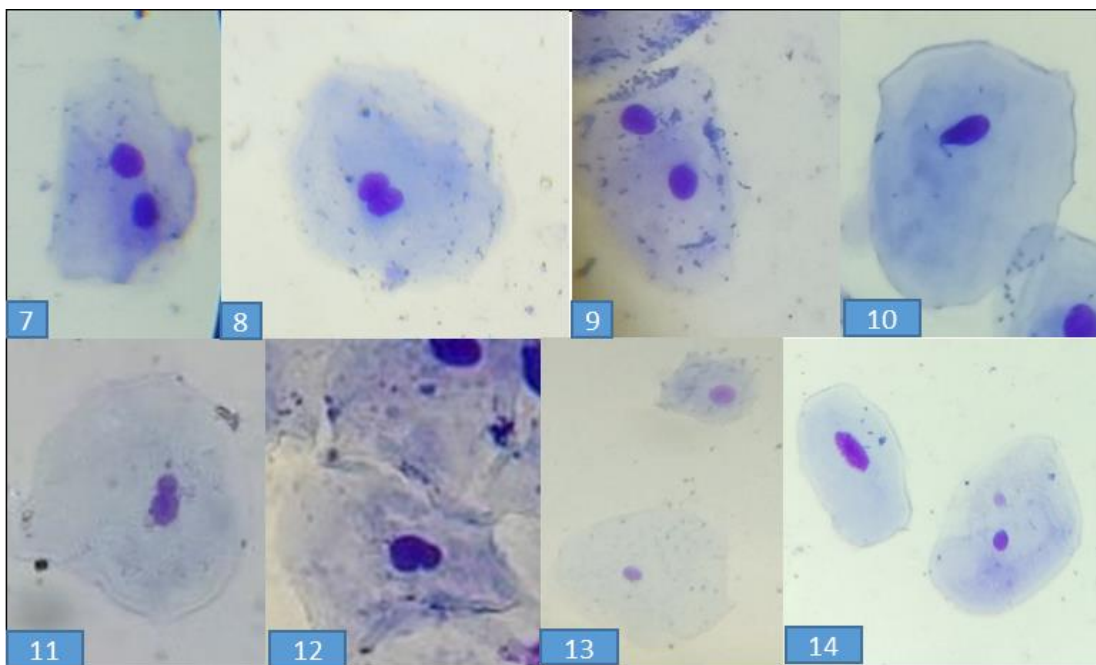
**GRAFICO 10.** Células cariorréxicas.

**Fuente:** Elaboración propia

Fotos 4, 5 y 6: Células cariorréxicas. Se observa la condensación de la cromatina por la coloración irregular del núcleo.

En relación a la cariólisis, no se la encontró en ningún voluntario expuesto a combustibles este tipo de anomalía; mientras que el grupo control sí. De manera similar, se encontró la mitad de células con núcleo lobulado y células binucleadas en el grupo de procedente de estaciones de servicio, en relación al grupo control (3,33%, frente a 6,67% de células con núcleo lobulado y 8,33% frente a 18,33%). Finalmente, también se encontró una cantidad

inferior de células con núcleo picnótico en el grupo de en estudio, en relación al grupo control. Por lo tanto, en estos cuatro últimos casos, los resultados no son relevantes.



**GRAFICO 11.** Células binucleadas

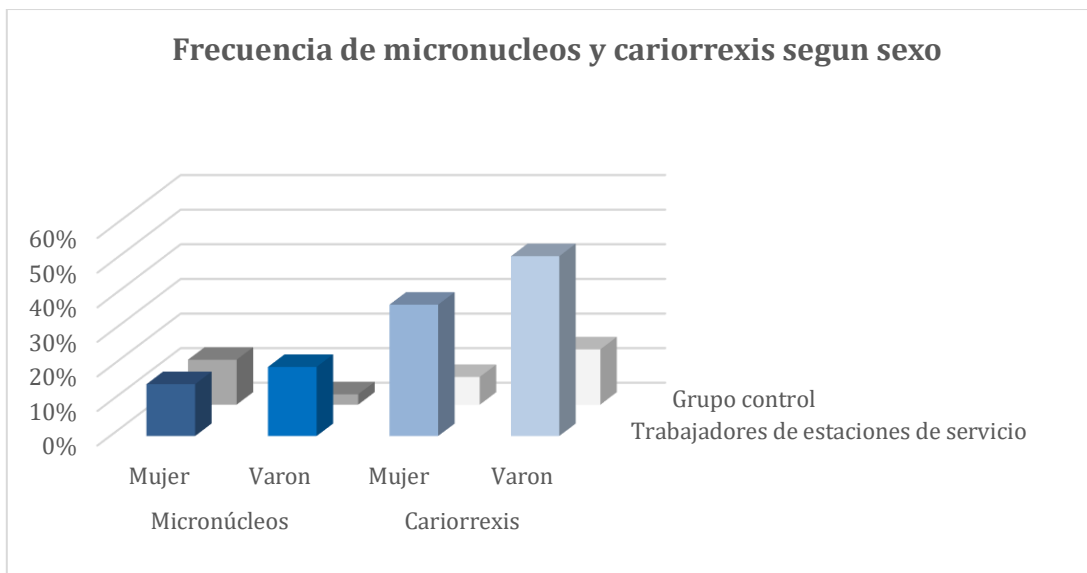
Fotos 7, 8 y 9: Células binucleadas, cada célula posee dos núcleos del mismo tamaño. Fotos 10, 11 y 12: Células con núcleos lobulados, el fragmento lobulado, de menor tamaño, está unido al núcleo a través de una constricción visible. Fotos 13 y 14: Células con núcleo picnótico (pequeño) que pueden ser comparadas con los núcleos de las células normales que se incluyen en las fotos.

## **7.2 Relación de micronúcleos y cariorrexis con variables antropogénicas**

Los resultados de la encuesta fueron analizados en relación a micronúcleos y cariorrexis considerando que 1) el análisis de micronúcleos (aunque el resultado no salió significativo en el presente estudio) es internacionalmente aceptado para establecer genotoxicidad y 2) cariorrexis, porque en esta investigación, fue el único tipo de anomalía cuyo resultado salió estadísticamente significativo.

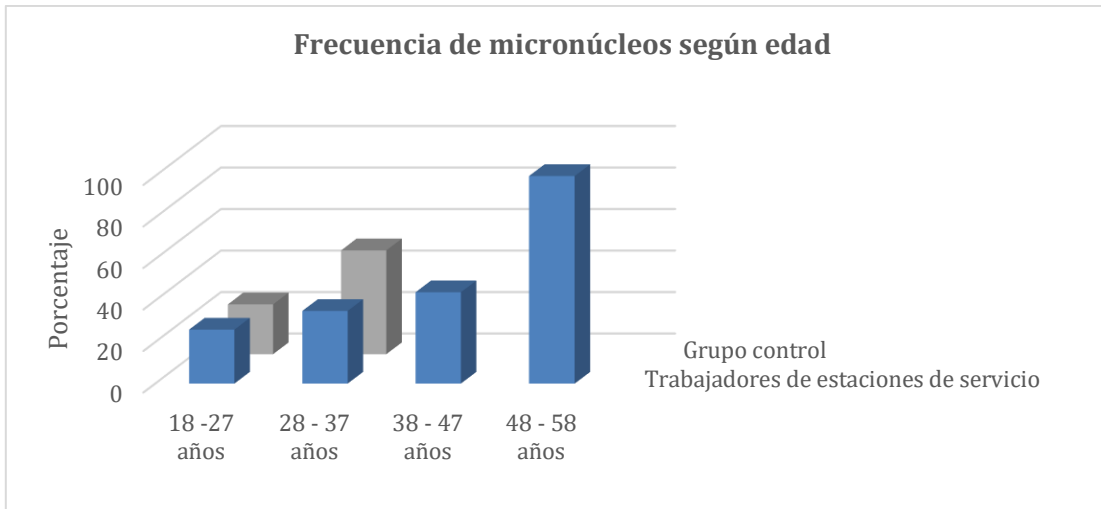
En la gráfica 12 se muestra que, tanto los micronúcleos como la cariorrexis se presentan con mayor frecuencia en los varones que trabajan en estaciones de servicio en relación a las mujeres del mismo grupo, en el grupo control el resultado fue lo contrario. Para micronúcleos

el resultado no es significativo (0,973); pero para cariorrexis sí lo es (0,026). Se aclara que el número de voluntarios de cada sexo fue similar entre los trabajadores de las estaciones de servicio (29 mujeres y 31 varones); mientras que en el grupo control el número de mujeres alcanzó a 21 y el de varones a 39.



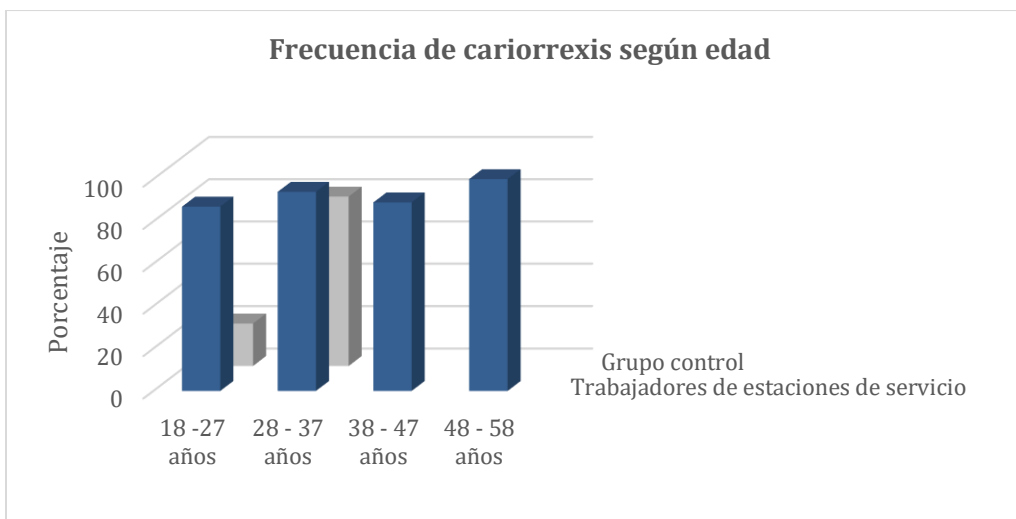
**GRAFICO 12.** Frecuencia de micronúcleos y cariorrexis según sexo  
**Fuente:** Elaboración propia

La gráfica 13 muestra que el porcentaje de células micronucleadas aumenta con la edad, esta tendencia se ve tanto en el grupo de voluntarios como en el grupo control; sin embargo, se debe considerar que los sub grupos divididos por edad, en ambos grupos, no tienen la misma cantidad de miembros (Trabajadores de estaciones de servicio: de 18 a 27 años: 31 voluntarios, de 28 a 37 años: 17 voluntarios, de 38 a 47 años: 9 voluntarios y de 47 a 58 años: 3 voluntarios; Grupo control: de 18 a 27 años: 53 voluntarios y de 28 a 37 años: 7 voluntarios). El resultado no es significativo ( $p = 0,382$ ).



