



HOSPITAL GENERAL DR MANUEL GEA GONZALEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DAÑO GENOTÓXICO EN EL EPITELIO NASAL EN ESTUDIANTES DE MEDICINA
CON Y SIN RINITIS ALÉRGICA RESIDENTES DE LA ZONA SUR DEL DISTRITO
FEDERAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LA ESPECIALIDAD DE
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGIA DE CABEZA Y CUELLO

PRESENTA

ALEJANDRO POMBO NAVA

JULIO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de Tesis con No. PROT-19-16-2010, presentado por el alumno Alejandro Pombo Nava se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis, Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar, y la División de Investigación Clínica a cargo de la Dra. Maria Elisa Vega Memije y por con fecha del 2 de agosto de 2010 para su impresión final.

División de Investigación Clínica

Dra. Maria Elisa Vega Memije

Tutor principal

Dr Gerardo Arturo Bravo Escobar

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra María Elisa Vega Memije
Subdirección de Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr Héctor Manuel Prado Calleros
Jefe de la División de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Gerardo Arturo Bravo Escobar
Asesor de Tesis
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

**DAÑO GENOTÓXICO EN EL EPITELIO NASAL EN ESTUDIANTES DE
MEDICINA CON Y SIN RINITIS ALÉRGICA RESIDENTES DE LA ZONA SUR
DEL DISTRITO FEDERAL**

Colaboradores:

Nombre: Dra Teresa Imelda Fortoul Van der Goes

Firma: _____

Nombre: Dra Marcela Rojas Lemus

Firma: _____

Nombre: Miguel Alfredo García de la Cruz

Firma: _____

Nombre: Erika Valdés Hernández

Firma: _____

INDICE

| | |
|---|----|
| Resumen | 7 |
| Abstract..... | 8 |
| 1. Introducción..... | 9 |
| 2. Antecedentes..... | 10 |
| 3. Justificación | 12 |
| 4. Hipótesis | 12 |
| 5. Objetivos..... | 12 |
| 5.1. Objetivo General..... | 12 |
| 5.2. Objetivos Particulares..... | 12 |
| 6. Material y Métodos..... | 13 |
| 6.1. Tipo de estudio | |
| 6.2. Ubicación temporal y espacial | |
| 6.3. Criterios de selección de la muestra | |
| 6.4. Variables | |
| 6.5. Tamaño de la muestra | |
| 6.6. Procedimiento | |
| 6.7. Análisis estadístico | |
| 6.8. Descripción operativa del estudio | |
| 7. Resultados..... | 17 |
| 8. Discusión | 28 |
| 9. Conclusiones..... | 29 |
| 10. Bibliografía..... | 30 |
| 11. Anexos | 31 |
| 11.1. Anexo No. 1..... | 31 |
| 11.2. Anexo No. 2..... | 32 |

RESUMEN

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es una de las urbes más pobladas en el mundo y ostenta uno de los niveles más altos de contaminación del aire. El ozono es el principal contaminante del aire en el Distrito Federal, constituyendo el 90% .

La rinitis alérgica, clínicamente definida como una enfermedad nasal sintomática inducida por la exposición a un alérgeno mediado por IgE; se divide en enfermedad intermitente y persistente y de acuerdo a su severidad puede ser leve o moderada/severa. Tiene una prevalencia en la población Mexicana del 5 al 10% y es un problema de salud que disminuye de manera considerable la calidad de vida.

El ensayo cometa o electroforesis de célula única permite detectar, mediante microscopía de fluorescencia, rupturas en la cadena de ADN (ácido desoxirribonucleico) de diversas células, entre ellas, el epitelio nasal.

El objetivo principal del estudio fue comparar, mediante el ensayo cometa, el grado de daño genotóxico que se presenta en el epitelio nasal de individuos con rinitis alérgica con residencia en la zona sur de la Ciudad de México con individuos sin rinitis alérgica que residen en esta misma región.

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo, analítico, ciego (en cuanto a la interpretación del resultado en el ensayo cometa) y transversal en abril de 2010 en 43 estudiantes de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad. El 55% (24) de los sujetos cumplió criterios para diagnóstico clínico de rinitis alérgica y el 45% (19) no los cumplió. No se observó una diferencia estadísticamente significativa de daño genotóxico entre ambos grupos.

Los estudiantes de medicina presentan daño genotóxico importante en el epitelio nasal independientemente de si padecen o no rinitis alérgica, esto se debe probablemente a la contaminación ambiental.

Abstract

The Metropolitan area of the Mexican Valley is one of the most populated areas in the world and holds one of the highest levels of air pollution. Ozone constitutes the 90% of air pollution in Mexico City.

Allergic rhinitis is defined as a symptomatic nasal disease provoked by allergen exposure mediated by IgE; it is classified as intermittent and persistent by the frequency of symptoms; and as mild and moderate/severe by the gravity of symptoms. It has a prevalence of 5 to 10% in Mexican population being a public health disease that considerably reduces quality of life.

The comet assay or single cell electrophoresis is performed under fluorescence microscopy and is used to detect ruptures in the DNA (deoxyribonucleic acid) strand of many cells, including nasal epithelial cells.

The main objective of the study was to compare, using the comet assay, genotoxic damage in nasal epithelial cells in medical students affected with allergic rhinitis, who live in the south area of Mexico City, with those students who didn't have allergic rhinitis and lived in the same area.

We conducted a prospective, comparative, analytical and blinded study in April 2010 in 43 medical students. Fifty five per cent (24) of the subjects match the diagnosis criteria for allergic rhinitis and 45% (19) didn't. We didn't find a statistical difference of genotoxic damage between both groups.

Medical students have major genotoxic damage in their nasal epithelium whether they have allergic rhinitis or not, this is probably because they reside in a highly polluted area.

INTRODUCCION

La contaminación es la presencia en el ambiente de toda materia, sustancia o forma de energía que, por su cantidad, combinaciones o características físicas, químicas y biológicas, puede ser nociva para la salud o integridad de la vida animal y vegetal. La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es una de las urbes más pobladas en el mundo y ostenta uno de los niveles más altos de contaminación del aire. Los factores geográficos, climáticos y socioeconómicos de la región contribuyen a mantener este problema. En la atmósfera de la ZMVM, como en todas las grandes urbes, los contaminantes de importancia capital son: óxidos de nitrógeno, bióxido de azufre, ozono, partículas suspendidas totales, monóxido de carbono, plomo e hidrocarburos¹.

El ozono es el principal contaminante del aire en el Distrito Federal, constituye el 90% del smog. Los habitantes del suroeste de la ciudad de México están expuestos a niveles de ozono por arriba de 0.1 partículas por millón (ppm) y hasta 0.4 ppm por varias horas al día durante todo el año, ocurriendo los niveles más altos durante el invierno y la primavera². Las principales fuentes de ozono incluyen los vehículos de motor, consumidores de solventes, refinerías de petróleo y gasolineras. El daño que generan los contaminantes atmosféricos sobre la vía respiratoria depende del tipo de huésped, del medio y de los contaminantes. La contaminación ambiental aumenta la incidencia de padecimientos respiratorios agudos. Su mecanismo de lesión en las células epiteliales de las vías respiratorias se debe a varios mecanismos bioquímicos: liberación de histamina, oxidación de grupos sulfhidrilo, oxidación de lípidos poliinsaturados en las membranas celulares y formación de radicales libres¹.

La exposición que presentan los humanos a diferentes agentes que inducen daño directo o indirecto al ácido desoxiribonucleico (ADN) ha creado un creciente interés en el desarrollo de nuevas técnicas capaces de detectar este daño. El primer ensayo apareció alrededor de los años 70, y aún está en uso, es la prueba “Ames”, también conocida como “revertantes de histidina”, esta prueba evalúa alteraciones a nivel genético causado por agentes físicos y químicos en las bacterias. Así como esta prueba existen muchas otras que evalúan el daño al ADN y su capacidad de reparación³.

