

Impacto genético en comunidades Amazónicas del Ecuador localizadas en zonas petroleras

César Paz-y-Miño¹, Bernardo Castro¹, Andrés López-Cortés¹, María José Muñoz, Alejandro Cabrera¹, Catalina Herrera¹, Adolfo Maldonado², Carolina Valladares², María Eugenia Sánchez¹

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de las Américas. Av. de los Granados y Colimes. Quito, Ecuador. Postal code: 1712842
cpazymino@udla.edu.ec

² Corporación Acción Ecológica. Área de investigación en salud y ambiente. Alejandro de Valdez N24-33 y La Gasca. Quito, Ecuador. Postal code: 1715246-C
Recibido: 2010-02-05, aprobado: 2010-08-31

RESUMEN.- La exposición de agentes carcinógenos usados en la industria petrolera incrementa el desarrollo de cáncer tanto en hombres como en mujeres y niños. Se ha observado que los individuos expuestos a agentes genotóxicos presentan una inestabilidad general del genoma humano que puede ser evaluada por medio del estudio de cromosomas o de genes involucrados en daño genético a través del análisis del nivel de fragmentación del ADN en individuos expuestos a los hidrocarburos. Para el estudio se escogieron 23 mujeres que viven cerca de la actividad petrolera y a quienes se supone presentaron una mayor exposición a las fuentes de contaminación. Los individuos control fueron 25 mujeres provenientes de la Joya de Los Sachas, en Orellana, sin antecedentes de exposición continua a genotóxicos. La técnica usada para determinar alteraciones genéticas fue el ensayo cometa. Los datos obtenidos indican que existe un mayor riesgo a padecer cáncer, malformaciones congénitas y abortos en las zonas ubicadas más cerca a la actividad petrolera, por ende con mayor exposición a factores tóxicos. La distancia al foco de exposición y la asimilación de los mismos facilita la mutación del ADN en las células, originando fallas en los sistemas de reparación.

PALABRAS CLAVE: Petróleo, genotóxicos, inestabilidad genómica, fragmentación de ADN, ensayo cometa.

ABSTRACT.- The exposition to the carcinogenic agents used in the oil industry increment the development of cancer in the Amazonian communities. According to revised health data, exposed individuals to genotoxic agents present general instability of the human genome. This instability can be measured through analysis of the

DNA fragmentation level in individuals exposed to hydrocarbons. For the present study, 23 women who live near oil activity and contamination sources, are considered to be exposed to major contamination environments. Control individuals were 25 women who live in Joya de los Sachas, in the Orellana province, without continuous exposure to genotoxics. The technique used to determine genetic alterations was the Comet Assay. The data obtained indicate that there is an increased risk of cancer, congenital malformation and abortions in the zones located closer to oil activity. The distance to the contamination source and assimilated genotoxic agents, facilitate the DNA mutation in the cells, originating failures in the repairing systems.

KEY WORDS: Oil, genotoxics, genomic instability, DNA fragmentation, Comet Assay.

INTRODUCCIÓN.- En Ecuador, el petróleo ha sido y continúa siendo, además de la fuente principal de ingreso económico, una de las amenazas más importantes hacia el ambiente y la población nativa de la región Amazónica del Ecuador. La actividad petrolera, en Ecuador, empezó en 1972 (1). En el proceso, millones de galones de petróleo y desechos tóxicos han sido eliminados directamente al ambiente, ocasionando problemas a la salud pública (2).

Desde los primeros años de la explotación petrolera en el Ecuador, las comunidades indígenas y campesinas, así como grupos ecologistas nacionales, se han organizado en oposición a la falta de regulación del desarrollo petrolero y denunciado que la contaminación ha causado un daño enorme tanto al ambiente como a la salud de la población (2, 3).

El petróleo y sus componentes pueden ingresar al cuerpo por medio de tres vías: a) absorción por la piel, b) ingestión de comida y bebida, y, c) inhalación de gases por medio de la respiración (4); además, la exposición al petróleo no está limitada al área cercana a la contaminación. Cuando el petróleo contamina el ambiente, los componentes más pesados tienden a depositarse en los sedimentos desde donde pueden contaminar repetidamente las fuentes de agua o ser consumidos por organismos que pueden entrar en la cadena alimenticia del hombre. Los componentes del petróleo más ligeros pueden evaporarse en cuestión de horas y ser depositados a gran distancia de su lugar de producción a través del aire o del agua (5).