**GRAFICO 13.** Frecuencia de micronúcleos según edad  
**Fuente:** Elaboración propia

La gráfica 14 muestra un porcentaje alto de cariorrexis en todos los miembros del grupo de voluntarios, expendedores de combustibles, y en el grupo de mayor edad entre el control negativo, se debe considerar que sólo el 12% del grupo control tiene más de 27 años. El valor  $\rho$  es 0,729.

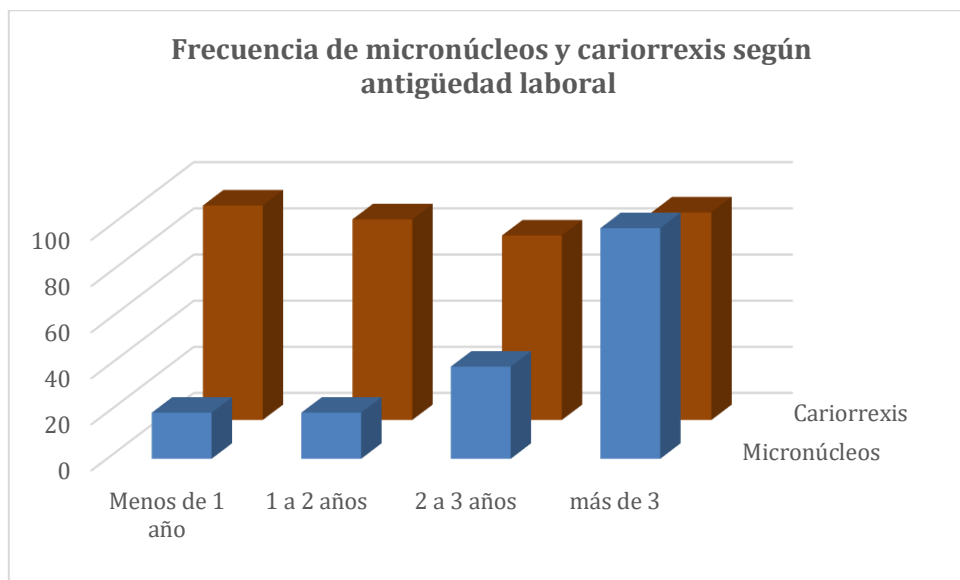


**GRAFICO 14.** Frecuencia de cariorrexis según edad  
**Fuente:** Elaboración propia

## VARIABLES LABORALES

En la encuesta se indagó sobre los siguientes aspectos: la antigüedad en el mismo tipo de trabajo, las horas de trabajo diario en la estación de servicio, el número de días de trabajo por semana. Entre estas tres variables, la única con resultado significativo fue la antigüedad en relación a la frecuencia de micronúcleos.

En la gráfica 15 se observa que la frecuencia de micronúcleos aumenta con el número de años de actividad laboral de los trabajadores de las estaciones de servicio; mientras que las células cariorréxicas se encuentran presentes, en todos los grupos, en niveles altos; aunque se observa una ligera declinación en el grupo de personas que han trabajado entre 2 y 3 años. La relación entre frecuencia de micronúcleos y antigüedad laboral es significativa ( $\rho = 0,00$ ), pero no lo es la relación entre frecuencia de células cariorréxicas y la antigüedad laboral ( $\rho = 0,29$ ).

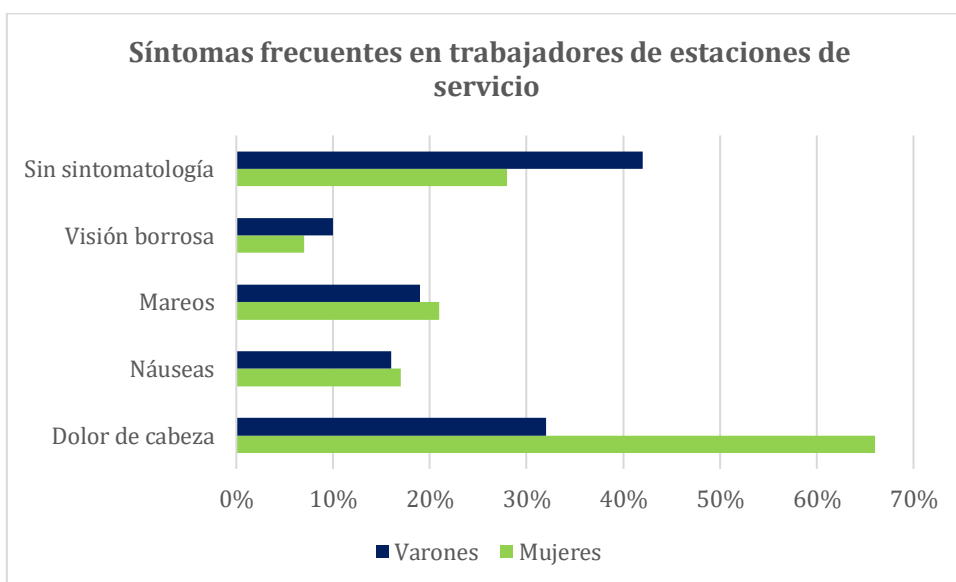


**GRAFICO 15.** Frecuencia de micronúcleos y cariorrexis según antigüedad laboral  
**Fuente:** Elaboración propia

Después de analizar 1) el lapso de tiempo de trabajo por día y 2) el número de días de trabajo por semana, no se encontró relación con la frecuencia de células micronucleadas ni células cariorréxicas, el valor  $\rho$ , en los cuatro casos, es superior a 0,05.

## Manifestaciones clínicas

El género más afectado, entre los trabajadores de estaciones de servicios, es el femenino, en este grupo se duplica la frecuencia de dolor de cabeza en relación a los varones y, también se identificó mayor número de mujeres que presentan náuseas y mareos en relación a los varones. En todos los casos, la correlación entre los síntomas indagados y la frecuencia de las anomalías nucleares que se están analizando, no fue significativa, excepto “náuseas” ( $p = 0,031$ ). Fue criterio de exclusión que los voluntarios no tuvieran enfermedades neoplásicas y, por tanto, estuvieran recibiendo tratamiento antineoplásico; sin embargo, uno de los voluntarios es diabético y 10 refirieron sufrir frecuentemente de resfríos (gráfica 16).



**GRAFICO 16.** Síntomas frecuentes en trabajadores de estaciones de servicio

**Fuente:** Elaboración propia

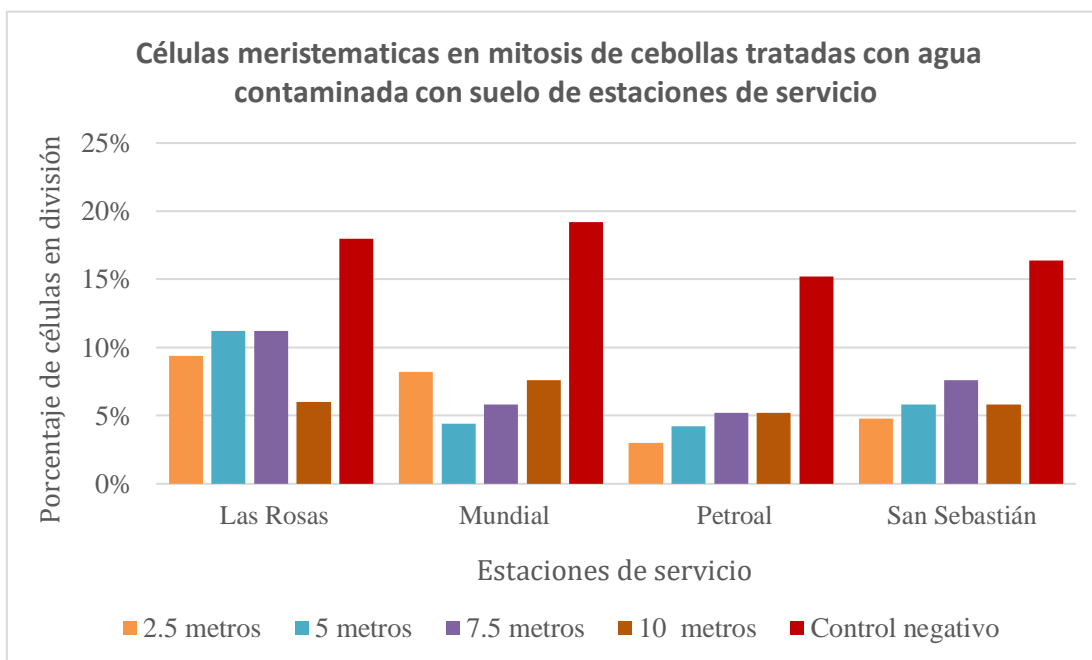
### 7.3 Alteraciones en las células meristemáticas de *Allium cepa* producidas por exposición a agua contaminada con gasolina

Las siguientes gráficas y fotos muestran el resultado del tratamiento de bulbos de cebolla con agua que fue mezclada con suelo de cuatro estaciones de servicio (a diferentes distancias de los surtidores), así como los resultados del tratamiento de cebollas con agua de mesa, como control negativo.

En la gráfica 17 se observa el porcentaje de células de *Allium cepa* que se encontraron en división (mitosis). Estas células proceden de tratamientos con agua contaminada con suelo

de estaciones de servicio, que fue recolectado a 2,5, 5, 7,5 y 10 metros a partir del centro de cada una de las cuatro estaciones de servicio de la ciudad de El Alto, elegidas para este trabajo. La frecuencia de división celular no sigue un comportamiento similar entre las cuatro estaciones de servicio, considerando la distancia de toma de muestra, el único valor que coincide es el mayor porcentaje de células en división que se presentan en los controles negativos, en los que se puede observar el doble de células mitóticas de cebolla en relación a aquellas que fueron tratadas con agua contaminada (2,5 metros:  $p = 0,476$ ; 5 metros:  $p = 0,536$ ; 7,5 metros:  $p = 0,785$  y 10 metros:  $p = 0,762$  por lo que ninguno es significativo).