Ostling y Johanson propusieron un método para la detección de daño genotóxico en células individuales, comúnmente conocido como el “ensayo cometa”, en el cual, las células son embebidas en agarosa y lisadas con detergentes. El ADN se libera y se corre en una cámara de electroforesis bajo condiciones neutras (pH 9.5) y teñido con un fluorocromo, el material genético entonces asemeja un “cometa” con una cabeza y cola. Esto es debido a que las células con incremento en el daño al ADN muestran migración del mismo desde el núcleo hacia el ánodo bajo una corriente eléctrica, dando entonces la apariencia de un cometa³.

Ésta técnica detecta únicamente rupturas de doble cadena y su utilidad está limitada a estudios de radiación y agentes radiomiméticos. La forma de realizar este ensayo ha tenido grandes modificaciones durante los últimos años⁴.

Existen dos versiones del ensayo cometa actualmente en uso, uno fue introducido por Singh y colaboradores, quienes usaron la electroforesis alcalina (pH>13) para analizar el daño al

ADN después del tratamiento con peróxido de hidrógeno o rayos X; con esto fue capaz de detectar rompimientos de cadena sencilla de ADN y sitios lábiles al álcali. Este ensayo es conocido como la “electroforesis en gel de células individuales”, aunque por razones históricas se conoce como el Ensayo Cometa. Olive y colaboradores desarrollaron otras versiones de la técnica neutral de Ostling y Johanson, en las cuales se involucra la electroforesis a pH neutral o alcalino para detectar rompimientos de cadena sencilla.

Esta técnica presenta varias ventajas, entre ellas: por la poca cantidad de células requeridas, se puede realizar un análisis de la cantidad de sangre obtenida por punción digital, o en el caso de tejidos o tumores sólidos se puede usar una biopsia con aguja fina, permitiendo una infinidad de posibles aplicaciones.

Este ensayo se ha aplicado como un método para: monitorear el número de células hipóxicas en el cáncer de mama irradiado, evaluar el daño al ADN del cristalino en pacientes con catarata, predecir la respuesta a la quimioterapia y evaluar la respuesta al tratamiento en linfocitos de pacientes con diferentes clases de cáncer, entre otras⁴.

La rinitis alérgica, clínicamente definida como una enfermedad nasal sintomática inducida por la exposición a un alérgeno mediado por IgE; se divide en enfermedad intermitente y persistente y de acuerdo a su severidad puede ser leve o moderada/severa. Tiene una prevalencia en la población Mexicana del 5 al 10% y es un problema de salud que disminuye de manera considerable la calidad de vida⁵.

El mecanismo fisiopatológico principal de la rinitis alérgica se debe a liberación de eosinófilos en la mucosa nasal en respuesta a un antígeno. Los eosinófilos pueden liberar radicales de superóxido estimulando la producción de concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno, lo cual resulta en un estado de estrés oxidativo oxidante que se ha involucrado en la patogénesis de las enfermedades alérgicas; estas células están presentes en la mucosa nasal durante periodos libres de ataque, cuando los eosinófilos pueden ejercer estrés oxidativo pero con menos intensidad⁶.

ANTECEDENTES.

Una de las aplicaciones más importantes del ensayo cometa es en el monitoreo humano, al evaluar el daño al ADN en células tomadas de individuos expuestos en forma ocupacional o ambiental⁴.

La relevancia del ensayo cometa en esta área, se debe a que requiere una muestra muy pequeña de células, a su habilidad para evaluar el daño en células no proliferantes y al hecho de que se puede, mediante procedimientos no invasivos, obtener un número suficiente de células de diferentes tejidos. Al respecto, Calderón y colaboradores obtuvieron células del epitelio nasal de niños e individuos que vivían en la Ciudad de México y observaron que el número de células con rompimientos de cadena sencilla (cometas) aumentó significativamente⁶. Este grupo adaptó el ensayo a células epiteliales bucales y mostraron que los fumadores tienen mayor daño celular que los no fumadores; la técnica fue capaz de detectar diferencias en fumadores que consumían más de 10 cigarrillos al día⁷.

Se ha demostrado daño genotóxico en las células del epitelio nasal y leucocitos sanguíneos en respuesta a la exposición de ozono. Diversos estudios mencionan el efecto de este gas en diversos tejidos y se cree que la inducción de especies reactivas de oxígeno es la causa principal por la que se observa daño epitelial. El estrés oxidante es capaz de provocar daño a la estructura del ADN, esto puede ser identificado como un biomarcador temprano de daño. El “ensayo cometa” ha sido propuesto como una técnica rápida y sensible para la evaluación de daño al ADN a nivel de células individuales. El daño al ADN ocasionado por las especies reactivas de oxígeno es una consecuencia de la interacción entre el tejido humano y los contaminantes ambientales. Algunos autores consideran este estudio como un biomarcador temprano de esta interacción, mientras que otros lo consideran un biomarcador de exposición⁷.

Se ha evaluado el daño genotóxico con la exposición de humo de tabaco mediante el ensayo cometa, llegando a la conclusión de que el daño al DNA es mayor en los pacientes fumadores y que incluso podría utilizarse como un método para monitorizar el aumento en el riesgo de cáncer mediante la evaluación del epitelio bucal⁸.

Se ha postulado que al exponerse a contaminantes ambientales, los hombres son más susceptibles a daño genotóxico que las mujeres, probablemente esto se deba al efecto protector antioxidante de los estrógenos o debido a que existen mayores concentraciones sanguíneas de especies reactivas de oxígeno en condiciones basales en la población masculina⁹.

Como se mencionó antes, la rinitis alérgica resulta en un estado de estrés oxidativo que provoca daño en las principales biomoléculas; por ejemplo la oxidación del ADN se traduce en rompimientos en la cadena, lo cual se ha interpretado como daño genotóxico. Durante la inflamación, la generación de radicales libres de oxígeno puede provocar ruptura de la cadena de ADN. Las células involucradas en las reacciones alérgicas son altamente competentes para la producción de radicales libres. Las células nasales y los leucocitos son adecuados para evaluar el daño genotóxico inducidos por exposición a contaminantes ambientales usando la electroforesis de célula única¹⁰.

Actualmente no existe ningún estudio en el que se demuestre si la rinitis alérgica incrementa o no el daño genotóxico en el epitelio nasal.

JUSTIFICACION

La rinitis alérgica es un problema de salud cuya incidencia se ha incrementado en los últimos años, con una prevalencia mundial estimada de 10%. Su presencia se asocia a otras enfermedades nasales y conlleva a una disminución importante de la calidad de vida. La rinitis alérgica ocasiona un estado de inflamación crónica en las vías respiratorias. En diversas enfermedades se ha demostrado que la inflamación crónica puede ser un factor asociado a displasias o daño al material genético del tejido afectado. Así mismo, la contaminación ambiental es conocida por diversos efectos nocivos en el organismo, entre ellos, el daño al ADN del epitelio nasal.

Hoy en día existen diversos métodos de estudio que permiten detectar el daño al ADN de células de nuestro organismo. Uno de ellos, es el ensayo cometa, que es un estudio que prácticamente se puede realizar en cualquier tejido del cuerpo. Este estudio es de bajo costo y permite una detección temprana del daño al ADN.

En la actualidad se desconoce si la rinitis alérgica se asocia a un incremento en el daño genotóxico del epitelio nasal, lo cual resulta de gran interés por dos motivos: primero, su elevada prevalencia en la población general, y segundo, que estamos hablando de población que además se encuentra viviendo en una zona urbana altamente contaminada, por lo que pensamos que habría una doble fuente de daño al ADN del epitelio nasal.