Los hidrocarburos de gran poder toxicológico, que se encuentran presentes en el petróleo, son compuestos orgánicos volátiles, como el benceno, tolu-

no, xileno e hidrocarburos aromáticos polinucleares (6). Altas concentraciones de benceno causan síntomas neurotóxicos que desarrollan daños en la médula ósea con pancitopenia persistente y la exposición a este agente químico es una de las causas del desarrollo de leucemia y tumores de carácter hematológico (1). La exposición de agentes carcinógenos usados en la industria petrolera incrementa el desarrollo de cáncer tanto en hombres como en mujeres y niños. Se ha observado incremento en el número de casos con cáncer de pulmón, esófago, recto, piel y riñones en hombres; en mujeres se ha observado más casos de cáncer de cérvix, ganglios linfáticos y vejiga; en niños, los casos de cáncer de carácter hematopoyético han ido en aumento (1).

Las petroleras en la Amazonía Ecuatoriana

La Amazonía del Ecuador está formada por más de 10 millones de hectáreas de bosque tropical situadas en las cabeceras de la inmensa red de ríos amazónicos. La región contiene una diversidad de plantas y animales más rica del mundo, que tiene su máxima concentración en el denominado Parque Nacional Yasuní (7, 8).

En 1967, el consorcio Texaco-Gulf descubrió un rico campo de petróleo bajo el suelo amazónico ecuatoriano que condujo a un “boom” petrolero que ha modificado la región permanente-

mente. Desde entonces, compañías petroleras internacionales junto con la compañía nacional Petroecuador han extraído miles de millones de barriles de crudo de la Amazonía ecuatoriana. Las actividades de explotación petrolera incluyen diversos procesos contaminantes del ambiente. En la Amazonía del Ecuador, la explotación del petróleo ha ocasionado la apertura de caminos en el interior de la selva y cientos de miles de detonaciones en la fase sísmica que han causado la erosión de la tierra y la dispersión de la fauna. Cada pozo de exploración que se perfora produce un promedio de 4.000 metros cúbicos de desechos de perforación. Estos desechos se depositaron durante muchos años en huecos excavados en la tierra que se denominan piscinas donde por filtración, sobreflujo o directamente, son eliminados al ambiente (3); en la actualidad suelen depositarse, sin aislamiento o tratamiento alguno, en las plataformas de los mismos pozos.

Si se encuentran cantidades de petróleo comerciales, comienza la fase de producción. Durante esta fase, el petróleo se extrae mezclado con agua de formación y gas y se lleva a una central de separación. En esta central, más de 4,3 millones de galones de líquidos de desechos se generan cada día y se eliminan sin tratamiento a las piscinas. Aproximadamente, millones de pies cúbicos de gas procedentes del proceso de separación se queman diariamente

en la Amazonía ecuatoriana. Este gas se quema sin ningún tipo de control de la temperatura o de las emisiones contaminándose el aire con un gran número de sustancias tóxicas (7). Las actividades de mantenimiento en los más de 1.000 pozos de producción de la Amazonía Ecuatoriana descargan cada año aproximadamente 5 millones de galones de desechos tóxicos no tratados en el ambiente. Los escapes y derrames de los pozos y tanques son también habituales (9).

Los daños genéticos y el petróleo

En 1994, el Centro de Derechos Económicos y Sociales publicó un informe documentando peligrosos niveles de contaminación por petróleo en los ríos del nororiente ecuatoriano. En ese estudio, se encontraron concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en las aguas utilizadas para beber, bañarse o pescar de 10 a 10.000 veces superiores a los límites permitidos por la Agencia de Protección Medio Ambiental de los Estados Unidos. En ese mismo informe se reportaron numerosos problemas de piel (dermatosis) entre la población local aparentemente relacionados con la contaminación petrolera. Asimismo, el gobierno ecuatoriano fue acusado de violación de los derechos humanos (5).

La relación entre exposición a agentes químicos y cáncer se inicia con una observación efectuada por el médico

británico Percival Pott, en cuyos resultados publicados en 1775 describe una prevalencia del cáncer genital en individuos expuestos al hollín (10).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son un grupo numeroso de sustancias que, químicamente, son derivados poliméricos del benceno. Históricamente fueron los primeros agentes químicos en ser reconocidos como causantes de tumores malignos en humanos (11) y actualmente se ha correlacionado la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos con el desarrollo de cáncer pulmonar (12, 13, 14).