Por otro lado, se observa una diferencia muy pequeña entre la presencia de células en división en cada una de las estaciones de servicio, pero en la gasolinera “Las Rosas” se obtuvo mayor cantidad de este tipo de células.

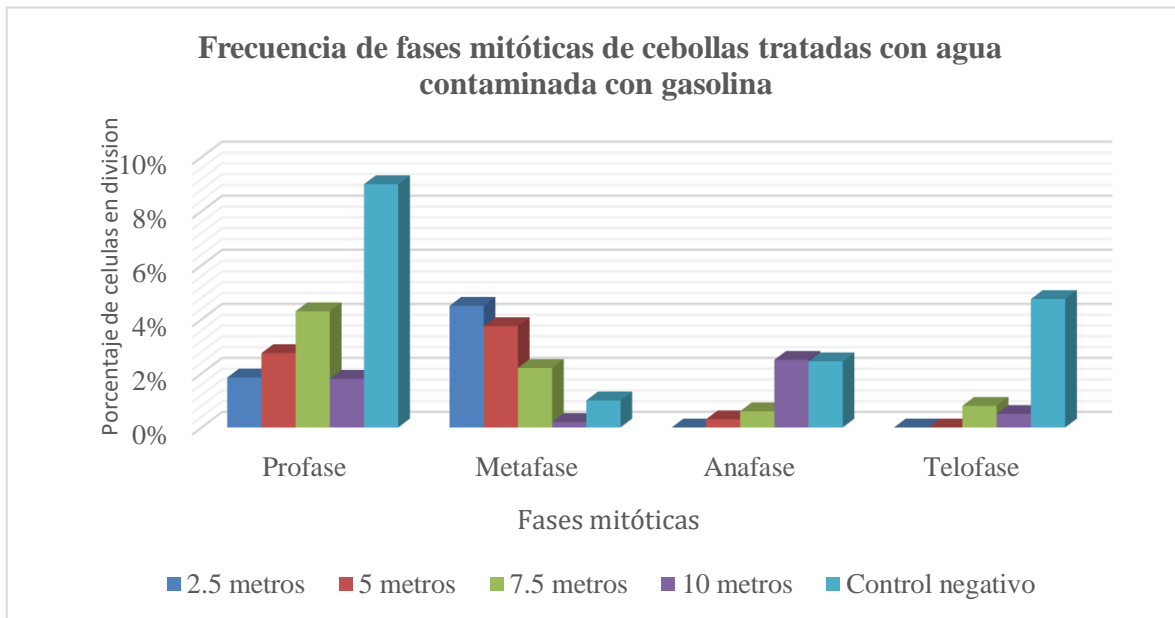


**GRAFICO 17.** Células meristemáticas en mitosis de cebollas tratadas con agua contaminada con suelo de estaciones de servicio

**Fuente:** Elaboración propia

**En la gráfica 18 se pueden ver los porcentajes de fases de la mitosis, inducidas por la exposición a agua contaminada con suelo de estaciones de servicio (obtenidos a distancias diferentes), estos valores resultaron del promedio de las cuatro estaciones de servicio incluidas en el presente estudio. La profase, anafase y telofase son las fases en**

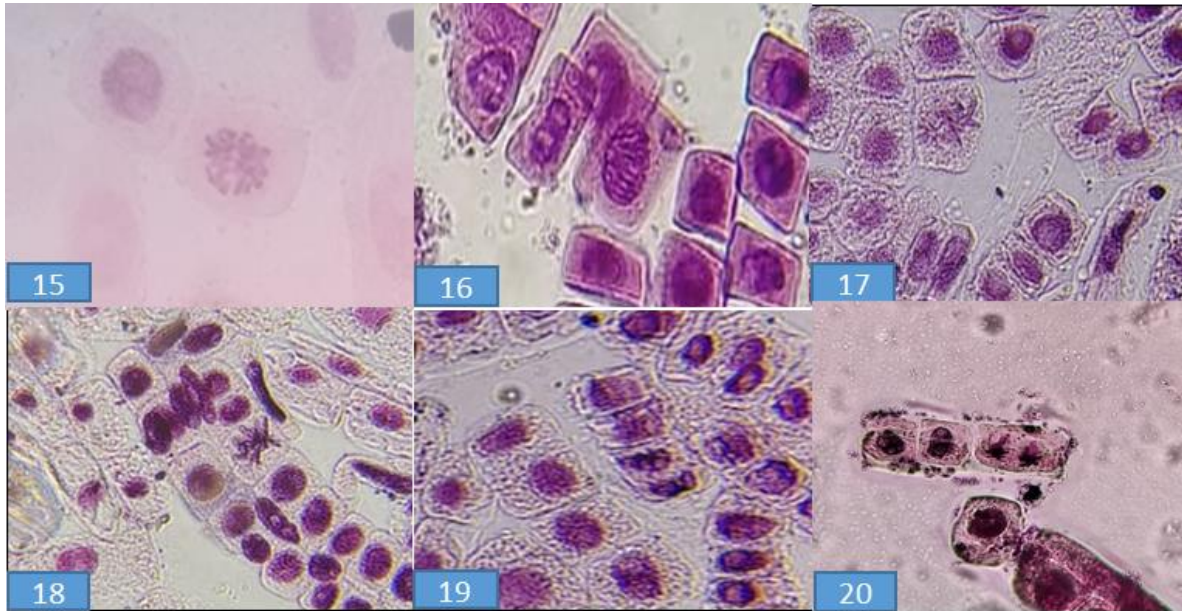
las que se encontraron porcentajes inferiores en las muestras tratadas con agua contaminada, en relación al control negativo, por otro lado, se obtuvieron más células metafásicas en estas células que las que permanecieron en agua de mesa; sin embargo, vale la pena aclarar que el análisis estadístico no fue significativo (profase  $\rho = 0.532$ , metafase  $\rho = 0.534$ ).



**GRAFICO 18.** Frecuencia de fases mitóticas de cebollas tratadas con agua contaminada con gasolina

**Fuente:** Elaboración propia

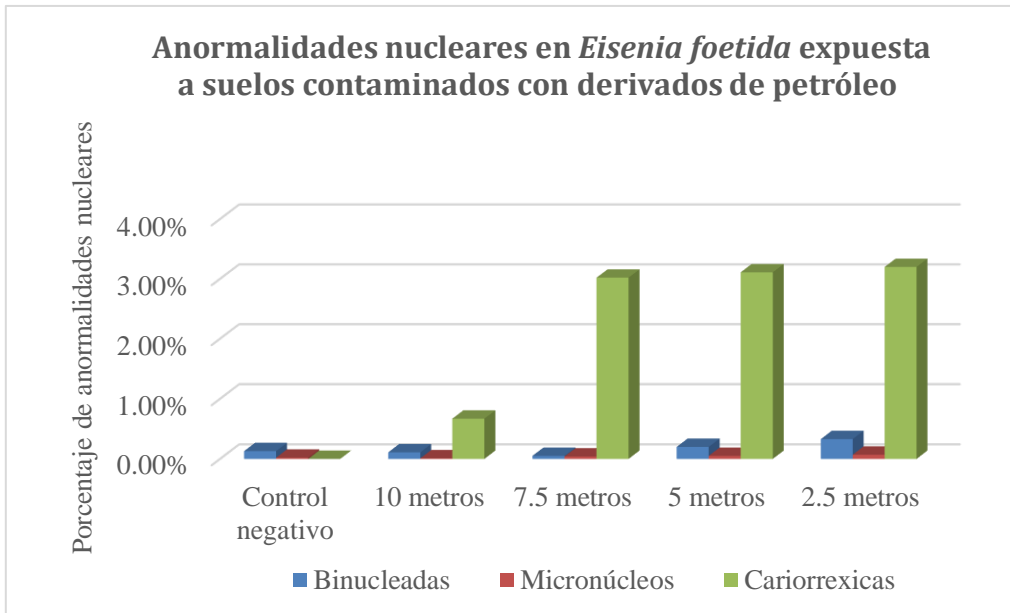




**GRAFICO 19.** Fases de la mitosis identificadas en células apicales de *Allium cepa*, con tinción panóptica: Fotos 15 y 16: Profase, Fotos 17 y 18: Metafase, Fotos 19 y 20: Telofase.

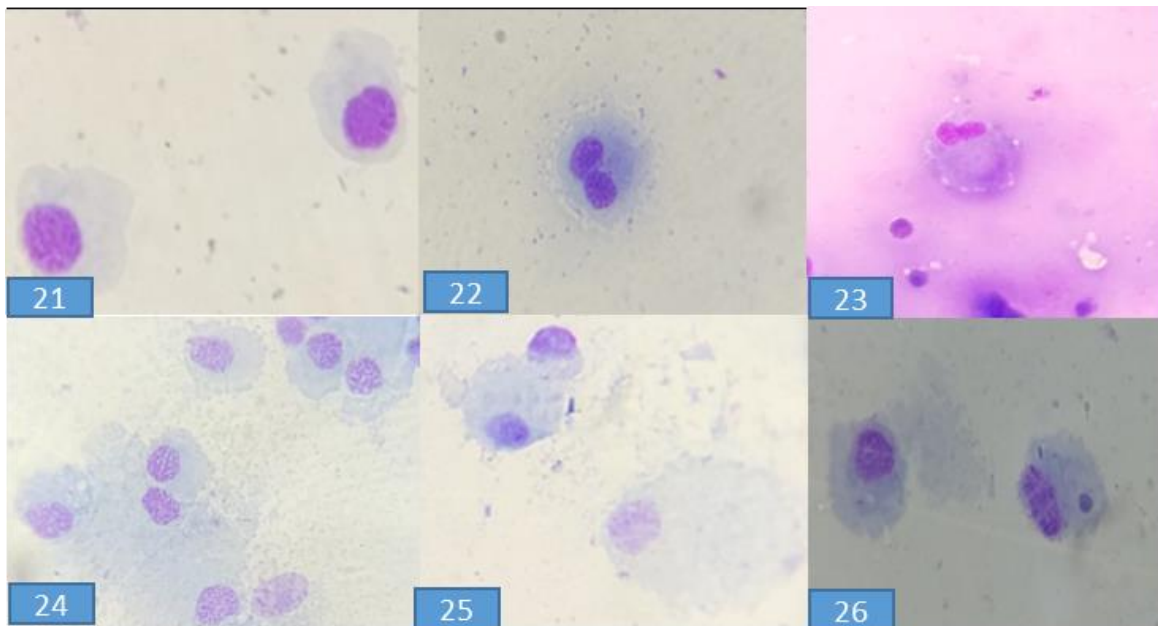
#### **7.4 Anormalidades nucleares en *Eisenia foetida* por exposición a suelos contaminados con gasolina**

En la gráfica 20 se puede observar que a medida que disminuye la distancia desde el punto de recolección de muestra hasta el surtidor, aumenta la frecuencia de anormalidades nucleares en los celomocitos, procedentes de *Eisenia foetida*, en especial, cariorrexis. También se observaron, en muy pequeña cantidad, células binucleadas y micronucleadas; sin embargo, ninguno de los resultados es estadísticamente significativo.