HIPOTESIS

Si los individuos que residen en la zona sur de la Ciudad de México tienen rinitis alérgica entonces el daño genotóxico en el epitelio nasal será mayor.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Comparar el grado de daño genotóxico que se presenta en el epitelio nasal de individuos (estudiantes de medicina de la Facultad de Medicina de la UNAM) con rinitis alérgica que residen en el sur de la Ciudad de México al que se presenta en el epitelio nasal de población sin rinitis alérgica que reside en esta misma región.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el grado de daño genotóxico del epitelio nasal de individuos sin rinitis alérgica residentes de la zona sur de la Ciudad de México.
- Determinar el grado de daño genotóxico del epitelio nasal de individuos con rinitis alérgica residentes de la zona sur de la Ciudad de México.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de Estudio

Estudio comparativo, analítico, ciego (será en cuanto a la interpretación del resultado en el ensayo cometa), prospectivo y transversal.

Ubicación Temporal y Espacial

Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en abril de 2010

Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión

Inclusión en grupo de casos (pacientes con rinitis alérgica):

- Estudiantes de medicina de la UNAM entre 18 y 27 años de edad con al menos 1 año de residencia en la zona sur del Distrito Federal (comprendiendo las delegaciones Tlalpan, Xochimilco, Coyoacán, Álvaro Obregón, Magdalena Contreras, Tláhuac y Milpa Alta), que no tengan otras enfermedades en general o antecedentes de exposición laboral a irritantes nasales (industria de madera, peletería, humo y polvos químicos) y que no hayan recibido tratamiento médico para rinitis alérgica.
- Que deseen participar en el estudio y que firmen consentimiento informado.
- Con diagnóstico clínico de rinitis alérgica de acuerdo con la guía ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) que son:
 - Dos o más de los siguientes síntomas por más de una hora en la mayoría de los días: rinorrea hialina, estornudos de tipo paroxístico, obstrucción nasal, prurito nasal o +- conjuntivitis.

Inclusión en grupo control

- Estudiantes de medicina de la UNAM entre 18 y 27 años de edad con al menos 1 año de residencia en la zona sur del Distrito Federal.
- Enterados del estudio y que firmen consentimiento informado.
- Que tengan un diagnóstico negativo de rinitis alérgica de acuerdo con la guía ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma), los cuales son:
 - Dos o más de los siguientes síntomas por más de una hora en la mayoría de los días: rinorrea hialina, estornudos de tipo paroxístico, obstrucción nasal, prurito nasal o +- conjuntivitis.

Criterios de exclusión (para ambos grupos).

- Que reciban tratamiento farmacológico sistémico con antihistamínicos, esteroides o antileucotrienos o cualquier medicamento tópico nasal.
- Antecedente de cirugía nasal previa.
- Presencia de otras enfermedades nasales crónicas.
- Sospecha de embarazo de acuerdo a última fecha de menstruación.
- Infección de vías respiratorias superiores en los últimos 3 meses.
- Antecedente de tabaquismo.
- Antecedentes de cáncer de cualquier tipo y en cualquier localización
- Sospecha y reporte de adicción a drogas.

Criterios de eliminación.

- Muestra con material insuficiente para realizar el ensayo cometa o completar el procesamiento adecuado.
- Estudiantes que retiren su consentimiento informado para el uso de la muestra o no deseen tomarse la muestra a pesar de firmar la carta estudio para diagnóstico.

Variables

Independientes

- Rinitis alérgica, edad, sexo, ocupación (en caso de que además de estudiar trabajen) y tiempo de residencia en domicilio actual.

Dependientes

- Grado de daño genotóxico

| Independiente | | Dependiente | |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------------|
| Grupo a o b | Nominal dicotómica | Daño Genotóxico | Ordinal: leve, moderado y severo |
| Edad | Discreta: años | | |
| Sexo | Nominal | | |
| Tiempo de residencia en el DF | Intervalo | | |
| Ocupación | Nominal | | |
| Fecha de última Menstruación | Intervalo | | |

Variables:

Grupo a: grupo de casos con rinitis alérgica

Grupo b: grupo control

Daño genotóxico: determinado por la cantidad de rompimientos de cadena de ADN.

Tamaño de la Muestra

Estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México de primero y segundo año

Métodos de Laboratorio

Análisis Estadístico

la diferencia que espera encontrar entre los grupos es de:

20% , el rango de variación de ambos casos: 3%

Número de grupos 2, número de casos por grupo: 66

Con nivel alfa de 5% y potencia de la prueba de 90%

$$n = \frac{\left[Z_{\alpha} * \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} * \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

n = sujetos necesarios en cada una de las muestras

Z_{α} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado = 0.05

Z_{β} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado = 0.1

p_1 = Valor de la proporción en el grupo de referencia, placebo, control o tratamiento habitual = 0.1

p_2 = Valor de la proporción en el grupo del nuevo tratamiento, intervención o técnica = 0.3

p = Media de las dos proporciones p_1 y p_2

$$p = \frac{p_1 + p_2}{2}$$

Descripción Operativa del Estudio

Los investigadores acudirán a las aulas-laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM con la idea de reclutar voluntarios. Se llevará a cabo una presentación de 5 minutos de duración al final de su clase y en ausencia de sus profesores titulares para evitar la sensación de compromiso o presión para participar en el estudio, en la presentación se explicará la idea general del protocolo, las características generales de la rinitis alérgica y lo que implicaría la participación de los voluntarios en el mismo. A los interesados en participar se les pedirá que permanezcan en el aula para explicarles los detalles de su participación y en caso de aceptar, leer y firmar la carta de consentimiento informado.

Una vez firmada la carta de consentimiento informado se repartirán los cuestionarios para el diagnóstico clínico de rinitis alérgica y se realizará una exploración física que consiste en inspección ocular y rinoscopia anterior con rinoscopio y lámpara frontal.

De acuerdo al resultado del cuestionario y la evaluación clínica se incluirá a los voluntarios como casos o controles, según corresponda. En grupos de 5 participantes serán llevados al laboratorio de investigación (que se encuentra a un costado de las aulas) para realizar la toma de la muestra. En dicho laboratorio se cuenta con toda la infraestructura para realizar el procedimiento.

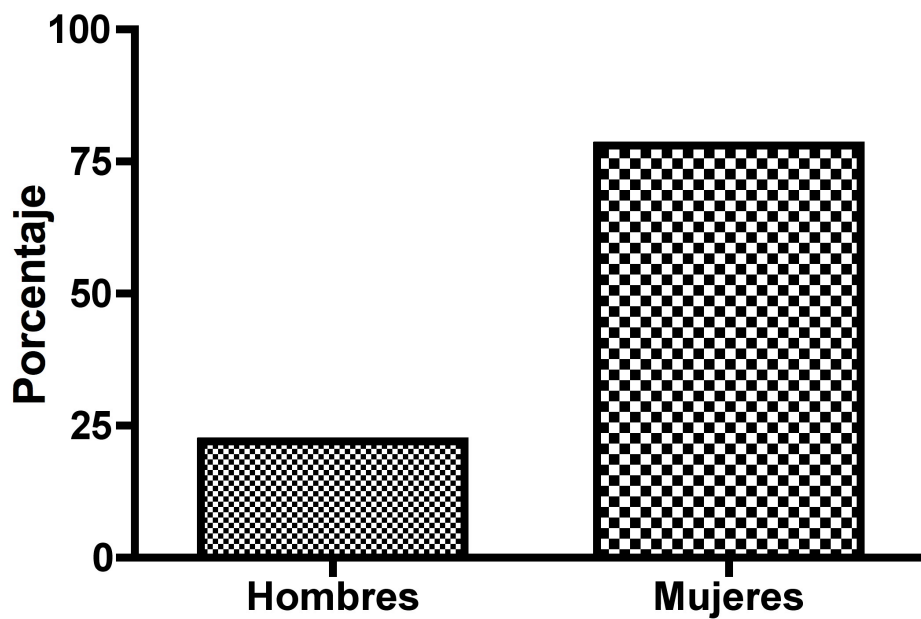
Para la toma de la muestra serán empleados los medios de protección habituales, que incluyen guantes, cubrebocas y lentes por los investigadores. Se obtienen las células de epitelio nasal mediante la introducción de un citobrush hacia los cornetes medios en donde se realiza el cepillado. Habitualmente este paso de la obtención de la muestra no requiere nada más (como empleo de anestésicos o vasoconstrictores tópicos).