**GRAFICO 20.** Anormalidades nucleares en *Eisenia foetida* expuesta a suelos contaminados con derivados de petróleo

**Fuente:** Elaboración propia



**GRAFICO 21.** Celomocitos

Celomocitos de *Eisenia foetida* teñidos con tinción panóptica. Foto 21: Celomocitos normales, se observa núcleos de bordes regulares, de tinción casi homogénea, citoplasma ligeramente teñido, sin granulaciones. Fotos 22 y 23: Celomocitos binucleados. Foto 24: Celomocitos de núcleos kariorréxicos, se observa la condensación

de la cromatina y la disolución de la membrana nuclear. Foto 25: En la célula inferior se observa un núcleo cariolítico, en el que se distingue la membrana nuclear, pero la cromatina casi ha desaparecido. Foto 26: El celomocito de la derecha presenta un micronúcleo y un núcleo cariorrético, el celomocito de la izquierda presenta una cariorrexis leve.

### 7.5 Efecto del suelo contaminado con derivados del petróleo sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa*

Con las semillas de lechuga que fueron tratadas con agua contaminada (a 19°C durante 30 días) se obtuvo como datos: 1) el tiempo requerido para la germinación y 2) la longitud de la radícula alcanzada a los 10, 20 y 30 días. Por cada estación de servicio se contó con un control negativo que consistió en .... Semillas tratadas con agua de mesa.

#### 7.5.1 Porcentaje de germinación relativo

Se determinó el porcentaje de germinación relativo con la siguiente fórmula:

$$\text{PGR} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{semillas totales}} \times 100$$

**TABLA 1.** Porcentaje de germinación relativa

Porcentaje de germinación relativa (PGR)		
Distancia del surtidor para toma de muestra de suelo	Tiempo de germinación	
	10 días	20 días
2.5 metros	0	35%
5 metros	0	42.50%
7.5 metros	0	32.50%
10 metros	0	50%

De acuerdo a lo expresado en la tabla 1, se produce menor inhibición de la germinación con las muestras que se obtuvo a 2,5 metros de distancia de los surtidores de combustible, que las muestras obtenidas a 10 metros. Con el control negativo se observó germinación del 100% de las semillas antes de los 10 días.

A los 30 días no se observó ninguna diferencia en relación a la observación efectuada a los 20 días.

### 7.5.2 Crecimiento promedio de la radícula

Se determinó el crecimiento promedio de la radícula (CPR) mediante la siguiente formula:

$$\text{CPR} = \frac{\sum x}{n}$$

Donde x es el tamaño de cada radícula y n es el número de semillas germinadas. El crecimiento de cada radícula se evaluó cada 10 días.

**TABLA 2.** Crecimiento promedio de la radícula

Crecimiento Promedio de la Radícula (CPR) (en cm)				
Distancia del surtidor para toma de muestra de suelo	Control negativo (-)	10 días	20 días	30 días
2.5 metros	3.67	0	0.67	1.11
5 metros	3.67	0	0.45	0.85
7.5 metros	3.67	0	0.53	1.12
10 metros	3.67	0	0.90	1.43

En la tabla 2 se expresa el promedio de crecimiento de las radículas de lechuga en centímetros. Las semillas que fueron tratadas con agua de mesa (control negativo) en pocos días, alcanzaron más del doble de tamaño que las que fueron tratadas con agua contaminada con muestras de suelo de estaciones de servicio, entre estas últimas no se encontró correlación directa entre la distancia de los surtidores y el crecimiento de las raíces, a pesar de que se observa mayor desarrollo radicular con las muestras tomadas a 10 metros.

## 8. DISCUSIÓN.

La gasolina es una sustancia tóxica que daña al ADN ocasionando su fragmentación por el estrés oxidativo, debido a un ataque a las bases nitrogenadas o al azúcar, el daño ocasionado a las bases genera cambios que dan lugar a la formación de bases modificadas, por ejemplo, 8-hidroxi,2'-desoxiguanosina (modificación altamente mutagénica), el timidín glicol y la 8-hidroxi-citosina. Por otro lado, el daño en el azúcar produce la pérdida de la base nitrogenada,

causando la aparición de sitios apurínicos (sitios AP) que pueden ser la causa de la ruptura de una o dos cadenas del ADN, lo cual es causa de inestabilidad genética. Por esta misma razón, también se produce entrecruzamiento de las cadenas de ADN y, por lo tanto, también hay predisposición a mutación e inestabilidad genética. De esta manera, el estrés oxidativo es causante primordialmente del daño al ADN produciendo mutación e inestabilidad genética, que están relacionadas con la carcinogénesis (**Triana et al., 2013**).

El benzo(a)pireno (que es un producto de la condensación de la gasolina debido a la combustión) es convertido por la enzima CYP1A1 en un epóxido, el cual, a su vez, es hidrolizado por la epóxido hidrolasa a un dihidrodio, sobre el cual nuevamente actúa la enzima CYP1A1 que lo transforma en una especie altamente reactiva, el diol-epóxido [benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido] que se une covalentemente al ADN, ocasionando aductos con la guanina. El metabolito de diol-epóxido tiene la opción de ser desintoxicado por las enzimas de biotransformación Glutación S-transferasas (GSTs), en especial por la GSTM1 y GSTP1 (**Roco et al., 2018**). Al mismo tiempo, se activa un mecanismo de reparación, los sistemas de reparación del ADN, determinan y precisan el daño generado por la exposición a contaminantes ambientales que son tóxicos, este mecanismo de reparación es la segunda línea de defensa frente a posibles agentes tóxicos (**Roco et al., 2018**).

El sistema de reparación es por NER (**Nucleotide Excision Repair**), que está constituido por un grupo de proteínas, se activa cuando se producen aductos por contaminantes ambientales. Los polimorfismos de las enzimas implicadas en el proceso de reparación, establecen su capacidad funcional, estas enzimas muestran una menor capacidad de reparación debido a la alta tasa de mutación generando un aumento de la tendencia a desarrollar procesos tumorales (**Roco et al., 2018**). La mayor exposición del ADN a sustancias tóxicas generara mutaciones e inestabilidad genética. El benceno, que es un componente de la gasolina, es considerado como carcinógeno por la Agencia Internacional para la investigación de Cáncer (IARC, 1989).

El 92 % de los cánceres se producen en el epitelio oral externo e interno. El epitelio bucal se constituye de 4 estratos que incluyen la capa de células basales, la capa de células espinosas, la capa intermedia y la superficial. El epitelio oral se conserva por un sistema de renovación celular continua, las nuevas células producidas por la mitosis en la capa basal tienden a

migrar a la superficie para sustituir a las que se desprendieron, la mucosa está constituida por poblaciones de células progenitoras y en maduración (**Butt *et al.*, 2017**).

Los micronúcleos son masas de cromatina condensada observando una aparición de pequeños fragmentos de cromosomas ya sean enteros o intactos, que surgen en la anafase de la mitosis, su existencia es resultado de aberraciones cromosómicas (**Butt *et al.*, 2017**) que puede ser determinada a través de la de micronúcleos y otras anormalidades, lo cual indica posible daño epitelial. La prueba de micronúcleos recibió la atención de varios investigadores por el hecho de que es un ensayo simple y sensible a corto plazo para la detección de genotóxicos ambientales (Zalacain *et al.*, 2005).

A través de una investigación realizada en Turquía se demostró que la asociación entre el trabajo en gasolineras y el hábito de fumar de los trabajadores, es causa de la aparición de micronúcleos en células de la mucosa oral (**Ozkul *et al.*, 1997**). Un resultado similar se obtuvo en India, donde también se encontró un valor elevado de células micronucleadas en trabajadores de estaciones de servicio, concluyendo que se produce daño citogenético en los trabajadores que se encuentran expuestos a gasolina (Sellappa *et al.*, 2010). Los investigadores de otro estudio realizado en Brasil concluyeron que la genotoxicidad se produce como consecuencia de la exposición a agentes tóxicos que proceden de factores naturales y ambientales y, los trabajadores de gasolineras están frecuentemente expuestos a los gases producidos por la combustión y a los humos generados por el combustible (Benites *et al.*, 2006).

Existen varios factores de riesgo que alteran las respuestas en todas las células, entre estos factores se encuentran los endógenos como ser la edad, el sexo y la estructura genética y por otro lado se encuentran los factores de riesgo exógenos, como los estilos de vida, todos estos factores inciden negativamente sobre la integridad del DNA (Benites *et al.*, 2006).

Por otro lado, existen varios estudios que describen la asociación entre el envejecimiento cronológico y la aneuploidía, es decir, la pérdida de cromosomas, tanto del cromosoma X como de los cromosomas somáticos, esta pérdida, producida por la edad, tiene relación con la mala segregación de cromosomas. Algunos estudios demostraron que la pérdida de cromosomas sexuales en linfocitos periféricos se produce por la edad. Los autosomas se pierden con la misma regularidad que los cromosomas sexuales, la pérdida de estos cromosomas podrían conducir a la muerte debido a que contiene genes necesarios para la

supervivencia celular. Los cromosomas y los fragmentos rezagados pueden generar un micronúcleo. (Benites *et al.*, 2006).

Se observó también, en un estudio en Turquía, que el consumo de cigarrillos está relacionado con una elevada frecuencia de anomalías nucleares que se manifiesta con células cariorréxicas, micronúcleos y kariólisis. Las nitrosaminas específicas del tabaco se cree que son las responsables de la inducción de micronúcleos y otras anomalías nucleares de modo que se considera que las nitrosaminas generan efectos mutagénicos y cancerígenos. La presencia de células binucleadas en trabajadores de estaciones de servicio también ha sido encontrada en trabajadores de estaciones de servicios que tienen el hábito de fumar. En esta población también se encontró una cantidad estadísticamente significativa de núcleos cariorréxicos (Ozkul *et al.*, 1997).

No es posible establecer si los varones o las mujeres son más afectados por los componentes de la gasolina, especialmente el benceno, debido a que los resultados de diferentes estudios son contradictorios; sin embargo, vale la pena mencionar que el incremento de anomalías nucleares en mujeres ha sido relacionado con la pérdida del cromosoma sexual X, debido a que las células femeninas son más sensibles a la acción de agentes genotóxicos. Aunque el aumento significativo de micronúcleos, células binucleadas y células cariorréxicas en varones expuestos a hidrocarburos a sido relacionado con el estilo de vida, especialmente por hábitos nocivos (Benites *et al.*, 2006). Entre los trabajadores de estaciones de servicio de la ciudad de El Alto se encontró mayor frecuencia de anomalías nucleares en varones ( $P=0,026$ ); por el contrario, en las mujeres no se obtuvo resultados significativos con células cariorréxicas y micronúcleos.

Las mujeres tienden a tener mayor coeficiente de partición sangre/aire y en promedio tienen un mayor aumento de grasa corporal en comparación con los hombres, por lo cual las mujeres tienden a metabolizar el benceno de manera más rápida que los varones, entre un 23 a 26% más de benceno, cuando están sometidas a los mismos niveles de exposición. Debido a que el benceno ejerce sus efectos tóxicos al biotransformarse, representa un riesgo mayor para las mujeres (Santana Castro *et al.*, 2020).

Los hábitos nocivos como el tabaquismo pueden influir y contribuir a un efecto tóxico afectando también a los inhaladores pasivos. Se ha aislado más de 50 hidrocarburos aromáticos cíclicos de los cigarrillos los cuales son muy agresivos para el ser humano ya que

pueden provocar cáncer y producir alteraciones de la respuesta inmune. Entre estos compuestos están el benceno, pireno, benzopireno, tolueno, xileno, estireno, y nitrosaminas (De Celis *et al.*, 2006).

El incremento de los diversos tipos de cáncer incide en la longevidad de la población, y es consecuencia de la agresividad del medio ambiente, el estilo de vida, el abuso en el consumo de bebidas alcohólicas, consumo de tabaco y otros.

En las gráficas 13 y 14 de los resultados del presente trabajo, se demostró que a mayor edad existe mayor riesgo de desarrollar mayor cantidad de micronúcleos y otras anomalías nucleares. En el grupo etario de 48 a 58 años se observó mayor cantidad de anomalías nucleares que pueden ser atribuidas a la acumulación de mutaciones, los hábitos de vida y, sobre todo, a las condiciones laborales.

Se conoce que los trabajadores de servicio tienen jornadas laborales extensas, en las cuales están en constante exposición a la gasolina, ya sea por inhalación o contacto directo sin ninguna protección, lo cual da lugar al desarrollo de enfermedades que inicialmente son silenciosas y con el tiempo se manifiestan con patología como el cáncer (Poveda Paredes & Chavez Diaz, 2016).

En el presente trabajo de investigación, en las gráficas 15 y 16, se puede observar que los trabajadores se inician en esta actividad, por lo general, desde jóvenes y tienen contacto e inhalan la gasolina y sus derivados exponiendo sus células que posteriormente generan anomalías nucleares.

Los trabajadores de las estaciones de servicio de la ciudad de El Alto realizan su trabajo en horario continuo, lo cual es causa de la aparición de micronúcleos ( $p = 0,00$ ), ( $p = 0,031$ ). También se ha asociado la frecuencia de cariorrexis con algunos síntomas como dolor de cabeza, náuseas y mareos en el sexo femenino, en los varones no se observó lo mismo, pero se encontró 10 voluntarios que sufren de resfríos constantes. Cabe mencionar que en la visita para la toma de muestra se pudo observar que los voluntarios no tienen ninguna medida de bioseguridad para proteger su salud y evitar enfermedades posteriores y que, además, no mantienen una buena alimentación.

A través de la encuesta también se determinó que varios trabajadores fuman y consumen bebidas alcohólicas y es por ello que tanto los componentes de la gasolina como el cigarrillo



y el alcohol, están generando ciertas anomalías nucleares, que, a larga, pueden tener graves consecuencias.

### *Allium cepa*

Los Biomarcadores son muy utilizados actualmente para ver el daño que ocasionan ciertas sustancias tóxicas, una de ellas que tiene una alta sensibilidad es *Allium cepa*, que se utilizó en el presente estudio para observar el daño que generan los componentes de la gasolina, entre ellos, los metales pesados, estos elementos pueden interferir en el crecimiento de los ápices, porque, al ser la cebolla un biomarcador muy sensible, asimila con facilidad sustancias tóxicas, las cuales interfieren en la división celular y generan un elevado índice de alteraciones nucleares, es por ello que se considera un biomarcador citotóxico y genotóxico (Berrocal Huallpa, 2012).

**En la república de Brasil Geremías *et al* (2011) analizaron la bioacumulación y los efectos adversos de trazas de metales e hidrocarburos en *Allium cepa*, obteniendo como resultado un daño a su división y la producción de anomalías nucleares.**

**En la gráfica 17 del presente trabajo se muestra el resultado del tratamiento de raíces de *Allium cepa* con agua que fue mezclada con suelo procedente de estaciones de servicio y, por tanto, que contenía componentes de hidrocarburos. Aunque los resultados no son estadísticamente significativos, en las gráficas se observa disminución del porcentaje de cada una de las fases mitóticas de las cebollas que fueron tratadas con el agua contaminada en relación al control, lo cual puede ser atribuido a los metales pesados que existen en la gasolina: manganeso, mercurio, cadmio. El cadmio ocasiona un efecto citotóxico en meristemos radiculares de *Allium cepa* por lo cual se considera como un peligro para la salud humana cuando es consumido en vegetales que fueron cultivados en lugares contaminados.**

**El efecto que genera el cadmio se evidencia por la presencia de anomalías celulares: alteración de la morfología, vacuolización, dilatación de membranas celulares, laseudolobulación del núcleo, condensación de la cromatina y la presencia de núcleos colapsados, lo cual genera una necrosis celular a medida que aumenta la concentración y el tiempo de exposición (Marcano *et al.*, 2001). En la presente tesis no se observaron**

estas alteraciones, aunque eventualmente se pudo ver alguna alteración de la morfología nuclear de células interfásicas.

La fitotoxicidad ocasionada por el zinc y el cadmio genera disminución en la velocidad del crecimiento de las raíces del bulbo, y muestran que el cadmio es muy tóxico en comparación con el zinc. La genotoxicidad tanto del zinc como del cadmio generan puentes ana-telofase, pero no roturas. El cadmio produce aglutinación entre cromosomas metafásicos y afecta su estructura (Borboa Cuetos, 1995).

La acción de los agentes genotóxicos da lugar a transformaciones en el ADN ocasionando mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas visibles, entre estos agentes, el cadmio genera alteraciones en el índice mitótico, bloquea el crecimiento y produce aberraciones cromosómicas, las cuales son marcadores biológicos para la detección de sustancias mutagénicas y carcinogénicas (Vera Ospina, 2009)

El manganeso produce inhibición y reducción en la longitud de la raíz de *Allium cepa*, lo cual puede explicarse probablemente por mecanismos relacionados con el funcionamiento de la membrana plasmática, además también produce aberraciones cromosómicas y alteración del índice mitótico, asimismo aumenta el estrés oxidativo y la genotoxicidad ocasionando una toxicidad subcrónica (Da Silva Souza, 2010).

El mercurio también genera alteraciones cromosómicas en las raíces de la *Allium cepa*, la exposición a este metal juntamente con el cromo, especialmente en metafase y anafase del ciclo celular, puede llegar a inducir puentes cromosómicos, cromosomas aislados y fragmentos cromosómicos. Se debe tener en cuenta que las células vegetales tienen un mecanismo para defenderse de la agresión de metales pesados, pero la bioacumulación de estos elementos puede generar daño en el ADN del vegetal (Vera Ospina, 2009).

Los metales como el mercurio, plomo y Arsenio son directamente venenos mitóticos de gran efectividad conocidos como “turbagenos”. En ciertas concentraciones, tienen afinidad por los grupos tioles, razón por la cual son causantes de distintos tipos de alteraciones del huso acromático. Los efectos clastrogénicos dependen de la liberación de cationes que afectan al número de aberraciones ocasionadas. El daño por efecto de las sales metálicas está relacionado, de manera directa, con la dosis y la duración de la exposición de *Allium cepa*. Las plantas tienen a recuperarse cuando ya no se encuentren en concentraciones elevadas (Patra *et al.*, 2004).

En la gráfica 18 se pueden ver los porcentajes de fases de la mitosis, inducidas por la exposición a agua contaminada con suelo de estaciones de servicio (obtenida de distancias diferentes a partir de los surtidores). Estos valores resultaron del promedio de las cuatro estaciones de servicio incluidas en el presente estudio. La profase, anafase y telofase son las fases en las que se encontraron porcentajes inferiores en las muestras tratadas con agua contaminada, en relación al control negativo. Por otro lado, se obtuvieron más células metafásicas que el control negativo; sin embargo, vale la pena aclarar que el análisis estadístico no fue significativo (profase  $p = 0.532$ , metafase  $p = 0.534$ ). Algunos investigadores observaron que las células de *Allium cepa*, cuando están expuestas a sustancias tóxicas, sufren un proceso de envenenamiento, cuando estas células ingresan a etapa de división se detienen en profase, metafase y anafase, en estas fases se produce interferencia del crecimiento debido a que cuando un bulbo de *Allium cepa* tiende a rehidratarse, provoca un crecimiento de células del meristemo radicular, dando paso a la elongación de las raíces del bulbo, pero cuando la hidratación procede de aguas contaminadas, la división celular de los meristemos radiculares se reduce, lo cual retarda la mitosis o bien genera destrucción de las células. Las aguas contaminadas con sustancias tóxicas ocasionan alteraciones en el crecimiento normal de la raíz, probablemente debido a la inhibición de la síntesis de proteínas (Kim & Bendixen, 1987).