El procesamiento de la muestra se describe detalladamente en el anexo.

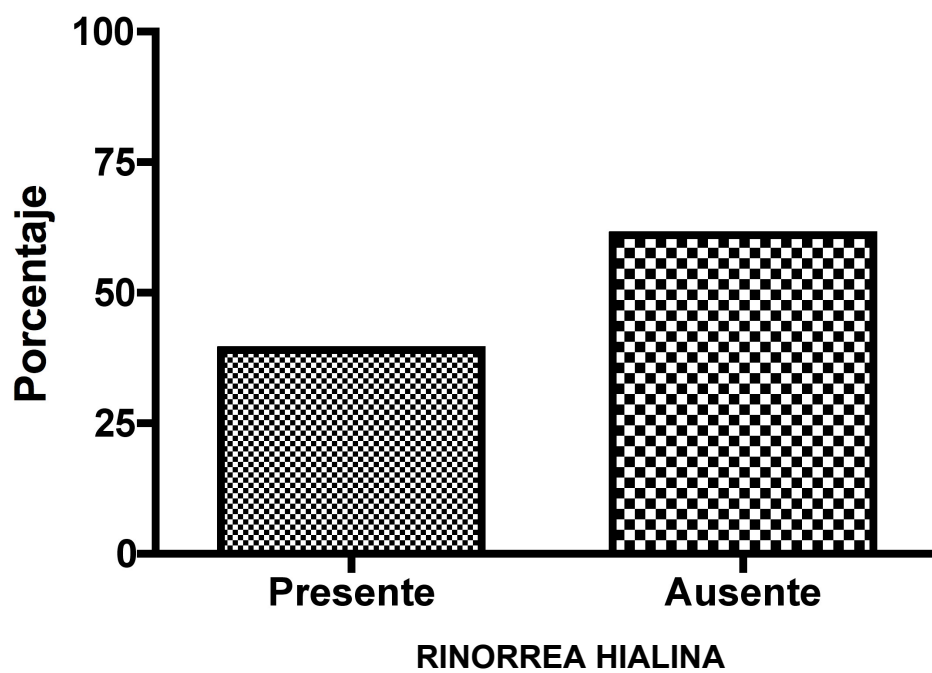
RESULTADOS

Se realizaron un total de 49 frotis nasales de los cuales se excluyeron 6 debido a muestras insuficientes para su lectura.

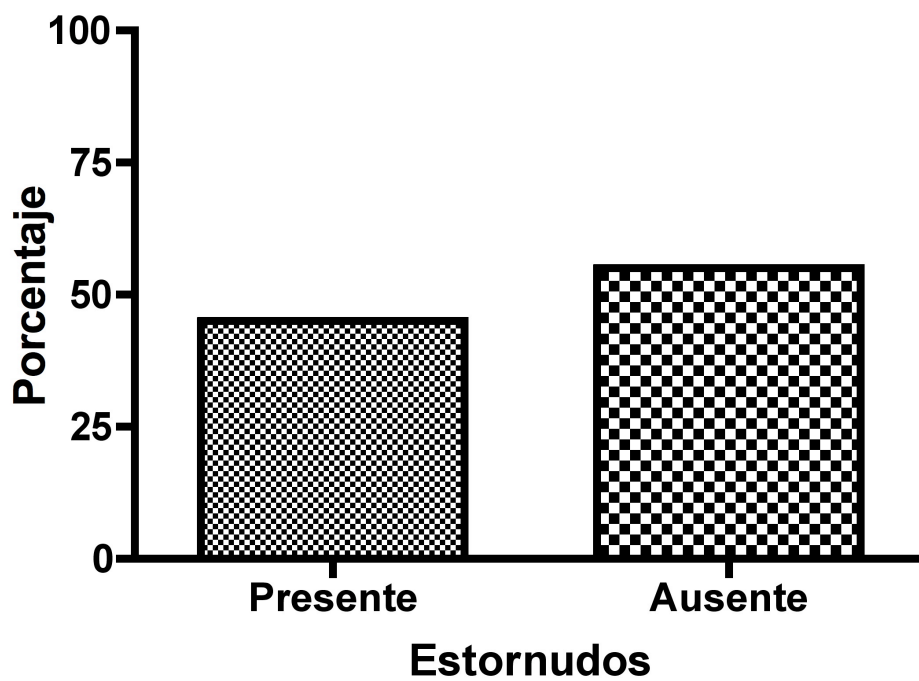
En cuanto al género, el 23% (10) de los sujetos fueron masculinos y el 77% (33) femeninos. La edad promedio fue de 18.8 años, con una máxima de 21 y una mínima de 17.



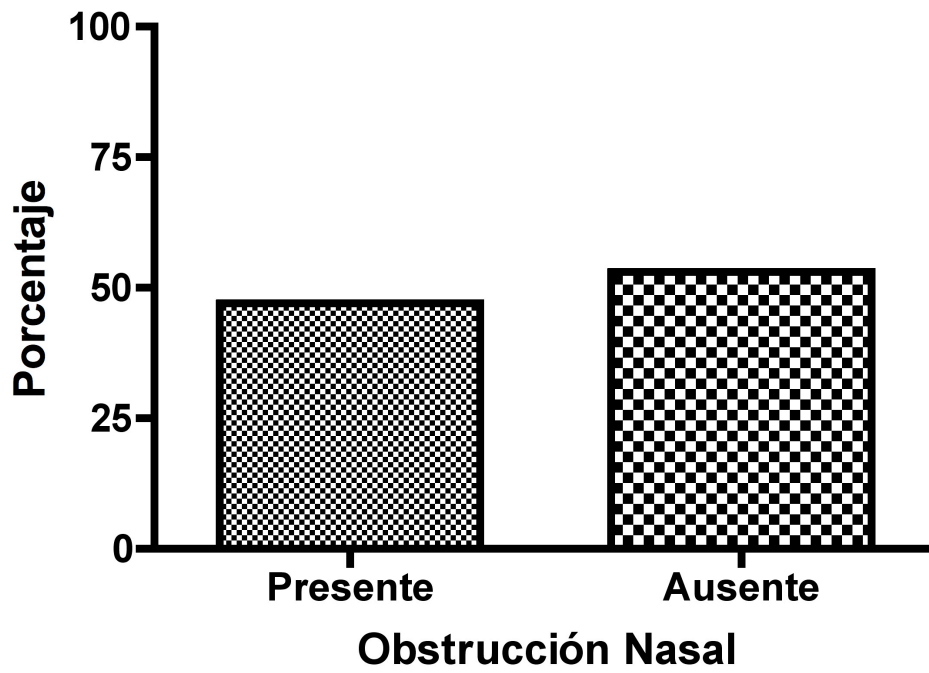
El 37% presentó rinorrea hialina y el 63% no la presentó.