La inhibición mitótica puede ser ocasionada también por la inhibición de la síntesis de ADN, el cual es un paso fundamental para la división celular. En cambio, la baja información del nivel de ATP en la célula es otro factor de inhibición de la síntesis de ADN y ARN en plantas expuestas a biocidas. Por otro lado, la exposición a sustancias citotóxicas puede generar en las células un efecto sobre la función básica que ejerce esta enzima como la producción, la inducción, la represión, siendo una de las posibles responsables de la disminución del índice mitótico (Berrocal Huallpa, 2012)

En un estudio de toxicidad de hidrocarburos mediante bioensayos usando el test de *Allium* se obtuvo una alta sensibilidad debido a que la exposición a los hidrocarburos afectó a la división celular debido a lo cual se consideró que el *Allium cepa* es una especie muy susceptible a extracto contaminado. (Huertas Aponte, 2018).

### **Test de Eisenia Foetida**

*Eisenia Foetida* es utilizada como un biomarcador muy sensible a componentes tóxicos, debido a que las lombrices utilizan el mecanismo de bioacumulación de metales pesados y acumulan elevadas concentraciones. Tienen, además, la capacidad de descomponer las sustancias tóxicas y utilizarlas como fuente de energía, pero, en el proceso se produce cierto daño en sus células generando anormalidades nucleares. (Hernández *et al.*, 2016).

En un estudio se pudo ver que ciertos componentes del medio ambiente como son los pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) interfieren en el metabolismo celular de *Eisenia Foetida*, ocasionado especies reactivas de oxígeno (ROS) que dan lugar a la activación del sistema de defensa antioxidante y, como resultado, producen daño a el ADN (Li *et al.*, 2020). Los componentes de la gasolina pueden afectar de cierta forma a *Eisenia Foetida*, uno de sus componentes, el tolueno, tiene una actividad genotóxica muy intensa, ya que ocasiona daño en el ADN de *Eisenia Foetida*, además que es absorbido con facilidad en comparación con otros componentes como son el etilbenceno y xileno (Liu *et al.*, 2010).

Los hidrocarburos provocan deshidratación de *Eisenia Foetida*, así como degradación de sus membranas celulares por degradación oxidativa de los lípidos, generando pérdida de peso. El estrés producido por los hidrocarburos de petróleo producen daño en el ADN, lo cual puede ser observado microscópicamente como anormalidades celulares (Hentati *et al.*, 2013).

En la gráfica 20 se puede observar que, la muestra de suelo tiene más efecto tóxico cuando se encuentra más cerca del dispensador de gasolina, esto se ha demostrado por el aumento significativo de alteraciones nucleares, especialmente cariorrexis, en las células de las lombrices de tierra, aunque también se ha encontrado células binucleadas y micronúcleos, lo cual afecta en el crecimiento y reproducción.

#### **Test *Lactuca sativa*.**

Se utiliza el test de *Lactuca sativa* como un biomarcador ya que se vio que es muy sensible a compuestos tóxicos, lo que se manifiesta en la inhibición del crecimiento radicular e inhibición de la elongación de su radícula. La exposición de esta especie a sustancias tóxicas como hipoclorito de sodio, perjudica el crecimiento y evita el desarrollo del hipocótilo (Manrique *et al.*, 2011). Por otro lado, también se observó que la exposición de *Lactuca sativa* a diferentes concentraciones de tóxicos producen la disminución del tamaño de la raíz en 10 días, a los 20 días se ve que existe cierto estímulo de crecimiento aun estando expuesta

a cierta concentración de sustancias tóxicas y a los 30 días se produce una adaptación al tóxico (Moreno Mendez, 2013)

El índice de crecimiento se considera como un indicador para determinar el potencial fitotóxico de un material orgánico, ya que integra el porcentaje de germinación relativa y el crecimiento relativo de la raíces. Se debe tomar en cuenta que los primeros días de germinación de la plántula, son días muy sensibles ya que asimilan con facilidad los componentes tóxicos y factores externos. Algunas variedades de *Lactuca sativa* tienen mayor capacidad de aguantar elevadas concentraciones de químicos orgánicos sin demostrar daños notorios, en su mayoría, los análisis ecotoxicológicos son aconsejables para estimar un riesgo ecológico o ambiental (Pentreath *et al.*, 2015).

En el presente trabajo, al ser expuestas las semillas de lechuga a los tóxicos procedentes del suelo contaminado de estaciones de servicio, no se produjo crecimiento de las radículas a los 10 días, pero a los 20 y 30 días las plántulas ingresaron en una etapa de adaptación que puede verse con el crecimiento de las raíces, aunque no alcanzaron el tamaño de las raíces de las plántulas que fueron tratadas con agua pura.

El derrame de hidrocarburos puede ser perjudicial para los suelos ya que genera un daño relevante en los seres vivos que los habitan. Existe interacción de los organismos vivos con metales pesados y otros elementos, esta interacción está relacionada con la concentración y el tiempo, a mayor exposición mayor es el daño (Zamora *et al.*, 2012).

## **9. CONCLUSIÓN**

- Según los resultados obtenidos, la gasolina no ejerce efecto genotóxico significativo en los trabajadores de estaciones de servicio y en el entorno circundante, debido al bajo número de anomalías nucleares y cromosómicas encontradas. A pesar de que ha sido demostrado reiteradamente el efecto tóxico de los componentes de la gasolina, probablemente los resultados del presente trabajo se deban a las condiciones atmosféricas del entorno de trabajo de las gasolineras: espacio abierto, vientos frecuentes. El alto número de cariorrexis se puede explicar por el contacto directo con la piel del ser humano y el tegumento de las lombrices, de igual forma, el contacto

del agua contaminada, con las semillas de lechuga produjo la inhibición temporal de la germinación y crecimiento radicular.

- El análisis de células de la mucosa oral de los trabajadores de estaciones de servicio reveló un gran número de células con núcleos cariorréxicos, pero fueron bajas las frecuencias de micronúcleos, kariólisis, células binucleadas, núcleos lobulados y núcleos picnóticos, aunque el número fue más alto que el encontrado, en cada caso, en el grupo control.
- A través de la correlación de una encuesta en la que se determinó algunos factores personales, con los resultados del análisis de células de la mucosa oral, se estableció cierta tendencia al aumento de anormalidades nucleares en los trabajadores que fuman, que están expuestos a los vapores de la gasolina por tiempos prolongados y las personas que son de mayor edad. En los dos primeros casos, el aumento de anormalidades nucleares se explica por efecto de la mayor exposición a genotóxicos y citotóxicos; mientras que, en relación a la edad, se produce acumulación de mutaciones las cuales se manifiestan con anormalidades nucleares, pero también, pueden ser el prelude de enfermedades por daño en el ADN.
- *Allium cepa* y *Lactuca sativa* son especies vegetales muy sensibles a los tóxicos ambientales. En *Allium cepa* expuesta a aguas contaminadas por suelo de estaciones de servicio se vio una inhibición de las fases mitóticas, los ápices presentaron ciertas fases de división como metafase, anafase y profase deteniéndose su mitosis; en cambio en *Lactuca sativa*, el agua contaminada con derivados del petróleo procedentes del suelo contaminado, afectó el índice relativo de germinación y crecimiento radicular, aunque, como menciona la bibliografía, con más de 10 días, también se pudo observar que la planta se acostumbra a las condiciones tóxicas y la raíz desarrolla.
- En *Eisenia fetida* se pudo observar gran cantidad de células cariorréxicas en los celomocitos y, aunque también se encontraron otras anormalidades nucleares y alteraciones citoplasmáticas, estos últimos resultados no fueron significativos, lo cual puede ser debido tiempo de exposición o a una adaptación de las lombrices al medio tóxico.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aécio Maciel, L., Brelaz Feitosa, S., Sena Trolly, T., & Luciano Sousa, A. (2019). Genotoxic effects of occupational exposure among gas station attendants in Santarem, Para, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Do Trabalho*, 17(2), 247–253.

Aguilar De Prada, S. S. (2019). Análisis de la frecuencia de micronúcleos linfocíticos de agentes de la Agencia Metropolitana de Tránsito en relación con la polución del aire, sector la Delicia – Quito, Ecuador. In *ResearchGate* (Vol. 45, Issue 45).  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17826.76487>

Álvarez Borrero, S. R., & Jaramillo Chamba, T. R. (2016). *Eficiencia y rendimiento del*

*combustible gas natural comprimido en un motor a inyección didáctico.*

<http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/6858>

- Anyanwu, I., & Semple, K. (2016). Effects of phenanthrene and its nitrogen-heterocyclic analogues aged in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology*, *105*, 151–159.
- Balseiro-Romero, M., & Monterroso, C. (2014). Phytotoxicity of fuel to crop plants: influence of soil properties, fuel type, and plant tolerance. *Toxicological and Environmental Chemistry*, *96*(8), 1162–1173.
- Bamgbose, I., & Anderson, T. (2015). Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and Diesel fuel to alfalfa (*Medicago sativa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *122*, 268–274.
- Bamgbose, I., & Anderson, T. (2020). Ecotoxicity of three plant-based biodiesels and diesel using, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, *260*, 113965.
- Banks, M. K., & Schultz, K. E. (2005). Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum- contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, *167*, 211–219.
- Banks, M. K., Schwab, P., Liu, B., Kulakow, P. A., Smith, J. S., & Kim, R. (2003). The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil: a field assessment. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *78*, 75–96.
- Baquerizo, Escobar, M. J., & Guaman Chisaguano, D. B. (2018). *Alergias Respiratorias Y Contaminacion Ambiental*.  
[http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/4134/1/Alergias Respiratorias y su relacion con la contaminacion ambiental.pdf](http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/4134/1/Alergias%20Respiratorias%20y%20su%20relacion%20con%20la%20contaminacion%20ambiental.pdf)
- Benites, C. I., Amado, L. L., Vianna, R. A. P., & Martino-Roth, M. da G. (2006). Micronucleus test on gas station attendants. *Genetics and Molecular Research : GMR*, *5*(1), 45–54.