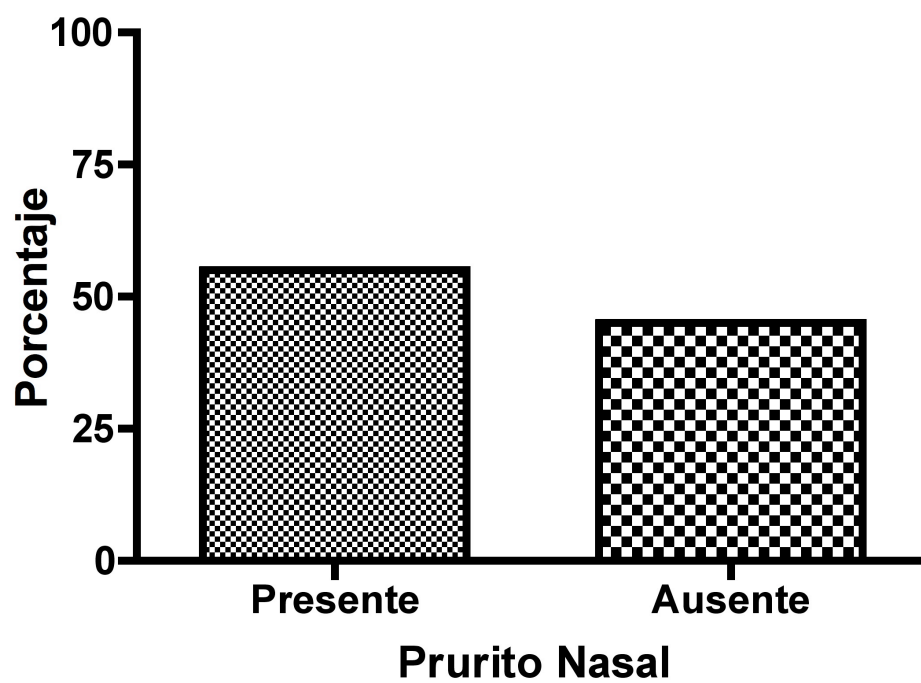
Cuarenta y seis por ciento (20) sujetos presentaron estornudos frecuentes y el 54% (23) no lo refirieron.



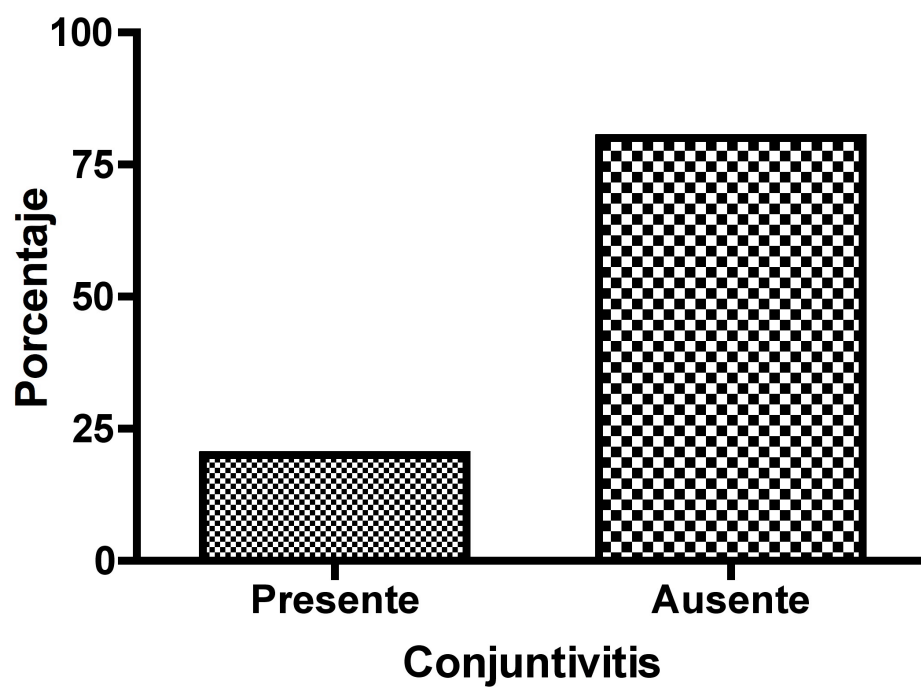
Cuarenta y seis por ciento (20) sujetos presentaron obstrucción nasal y el 54% (23) no la refirieron.



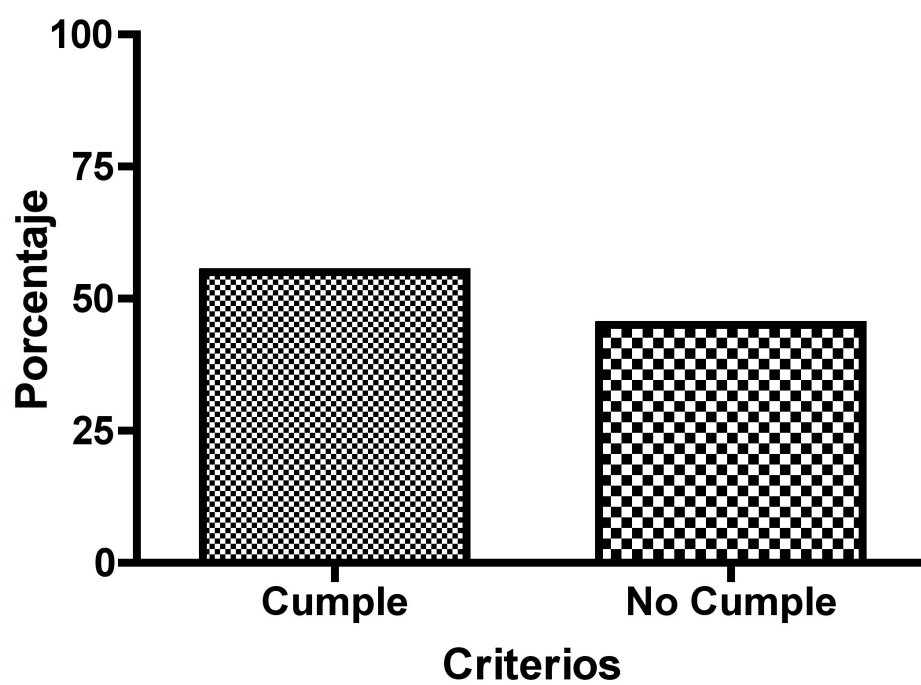
El 46% (20) presentaron prurito nasal y el resto no lo refirieron.



El 18% (8) de los sujetos presentaron conjuntivitis y el 82% (35) no la refirieron.

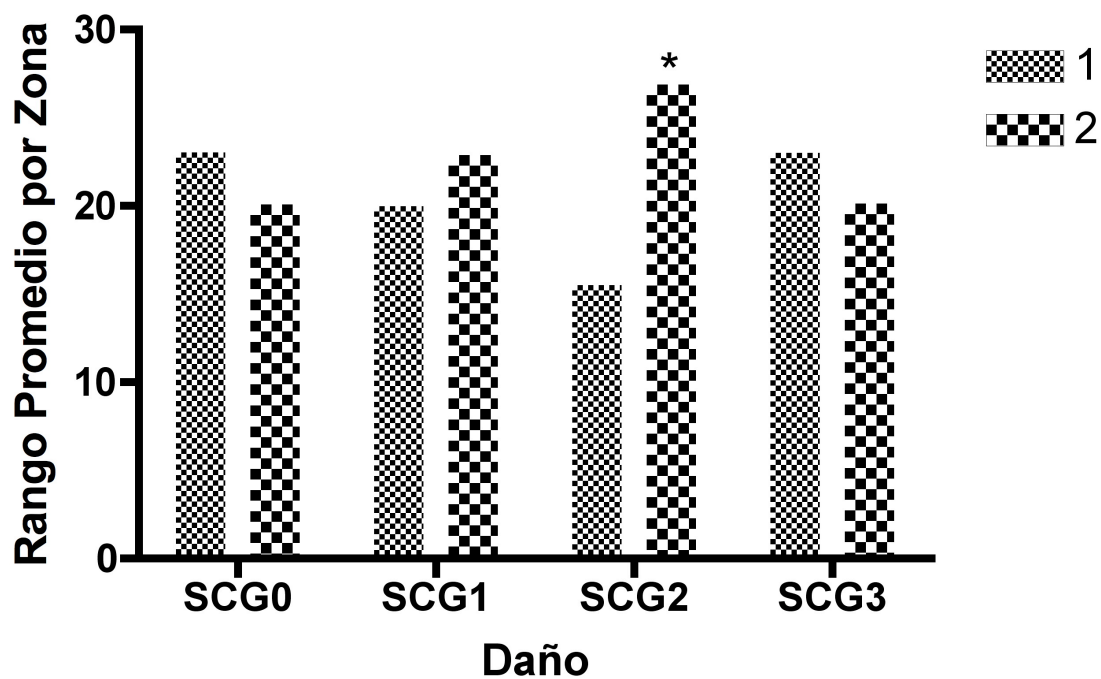


El 55% (24) de los sujetos cumplió con los criterios diagnósticos de la ARIA y el 45% (19) no los cumplió.