- Berrocal Huallpa, A. M. (2012). *Genotoxicidad e inestabilidad genética producida por la exposición de Allium cepa a biocidas*.
- Borboa Cuetos, A. L. (1995). “Ensayos de toxicidad en células meristemáticas de “allium cepa” l. efectos de zinc y cadmio.” In *Dialnet*.
- Boluda, C. J., Macías, M., & González Marrero, J. (2019). La complejidad química de las gasolinas de automoción. *Ciencia, Ingenierías y Aplicaciones*, 2(2), 51–79.
- Butt, F., Cheema, K., Nisar, N., & Qureshi, J. (2017). Cytogenetic bio-monitoring in fuel station attendants of Gujrat, Pakistan through buccal micronucleus cytome assay. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(7), 1039–1044.
- Cacoango Vacacela, W. M., & Guamán Mocha, J. R. (2016). De Que Manera Influyen Los Gases Tóxicos Emanados Por Los Motores a Diésel De Los Buses Que Transitan Por El Cantón Colta En La Salud De Los Habitantes En El Año 2013-2014. In *Universidad Nacional de Chimborazo*.
- Caritá, R., & Marin-Morales, M. A. (2008). Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72(5), 722–725.
- Castro, R., Ramírez, V., & Cuenca, P. (2004). Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 611–621.
- Çelik, A., Çavaş, T., & Ergene-Gözükar, S. (2003). Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: Micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*, 18(5), 417–421.
- Celis Huaiquilaf, B. (2009). Contaminación de aguas subterráneas por hidrocarburos líquidos livianos en fase no acuosa. *Ciencia,,Ahora*, 22(11), 20–29.
- Cortés Del Pino, A. (2014). *Tesis Proceso de refino del petróleo para la obtención de combustibles marinos*.

- Cruz, J., Tamada, I., Lopes, P., & Montagnolli, R. (2014). Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(5), 1962.
- Da Silva Souza, T. (2010). *Análise da toxicidade e da mutagenicidade de um solo de landfarming, proveniente de uma refinaria de petróleo, antes e depois de processos que visam estimular a biodegradação de hidrocarbonetos TATIANAc.*
- De Celis, R., Morgan, G., Bravo, A., & Feria, A. (2006). Cancer de mamá y exposición a hidrocarburos aromáticos. *E-Gnosis*, 4(1665–5745), 9.
- Di Pelino, A., Vianco, G., Iglesias, F., Katz, P., & Daniele, M. (2002). *Informe sobre la situación actual del gas licuado de petróleo.*  
[http://www.iae.org.ar/seminarios/semiglp\\_informeIAE.pdf](http://www.iae.org.ar/seminarios/semiglp_informeIAE.pdf)
- Drumm, F. C., Gerhardt, A. E., Fernandes, G. D., Chagas, P., Sucolotti, M. S., & Da Cunha Kemerich, P. D. (2014). Poluição Atmosférica Proveniente Da Queima De Combustíveis Derivados Do Petróleo Em Veículos Automotores. *Revista Eletrônica Em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 18(1), 66–78.
- Encalada Cajisaca, F. R., & Ñauta Uzhca, P. G. (2010). Tesis Incidencia del Tipo de Gasolinas, Aditivos y Equipos Optimizadores de Combustible Comercializados en la Ciudad de Cuenca, sobre las Emisiones Contaminantes Emitidas al Aire. In *Incidencia del Tipo de Gasolinas, Aditivos y Equipos Optimizadores de Combustible Comercializados en la Ciudad de Cuenca, sobre las Emisiones Contaminantes Emitidas al Aire.*
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., & Bonassi, S. (1999). The HUman MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1–2), 271–283.

[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00053-8)

Flores-garcía, A., Ruiz-bernés, S., Aguiar-garcía, P., Benítez-guerrero, V., Valle-Solís, M. O., Molina-noyola, L. D., & Torres-bugarín, O. (2018). Micronúcleos y anormalidades nucleares en células de la mucosa bucal de mujeres mexicanas con factores de riesgo para cáncer cervicouterino : estudio piloto. *El Residente*, 13(2), 56–61.

García Zarate, M. A. (2013). *Estudio exploratorio para el manejo de riesgo en salud laboral por exposición COVs en estaciones de servicio en la zona urbana de Ensenada Baja California* (Vol. 1).

Global cancer observatory. (2022). *Cancer Today*. International Agency For Research on Cancer. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0)

Gonzales Bellido, J. F. (2018). *Tesis Estudio De La Contaminación De Suelos Por Residuos De Hidrocarburos Y Propuesta De Manejo Ambiental De Los Talleres De Mecanica Automotriz Del Distrito De San Jerónimo-Cusco*.

González Martínez, A. C., & Solano Mora, E. (2013). *Micronúcleos en mucosa oral en individuos con aparatología ortodóncica en la Universidad de Cartagena*.

Gonzalez Torres, H. J., Alberto Moreno, R., & Quintana Sosa, M. (2015). Efecto genotóxico de las mezclas complejas de hidrocarburos en trabajadores de estaciones de servicio de gasolina. *Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 31(1), 91–100. <https://doi.org/10.14482/sun.31.1.7141>

Gowdappa Doddawad, V., Ayas, M., & Gurupadayya, B. M. (2019). Occupational exposure to petroleum workers by assessing urinary methyl hippuric acid and micronuclei in oral mucosa cell. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 10(12), 272–277.

- Hayashi, S. ichi, Watanabe, J., & Kawajiri, K. (1991). Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *Journal of Biochemistry*, 110(4), 559–565.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123619>
- Hentati, O., Lachhab, R., Ayadi, M., & Ksibi, M. (2013). Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 2989–2998.
- Hernández, J., Zapata-Vívenes, E., Marcano, L., Marcano, E., & Nusetti, O. (2016). Respuestas bioquímicas en la lombriz de tierra *Eisenia andrei* expuesta a cadmio. *Saber*, 28(3), 536–545.
- Hoshina, M., & Marin-Morales, M. (2009). Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(8), 2090–2095.
- Huertas Aponte, E. (2018). *VII Congreso de Residuos Sólidos en el Perú*.
- Kirsch Volders, M., & Fenech, M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16(1), 51–58. <https://doi.org/10.1093/mutage/16.1.51>
- Kim, J. C., & Bendixen, L. E. (1987). Effects of Haloxyfop and CGA-82725 on Cell Cycle and Cell Division of Oat (*Avena sativa*) Root Tips. *Weed Science*, 35(6), 769–774.  
<https://doi.org/10.1017/s0043174500079315>
- La tasa del padecimiento de cáncer aumenta en Bolivia*. (2018). Edicion Medica.
- Lesser, J. M., & Saval, S. (2001). *Principales Hidrocarburos Contaminantes De Suelos Y Acuíferos - Identificacion Y Caracteristicas* (pp. 1–11).
- Li, Y., Wang, X., & Sun, Z. (2020). Ecotoxicological effects of petroleum-contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122384.

- Liu, Y., Zhou, Q., Xie, X., Lin, D., & Dong, L. (2010). Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology*, *19*(8), 1551–1559.
- Lopez Chalarca, L. (2013). *Activación de carbones para aplicación en almacenamiento de gas natural vehicular (metano) Lilliana trin* (Vol. 1).
- Manrique, R. R., Marlyn Catalina, O. V., & Quesada, D. R. (2011). Pruebas de ecotoxicidad para establecer el potencial genotóxico del hipoclorito de sodio, mediante bulbos de cebolla *Allium cepa* L y semillas de lechuga *Lactuca sativa* L como bioindicadores. *Iteckne*, *8*(1), 7–14.
- Martinez Fernández, D. F. (2006). Gestión para la implementación de un programa de mantenimiento preventivo en instalaciones de GLP (Gas licuado de petróleo). In *Universidad Autónoma de Occidente*.
- Martinkosky, L., Barkley, J., Sabadell, G., Gough, H., & Davidson, S. (2017). Earthworms (*Eisenia fetida*) demonstrate potential for use in soil bioremediation by increasing the degradation rates of heavy crude oil hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, *580*, 734–743.
- Marcano, L., Carruyo, I., & Montiel, X. (2001). Alteraciones citológicas inducidas por el cadmio en células meristemáticas de raíces de cebolla (*Allium cepa* L). *Facultad de Agronomía*, *18*(0261), 247–257.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos . Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *39*(1), 27–36.
- Mazzeo Christofolletti, D. (2009). Tesis Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do BTEX, utilizando o sistema teste de *Allium cepa*. In *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências-Rio Claro*.
- Mazzeo, D., Fernandes, T., & Marin-Morales, M. (2011). Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process.

*Chemosphere*, 85(1), 13–18.

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales de España. NPT486: Evaluación de exposición ambiental a benceno, control ambiental y biológico, sf.

Morais Leme, D., de Franceschi de Angelis, D., & Marin-Morales, M. A. (2008). Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 214–219.

Moreno Mendez, M. T. (2013). *Acumulación de plomo en Lactuca sativa expuesta a diferentes tiempos y concentraciones de acetato de plomo en condiciones de laboratorio.*

Munawar, I., Mazhar, A., Jan, N., Arif, N., & Ahmad Zaman, Q. (2019). Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. *Chemistry International*, 5(1), 1–80.

Neuhauser, E. F., Loehr, R. C., Milligan, D. L., & Malecki, M. R. (1985). Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, 3(1), 149–152.

Núñez, J. C., Hernández, C., Jiménez Jemio, J., & Gómez, W. (2012). El Abc del petróleo y gas. *Fundación de Jubileo*, 54.

Oliveira-Martins, C., & Grisolia, C. (2009). Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. *Genetics and Molecular Biology*, 32(4), 853–856.

Ordóñez León, L. M. (2013). *Identificación De Alteraciones Hematológicas Por Exposición a Benceno, En Los Despachadores De Dos Estaciones De Servicio De Gasolina En Quito.*

Ortiz Caicedo, D. E. (2021). *Exposición a benceno, xileno, tolueno y efectos en la función hepática en trabajadores de estaciones de servicio de combustible de Esmeraldas en Petroecuador.*

Ozkul, Y., Donmez, H., Erenmemisoglu, A., Demirtas, H., & Imamoglu, N. (1997). Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual

- users. *Mutagenesis*, 12(4), 285–287.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., & Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.009>
- P, A., Smitha, S., Masilamani, S., Akshatha, C., & Naveen Kumar, B. (2017). Evaluation of Micronucleus in Exfoliated Buccal Epithelial Cells Using Liquid-based Cytology Preparation in Petrol Station Workers. *Indian J Med Paediatr Oncol.*, 38(3), 273–276.
- Pentreath, V., González, E., Jarquin Orozco, W., Maris Sacco, N., & Perales, S. (2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Revista de Salud Ambiental*, 15(15), 13–20.
- Poveda Paredes, A. I., & Chavez Diaz, D. P. (2016). “Valoración del sistema inmune y hematológico en trabajadores expuestos a componentes de la gasolina en estaciones de servicio de combustible de la ciudad de Quito, 2016.” In *Pontificia Universidad Católica del Ecuador escuela de bioanálisis*.
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2017). Ecotoxicity of measured concentrations of soil-applied diesel: Effects on earthworm survival, dehydrogenase, urease and nitrification activities. *Applied Soil Ecology*, 119, 1–7.
- Rey-Henao, L. M., Vargas-Rivera, J.-A., Vergara-Escudero, E., & Londoño-Velasco, E. (2020). Efecto genotóxico de la exposición ocupacional a insecticidas organofosforados y piretroides, evaluado por la prueba de micronúcleos: Revisión de la literatura. *Revisión de La Literatura. Saltem Scientia Spiritus*, 6(1), 40–48.
- Roco, Á., Cerda, B., Cayún, J. P., Lavanderos, A., Rubilar, J. C., Cerro, R., Acevedo, C., Cáceres, D., Varela, N., & Quiñones, L. A. (2018). Farmacogenética, tabaco, alcohol y su efecto sobre el riesgo de desarrollar cáncer. *Revista Chilena de Pediatría*, 89(4), 432–440.
- Rodríguez Martínez, N. (2019). *Gasolinas. Reflexiones Y Comentarios Relativos a Su*

*Calidad.*

- Rodríguez Romero, A. J., Robles Salazar, C. A., Ruiz Picos, R. A., López López, E., Sedeño Díaz, J. E., & Rodríguez Durantes, A. (2014). Índices De Germinación Y Elongación Radical De Lactuca Sativa en el Biomonitoreo de la calidad del agua del río Chalma. *Revista Internacional de Contaminación Del Ambiente*, 30(3), 307–316.
- Romero Gómez, J. C., & Prieto Zapata, F. A. (2014). Determinación de la concentración de inhibición media (CE50) de vanadio y calcio para la semilla Lactuca sativa mediante ensayos de toxicidad. In *Universidad de la Salle Ciencia Unisalle*.
- Shaikh, A., Barot, D., & Chandel, D. (2018). Genotoxic effects of exposure to gasoline fumes on petrol pump workers. *International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 9(2), 79–87. <https://doi.org/10.15171/ijoem.2018.1159>.
- Santana Castro, M., Torrens Perez, M. H., Santana Castro, L. A., & García Delgado, E. (2020). Enfermedades Ocupacionales por Exposición a Benceno en trabajadores de Gasolineras. *Revista San Gregorio*, 40(0), 157–175.
- Sellappa, S., Sadhanandhan, B., Francis, A., & Vasudevan, G. S. (2010). Evaluation of genotoxicity in petrol station workers in south India using micronucleus assay. *Industrial Health*, 48(6), 852–856.
- Shin, K. H., Jung, H., Chang, P., Choi, H., & Kim, K. W. (2005). Earthworm toxicity during chemical oxidation of diesel-contaminated sand. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(8), 1924–1929.
- Silva, F. L. D. N., Dos Santos, J. R., Moita Neto, J. M., Da Silva, R. L. G. D. N. P., Flumignan, D. L., & De Oliveira, J. E. (2009). Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. *Química Nova*, 32(1), 56–60.
- Silva Leal, V. (2014). *Estudio y evaluación del comportamiento energético del motor de un conjunto motogenerador operando con Gas Licuado de Petróleo (GLP) de alto butano.*



- Singh, W. R., & Kalamdhad, A. S. (2016). Transformation of nutrients and heavy metals during vermicomposting of the invasive green weed *Salvinia natans* using *Eisenia fetida*. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 5(3), 205–220.
- Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In *Imta*.
- Song, B., Zeng, G., Gong, J., Liang, J., Xu, P., Liu, Z., Zhang, Y., Zhang, C., Cheng, M., Liu, Y., Ye, S., Yi, H., & Ren, X. (2017). Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. *Environment International*, 105(May), 43–55.
- Speit, G., Hanelt, S., Helbig, R., Seidel, A., & Hartmann, A. (1996). Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicology Letters*, 88(1–3), 91–98.
- Tamada, I., Montagnolli, R., Lopes, P., & Bidoia, E. (2012). Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1576–1581.
- Triana, B. E. G., Bernabeu, A. S., & García, L. S. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 12(2), 187–196.
- Torres-Bugarín, O., & Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650–657. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022013000200050>
- Torres-bugarín, O., Zavala-cerna, M. G., Macriz-romero, N., Flores-garcía, A., & Ramos-ibarra, M. L. (2013). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente*, 8(1), 4–11.

- Torres Bugarín, O., & Carillo Gómez, Catherine Scarlett Armijo Gómez, J. A. (2019). *Evaluación de genotóxicos ambientales mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica Olivia* (Issue September).
- Torres, C. H., Varona, M. E., Lancheros, A., Patiño, R. I., & Groot, H. (2008). Evaluación del daño en el ADN y vigilancia biológica de la exposición laboral a solventes orgánicos, 2006. *Biomédica*, 28(1), 126.
- Urteaga, O., & Lallana, V. (2005). Optimización De Una Técnica De Tinción Para Determinación De Efectos Citogenéticos En Ápices Radicales De *Allium Cepa*. *Revista Científica Agropecuaria*, 9(1), 63–70.
- Valdespino-Gómez, V. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2010). Alteraciones celulares y moleculares no clásicas en el desarrollo del cáncer. *Gaceta Medica de Mexico*, 146(3), 185–198.
- Van Damme, K., Casteleyn, L., Heseltine, E., Sorsa, M., Van Larebeke, N., & Vineis, P. (1995). Individual susceptibility and prevention of occupational diseases: Scientific and Ethical Issues. *Joem*, 37(1), 91–99.
- Vera Ospina, A. P. (2009). *Evaluación del efecto protector del aceite esencial de Lippia alba sobre la toxicidad del mercurocromo en raice de Allium cepa*.
- Vogeley, C., Esser, C., Tüting, T., Krutmann, J., & Haarmann-Stemmann, T. (2019). Role of the aryl hydrocarbon receptor in environmentally induced skin aging and skin carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23).
- Wei, Y., Han, I. K., Hu, M., Shao, M., Zhang, J. J., & Tang, X. (2010). Personal exposure to particulate PAHs and anthraquinone and oxidative DNA damages in humans. *Chemosphere*, 81(10), 1280–1285.
- World Health Organization- Who. (2018). *Cancer. World Cancer Day 2018. Recuperado el 12 de noviembre de 2018*. World Cancer.
- Xiong, F., Li, Q., Zhou, B., Huang, J., Liang, G., Zhang, L., Ma, S., Qing, L., Liang, L., Su, J., Peng, X., Li, Q., & Zou, Y. (2016). Oxidative stress and genotoxicity of long-term

- occupational exposure to low levels of BTEX in gas station workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(12), 1–9.
- Yardley-Jones, A., Anderson, D., & Parke, D. V. (1991). The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assessment. *British Journal of Industrial Medicine*, 48(7), 437–444.
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *SciELO Analytics*, 24(1), 5–12.
- Zalacain, M., Sierrasesúмага, 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.
- Zárate, Y. A. (2014). *Evaluación del impacto de la contaminación con diésel en las propiedades mecánicas de un suelo arcilloso*.
- Zubizarreta Solá, A., Martínez Menéndez, J., Rivas Pérez, P., Gómez Iglesias, S., & Sanz Borrás, A. (2018). Revisión de la literatura sobre efectos nocivos de la exposición laboral a hidrocarburos en trabajadores en ambiente externo. *Medicina y Seguridad Del Trabajo*, 64(252), 271–294.
- Zuluaga Quintero, M., Valencia Ruiz, A. M., & Ortiz Trujillo, I. C. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina Upb*, 28(1), 33–41.

# ANEXOS

## ANEXO N° 1 . Encuesta

### ENCUESTA

#### Evaluación del efecto genotóxico de la gasolina, diésel y gas en expendedores de estaciones de servicio y en el medio ambiente circundante

Código: \_\_\_\_\_

Apellido Paterno: \_\_\_\_\_ Apellido Materno: \_\_\_\_\_

Nombre(s): \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: Masculino  Femenino

Teléfono: \_\_\_\_\_ Localización de la gasolinera: \_\_\_\_\_

¿Hace cuánto tiempo trabaja en la gasolinera?

3 meses  6 meses  1 año  más de 1 año

¿Cuántas horas trabaja por día en la gasolinera?

1 a 4 horas  5 a 8 horas  más de 8 horas

¿Cuántos días a la semana trabaja en la gasolinera?

1 a 3 días  4 a 5 días  más de 5 días

¿Siente algún malestar al trabajar?

Dolor de cabeza  Náuseas  Mareos  Visión borrosa

Otros: \_\_\_\_\_

¿Padece alguna enfermedad crónica? Sí  No

Si la respuesta es si, diga cuál \_\_\_\_\_

¿Recibe tratamiento antineoplásico? Sí  No

¿Padece alguna enfermedad recurrente? Sí  No

Si la respuesta es si, diga cuál \_\_\_\_\_

¿Fuma? Sí  No

Si fuma, ¿con qué frecuencia?

Más de 6 cigarrillos/día  De 1 a 6 cigarrillos/día  Ocasionalmente

¿Consume bebidas alcohólicas? Sí  No

Si bebe, ¿con qué frecuencia?

Más de una vez/semana  Más de una vez/mes  Ocasionalmente

Fecha de toma de muestra (d/m/a)

Fecha de encuesta (d/m/a)

Encuestador (iniciales): \_\_\_\_\_

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo ..... con CI  
....., expedido en ....., manifiesto que he sido informado sobre los objetivos del proyecto **Evaluación del efecto genotóxico de la gasolina, diésel y gas en expendedores de estaciones de servicio y en el medio ambiente circundante**, que tiene como objetivo principal, identificar estas anomalías nucleares para dar a conocer un diagnóstico precoz de cáncer mediante microscopía. He sido informado de los beneficios y riesgos del Proyecto, así mismo, que se me hará conocer los resultados y que mis datos personales serán manejados confidencialmente y estarán protegidos según las normas vigentes de bioética. Que mi participación en el proyecto es voluntaria, no remunerada, durará solo el momento en que me tomen la muestra y efectúen la encuesta y en que en cualquier momento puedo retirar mi consentimiento o seguir participando en el mismo.

Por lo tanto, doy mi consentimiento a participar en este proyecto.

Nombres y apellidos .....

C.I. ....

Dirección ..... Telf/cel .....

.....

Firma

Nombre del responsable del consentimiento informado

.....

C.I. .... Fecha .....

.....

Firma

## ANEXO N° 2. Invernadero



## ANEXO N° 3. fotos de estaciones de servicio



Foto.

Estación de servicio san Sebastian camino a Oruro



**Foto.** Estación de servicio Mundial camino a Oruro



**Foto.** Estación de servicio las rosas camino a Viacha





**Foto.** Estación de servicio petrolal camino a Viacha