En cuanto al daño genotóxico, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los casos y controles ($p>0.05$).

En cuanto al grado de daño genotóxico, existió mayor grado moderado (Grado 2) estadísticamente significativo mayor a los demás ($p<0.002$).



* U de Mann-Whitney $p<0.002$

1: Zona Sur del Distrito Federal; 2: Zona Norte del Distrito Federal; SCG0: Sin daño genotóxico; SCG1: Daño genotóxico leve; SCG2: Daño moderado; SCG3: Daño severo

A continuación, se muestran ejemplos de microscopía de fluorescencia en los que se observan los distintos tipos de daño al ADN.

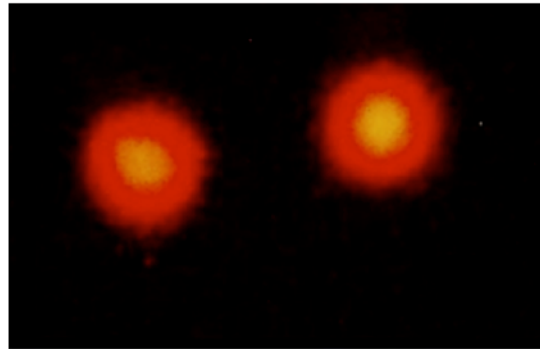


Figura 1. Sin daño

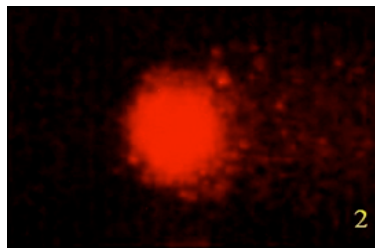


Fig 2. Daño leve

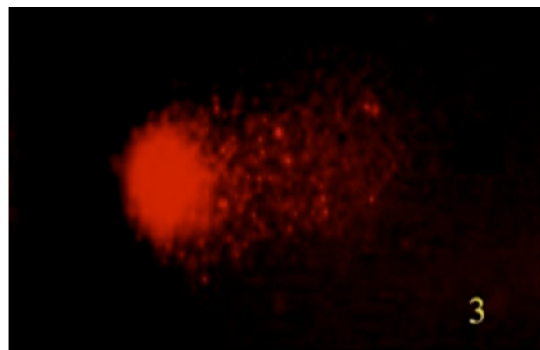


Fig 3. Daño moderado

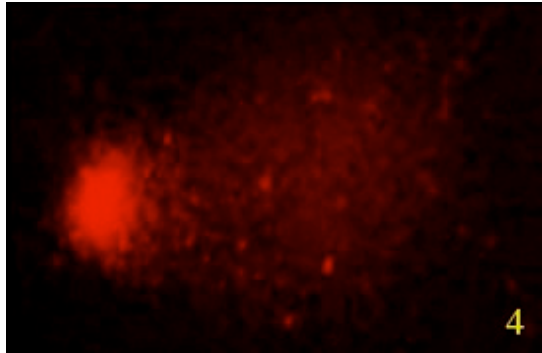


Fig 4. Daño severo

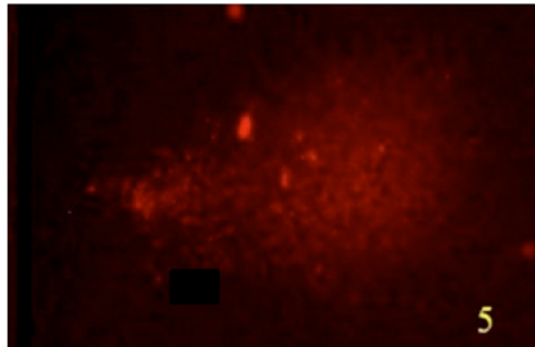


Fig 5. Daño total (nube)

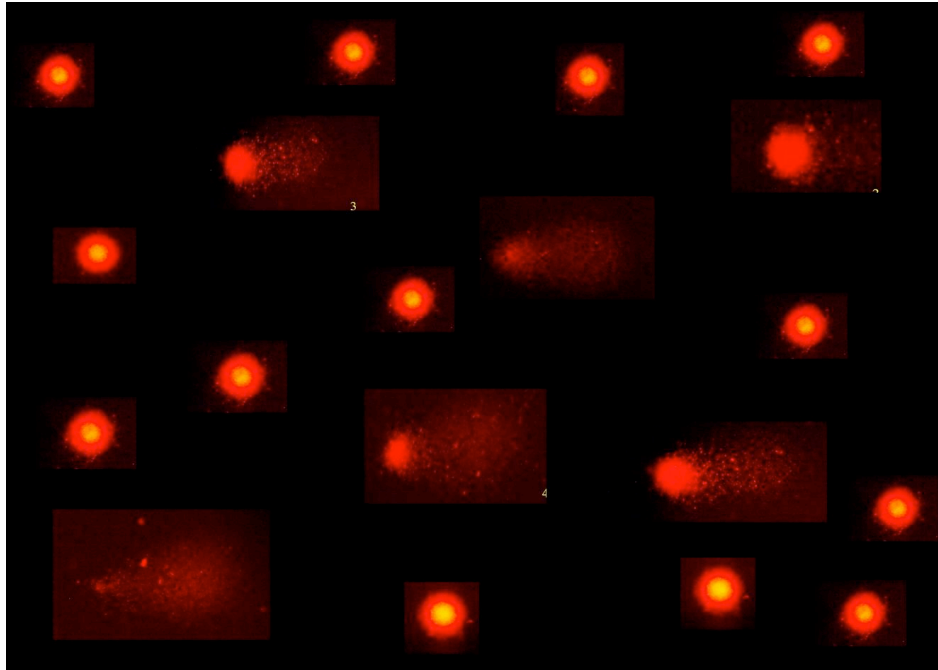


Fig 6. Ejemplo de campo de microscopía de Fluorescencia

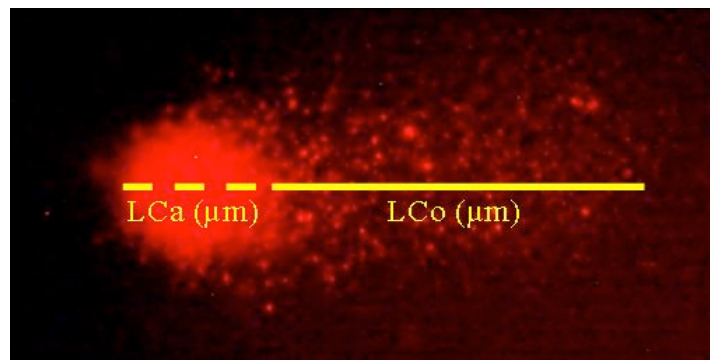


Fig 7. Medición de la relación longitud cola/ longitud de caceza (en micras)

Categorías de daño de los cometas: Longitud cola / Longitud cabeza

- Daño Bajo ≤ 1 (hasta $10\mu\text{m}$)
- Medio ≤ 2 (hasta $20\mu\text{m}$),
- Alto >2 ($21\mu\text{m}$ o más)

DISCUSIÓN

Dworski menciona que durante la inflamación, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden provocar ruptura del ADN¹¹. Las células involucradas en las reacciones alérgicas son altamente efectivas en la producción de ERO. Los eosinófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos activados generan radicales superóxido que estimulan la producción de concentraciones elevadas de ERO lo cual resulta en un estado de estrés oxidativo. Este estado oxidativo está involucrado en la patogénesis de las enfermedades alérgicas³ e induce la oxidación de varias biomoléculas¹²; un ejemplo de ellas es el DNA¹³. Basados en esta premisa, pensamos encontrar una diferencia estadísticamente significativa del daño genotóxico en el epitelio nasal entre los estudiantes con rinitis alérgica que los que no la tenían; sin embargo, éste no fue el caso; se encontró daño genotóxico importante distribuido en igual forma tanto en los casos (riniticos) como en los controles (no riniticos). En un estudio similar, Fortoul y colaboradores¹⁰ sí encontraron mayor daño genotóxico en estudiantes con asma que sin asma. Esta enfermedad tiene un mecanismo fisiopatológico similar a la rinitis alérgica. Probablemente ellos sí encontraron una diferencia estadísticamente significativa debido a que no sólo realizaron citología nasal, sino también electroforesis de célula única en sangre. Además, realizaron dos mediciones en distinta época del año del daño genotóxico y luego las compararon. Posiblemente si realizáramos otra medición en los mismos sujetos que cumplieron criterios de rinitis alérgica en invierno, encontraríamos mayor daño respecto a la muestra previa.

Como mencionamos, utilizamos los criterios clínicos de la guía internacional ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma, 2007) para clasificar a los individuos como riniticos y no riniticos; sin embargo, algunos de nuestros individuos no se encontraban en la fase “aguda” de la enfermedad, momento en el cual el estrés oxidativo pudiera ser menor. Pudiera ser que, aunque el daño genotóxico estuvo uniformemente distribuido en nuestra población con rinitis y sin rinitis, no descarta que el mecanismo para llegar a este daño sea diferente; esto daría pie a otro estudio en el que también se analizaran otros mediadores de inflamación.

Es bien sabido que la exposición a contaminantes aumenta el daño genotóxico, como lo mencionan Calderon-Garcidueñas y colaboradores⁶, quienes demostraron que una gran cantidad de irritantes químicos incluyendo el formaldehído, ozono y cloroformo, causan daño importante en la superficie del epitelio nasal debido a la exposición en forma aguda o repetida. Las alteraciones en la mucosa nasal incluyen inflamación aguda, degeneración y necrosis de la superficie epitelial, cambios del epitelio normal a otro morfológicamente diferente, epitelio adaptativo, aumento en la proliferación celular, lesiones displásicas y carcinomas. Así mismo, para evaluar los efectos de los contaminantes, se realizó un estudio en el que se comparó el epitelio nasal de habitantes del suroeste de la Ciudad de México contra habitantes de Isla Mujeres. Se tomaron biopsias nasales en el antro, cornete inferior, cornete medio y corredor olfatorio; se evaluaron cambios displásicos y la acumulación de proteína p53, la cual está implicada en la carcinogénesis. La región más afectada fue la antral en la que se observó que el 62% de los expuestos mostró hiperplasia de células basales, otras observaciones fueron pérdida de la polaridad normal, atipia y pleomorfismo leve a moderado del epitelio escamoso; así mismo, se observó neoformación capilar en la membrana basal. Las áreas de neoformación se asociaron significativamente a la presencia de displasias, sin embargo no se encontró displasia severa o carcinoma in situ.

Se encontró una relación significativa entre la displasia y la acumulación de la proteína p53
11.

El hecho de que hayamos encontrado un daño genotóxico importante distribuido uniformemente en nuestros sujetos de estudio obedece probablemente a la contaminación, esto puede indicar que los contaminantes son un factor más importante para el estrés oxidativo y daño al ADN que estados de estrés oxidativo subyacentes como lo es la rinitis alérgica (al menos en una medición).

Aunque consideramos a todos nuestros sujetos de estudio residentes del sur de la Ciudad de México, los dividimos 2 grupos; los que vivían en delegaciones más cercanas al norte (N=22) y los que vivían más al sur (n=20). Encontramos que los sujetos que residen más al norte tuvieron un grado genotóxico de tipo moderado estadísticamente significativo ($p < 0.002$) mayor que los que residen en el sur.

Sería interesante comparar nuestra población de estudio con una homogénea pero con residencia en estados de la República con índices bajos de contaminación; seguramente habría una diferencia significativa. Este estudio debe de complementarse con otra medición de daño genotóxico de los mismos individuos en otra época del año o cuando la sintomatología sea más importante.

CONCLUSIONES

Residir en una zona con altos índices de contaminación conlleva a daño genotóxico en el epitelio nasal.

Los estudiantes de Medicina de la zona sur del Distrito Federal presentan daño genotóxico importante en el epitelio nasal independientemente si padecen rinitis alérgica o no. Esto se debe probablemente a los altos índices de contaminación de la ciudad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Viveros-Añorbe LM y Rivera-Cruz JM. Cambios histopatológicos en la mucosa nasal por contaminación ambiental. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 1999; 44 (3): 127-131
2. Fortoul T. I, Valverde M. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environmental research* 2004; (94): 243 - 248
3. Fortoul T. I, Mussali-Galante P. Early biomarkers of effect in human health: DNA damage evaluation. 2006; 1- 19
4. Rojas E, Lopez M. Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of chromatography B*. 1999; 722: 225 - 254
5. Cisneros Pérez V. Prevalencia de rinitis alérgica en la Ciudad de Durango, México. *Revista Alergia México* 2004; 51(2): 49-53
6. Calderon-Garcidueñas, L. Nasal epithelium as a centinela for airborne environmental pollution. *Toxicological sciences*. 1998; 46: 352 – 364
7. Fortoul T. I, Valverde M: Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Enviromental research* 2004; (94): 243 – 248
8. E. Rojas, M. Valverde, et al: DNA damage in exfoliated bucal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation research*. 1996; (370): 115 – 120
9. Fortoul T.I., Moncada-Hernández Sandra, et al: Sex differences in bronchiolar epithelium response alter the inhalation of lead acetate. *Toxicology*. 2005; 207: 323 – 330
10. Fortoul TI, Valverde MC: Single-cell gel electrophoresis assay of the nasal epithelium and leukocytes from asthmatic and nonasthmatic subjects in Mexico City. *Archives of environmental Elath*. 2003; 58 (6): 343 – 352
11. Dworski R. Oxidant Stress in asthma. *Thorax* 2000; 55(suppl 2): s51- s53
12. Van Klaveren JR, Nemery B. Role of reactive oxygen species in occupational and environmental obstructive pulmonary diseases. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5(2): 118 -123
13. Anderson D, Yu WT, Phillips JB, et al. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1994; 307(1):261-71

ANEXO I

HOJA DE CAPTURA DE DATOS.

PROTOCOLO: Daño genotóxico en el epitelio nasal en población con y sin rinitis alérgica en residentes de la zona sur del Distrito Federal.

Nombre: _____ Fecha: _____
Edad: _____ Sexo: Masculino () Femenino ()
Ocupación (en caso de trabajar además de estudiar medicina): _____
Tiempo de residencia en la zona sur del Distrito Federal: _____ años.

Dirección completa (con delegación):

Diagnóstico según guía ARIA

Marque con una X si tiene alguno de los siguientes síntomas durante más de 1 hora la mayoría de los días.

Rinorrea hialina(flujos nasales acuosos): _____

Estornudos paroxísticos (más de 3 veces seguidas): _____

Obstrucción nasal _____

Comezón en la nariz _____

Conjuntivitis _____

Cumple 2 criterios: SI () NO

()

Fecha de última menstruación (sólo mujeres): _____

Hallazgos en la exploración física (marcar con X los positivos):

Cornetes: Hipertroficados _____ Pálidos _____ Puentes hialinos _____

Rinorrea: Hialina _____ Purulenta _____

Mucosa: Pálida _____ Hiperémica _____

Pólipos: Sí _____ No _____

Septum: Obstrutivo _____ No obstructivo _____

Conjuntivas: Hiperemia: _____ Edema: _____

Grado de daño genotóxico: Normal: _____

Leve: _____

Moderado: _____

Severo: _____

ANEXO II

Se describe la metodología para realizar la electroforesis de célula única.

PARTE I. SOLUCIONES

1. Solución para viabilidad celular por fluorocromos

- Solución A: FDA (Diacetato de Fluoresceína).
 - o 0.01 g en 2 cc de acetona
 - o Guardar en frasco ámbar a 4 C
- Solución B: (BrEt) Bromuro de Etidio
 - o 0.01 g en 5 ml de PBS
 - o Guardar en frasco ámbar a 4 C
- Solución C: PBS

Para usar en fresco:

- 15 mcL de FDA
- 2.4 ml de PBS
- 100 mcL de BrEt

Mezclar en frasco ámbar y usarse inmediatamente, desechar lo que no se utilice (desactivar con carbón activado).

2. Agarosa a punto de fusión normal (uso de rutina).

- Preparar al 0.5%
- Pesar 125 mg o 125 g y disolver en 25 ml de PBS (buffer de fosfatos)
- Disolver con calor
- Guardar a 4 C

3. Agarosa de bajo punto de fusión

- Preparar al 0.5%
- Pesar 125 mg o 125 g y disolver en 25 ml de PBS (buffer de fosfatos)
- Disolver con calor (su uso debe llevarse a cabo a 37 C)
- Guardar a 4 C

3.1 Agarosa de bajo punto de fusión (para controles positivos)

- Seguir el protocolo, pero en lugar de disolver en PBS, disolver en H₂O

4. Solución de lisis

- NaCl 2.5M
- Tris 10 mM o 0.01 M
- EDTA Na₂ 100mM o 0.1 M

Para preparar 1 L de solución de lisis:

NaCl 2.5 M **PM= 58.44**

58.44 – 1 M – 1 L

X – 2.5 M - 1 L

X= 146.1 g

Tris 0.01M **PM = 121.14**

121.14 – 1M – 1L

X – 0.01 M – 1 L

X= 1.21 g

EDTA Na₂ **PM = 372.24**

372.24 – 1M – 1L

X – 0.1 M – 1L

X= 37.22 g

- Disolver con mosca y agitador. Es importante colocar lentejas de NaOH cuando se está disolviendo.
- Ajustar el pH a 10 con NaOH
- Aforar a 1L
- Guardar a Temp. Ambiente
- Antes de usarse:
 - o 45 ml de solución de lisis
 - o 450 mcL de tritón x – 100 (1%)
 - o 4.5 ml de DMSO (10%)
- En un matraz agitar con mosca durante 15 min. Posteriormente colocar vaso copling a 4 C hasta que la solución se ponga transparente. El vaso debe de cubrirse con papel aluminio para evitar que la luz entre en contacto con las muestras.

5. Buffer de desenrollamiento y corrida

- Buffer A
 - o NaOH 300 mM o 0.3 M PM=40

Para 1 L de solución:

40 – 1 M – 1L

X – 0.3M – 1L

X= 12 g

Aforar a 1 L con H₂O_d fría

- Buffer B
 - o EDTA Na₂ 1mM o 0.001M PM=372.24

Para 1 L de solución:

372.24 – 1M – 1L

X – 0.001M – 1L

X= 0.37 g

Aforar a 1 L con H₂O_d fría

Preparar ambos buffers por separado y revisar que el pH del buffer A+B sea igual o mayor a 13. Es importante que el H₂O_d esté fría.

6. Solución de Neutralización

TRIS 400 mM o 0.4 M PM = 121.14
121.14 – 1M – 1L
X – 0.4 M – 1L
X = 48.45 g

- Aforar a 1L
- Ajustar el pH a 7.5
- Guardar a Temp. Ambiente

7. Fijación

- Etanol absoluto

8. Fluorocromización

Bromuro de Etidio(fluorocromo)

1 mg BrEt en 5 c de H₂O: solución stock

- Tomar 1 ml de solución stock + 9 ml de H₂O: solución de uso rutinario
- Guardar en frasco ámbar a Temp. Ambiente
- Usar guantes siempre que se manipule esta solución
- Cuando se deseche: en agua con carbón activado por espacio de 10 días.

Una vez que terminen de leerse las laminillas, se enjuagan en un vaso de kopping durante 15 minutos con etanol absoluto. Secar a temperatura ambiente.

PARTE II. Preparación de material

1. Laminillas y cubreobjetos

a. Primer capa de agarosa regular sobre la laminilla:

- Fundir
- Extender 150 mcL sobre una laminilla limpia
- Secar en estufa a 60 C
- Guardar en una caja para laminillas

- Se pueden preparar tantas laminillas como se desee y guardarlas hasta que vayan a ser utilizadas

b. Cubreobjetos

- En solución de éter – alcohol (1:4) o alcohol acético (4:1) poner los cubreobjetos durante 10 minutos.
- Secarlos con gasa
 - Se pueden limpiar tantos cubreobjetos como se desee y guardarlas hasta que vayan a ser utilizadas.
 - IMPORTANTE:** si los cubreobjetos provienen de una caja nueva (que no haya sido abierta) entonces pueden ser utilizados sin lavado previo.

PARTE III. Toma de muestra

0. Laminillas y portaobjetos

a. Epitelio nasal

- Medio RPMI 1640
- Disolver en H₂O a 37 C

Material

- Cepillo
- Tubos eppendorf de 1.5 ml etiquetados
- Gradilla
- Medio RPMI a 37 C
- Kleenex

Método

- Realizar el cepillado nasal
- En el tubo eppendorf colocar medio RPMI y el cepillo y cortar el cepillo
- Suavemente, “sacudir” las células del cepillo
- Retirar el cepillo del tubo y centrifugar las muestras a 1000 rpm durante 5 minutos
- Eliminar el sobrenadante
- Resuspender con vórtex el botón en 500 mcL de medio RPMI
- Tomar 20 mcL de muestra y mezclarlos con agarosa low-PBS
- Colocar 75 mcL de mezcla agarosa-muestra sobre cada laminilla (laminillas con agarosa regular, 2 por cada muestra)
- Cubrir con cubreobjetos limpio
- Colocar sobre hielo durante 5 minutos
- Retirar cubreobjetos y reservarlo
- Colocar la tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión: 75 mcL
- Colocar nuevamente el cubreobjetos
- Colocar las muestras sobre el hielo durante 5 minutos
- Retirar el cubreobjetos
- Colocar laminillas en un vaso copling con solución de lisis fresca
- Mantener a 4 C en condiciones de obscuridad

Parte IV. Electroforesis horizontal

- Desenrollamiento y electroforesis
 - o Preparar buffers de corrida fríos
 - o Llenar la cámara de electroforesis, que debe estar nivelada
 - o Acomodar las laminillas por parejas
 - o Cubrir las laminillas con buffer durante 40 minutos
 - o Una vez transcurrido ese tiempo, encender la fuente de poder y corroborar que el voltaje sea 25 V y 300 mA durante 20 minutos
- Neutralización
 - o En un copling con TRIS, enjuagar las laminillas durante 5 minutos, 3 veces.
- Fijación.
 - o En un copling con etanol absoluto, enjuagar las laminillas durante 5 minutos, 2 veces.
 - o Secarlas a temperatura ambiente
 - o Guardarlas hasta el momento de la fluorocromización

Parte V. Evaluación

1. Evaluación de resultados

- a. De la solución de fluorocromos de uso rutinario, tomar 50 mcL y colocarlos sobre la laminilla a evaluar
- b. En el microscopio de fluorescencia se observarán los campos
 - i. En campos al azar, contar (100 por laminilla):
 1. Cuántos nucleoides (sólo cabeza)
 2. Cuántos cometas (cabeza y cola)
 3. Cuántas nubes (sólo cola)
 - ii. De los cometas: medir longitud de la cabeza y longitud de la cola
 1. Categorías de daño:
 - a. Longitud cola / longitud cabeza: bajo $<$ o igual a 1, medio $<$ o igual a 2 y alto $>$ 2.
- c. Conservación de las muestras
 - i. Cuando se haya terminado la observación y la medición, se retira el cubreobjetos y las muestras sumergen en alcohol diluido durante 10 minutos
 - ii. Posteriormente se secan al aire y se guardan a temperatura ambiente.