Según datos de salud revisados, se ha observado que los individuos expuestos a los compuestos volátiles de los hidrocarburos presentan síntomas leves como irritación de la piel, comezón, irritación de los ojos, náusea, mareo, vértigo y dolor de cabeza (15). De la misma forma, la exposición a agentes genotóxicos produce una inestabilidad general del genoma humano que puede ser evaluada por medio del estudio de cromosomas o de genes involucrados en daño genético a través del análisis del nivel de fragmentación del ADN en individuos expuestos a los hidrocarburos. A nivel cromosómico los agentes genotóxicos producen roturas e inestabilidad cromosómica. Medir el porcentaje de presentación de estas alteraciones citogenéticas constituye un método confiable de biomonitorización de población expuesta (1).

Muchas actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de xenobióticos humanos son sujetas a polimorfismos genéticos y se han reportado los estudios de asociación entre la susceptibilidad al cáncer y la presencia de estos polimorfismos (1). Otros factores que influyen la respuesta a los xenobióticos y el daño que puede ser inducido en el ADN son los genes de reparación (1).

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto genético en los individuos que viven en las comunidades que se encuentran en las cercanías de la actividad petrolera, reportadas en los Bloques 7 y 21, y localizadas en la provincia de Orellana; además de relacionar la distancia entre los focos de contaminación y las viviendas de los individuos con el daño genético presente en las células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio

Las comunidades seleccionadas para el estudio como afectadas por la contaminación petrolera fueron: Los Vencedores, 15 de Abril, Asociación Payamino y Flor de Manduro en la provincia de Orellana, reportadas como comunidades influenciadas por las actividades petroleras en los Bloques 7 y 21 (16). Estas muestras fueron comparadas con un grupo control con características geográficas similares, localizada dentro de la misma provincia a más de diez kilómetros de

la actividad petrolera en el cantón de la Joya de los Sachas.

Población de estudio y obtención de las muestras

La población de estudio consiste en 23 mujeres que viven cerca de la actividad petrolera. De las cuales, ocho provienen de la comunidad de Los Vencedores, siete de la comunidad Flor de Manduro y ocho de las comunidades Payamino–15 de Abril; a estas últimas se les ubicó en un mismo grupo ya que ambas comunidades se encuentran muy cerca una de la otra. Las comunidades fueron escogidas porque suponen mayor exposición a contaminantes debido a que los focos de emisión se encuentran en los alrededores de las mismas.

Los individuos control fueron 25 mujeres provenientes de la Joya de Los Sachas en Orellana, sin antecedentes de exposición continua a genotóxicos. El grupo de exposición a petróleo tiene una media de edad de 36,4 años frente a los 37,5 de edad media del grupo control en la Amazonía ecuatoriana. El rango de edad de los individuos afectados se encuentra entre los 3 y 72 años, mientras que en el grupo control el rango se encuentra entre los 21 y 71 años de edad. Se realizaron historias clínicas y se obtuvieron muestras de sangre periférica para los análisis genéticos de los individuos de estudio y los individuos control.

Análisis genético

Ensayo cometa – Electroforesis en gel alcalino de células individuales

La técnica del ensayo cometa es un método relativamente rápido y simple para la detección del daño de ADN *in vivo* (17, 18), debido a la exposición de factores como rayos X, pesticidas, hidrocarburos (17, 19, 20). La prueba

un filtro de 515-560nm de excitación. El daño es clasificado por medio de 6 categorías predefinidas (de la A hasta F) dependiendo del nivel de fragmentación del ADN presente en la cola del cometa, siendo A: sin daño, B: bajo nivel de daño, C: nivel medio de daño, D: alto nivel de daño, E y F: daño total (Figura 1).

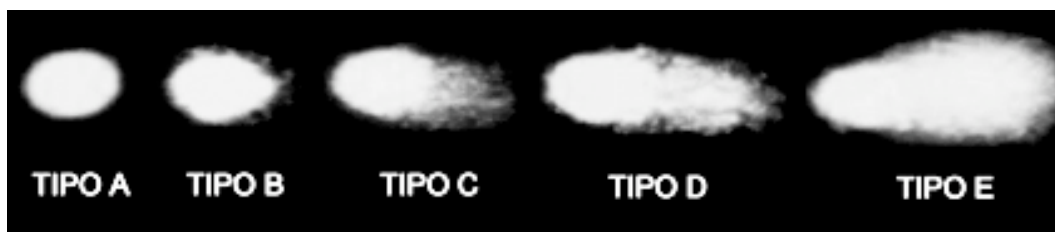


Figura 1. Tipos de núcleos observados en el ensayo cometa. El tamaño de la cola determina la cantidad ADN fragmentado.

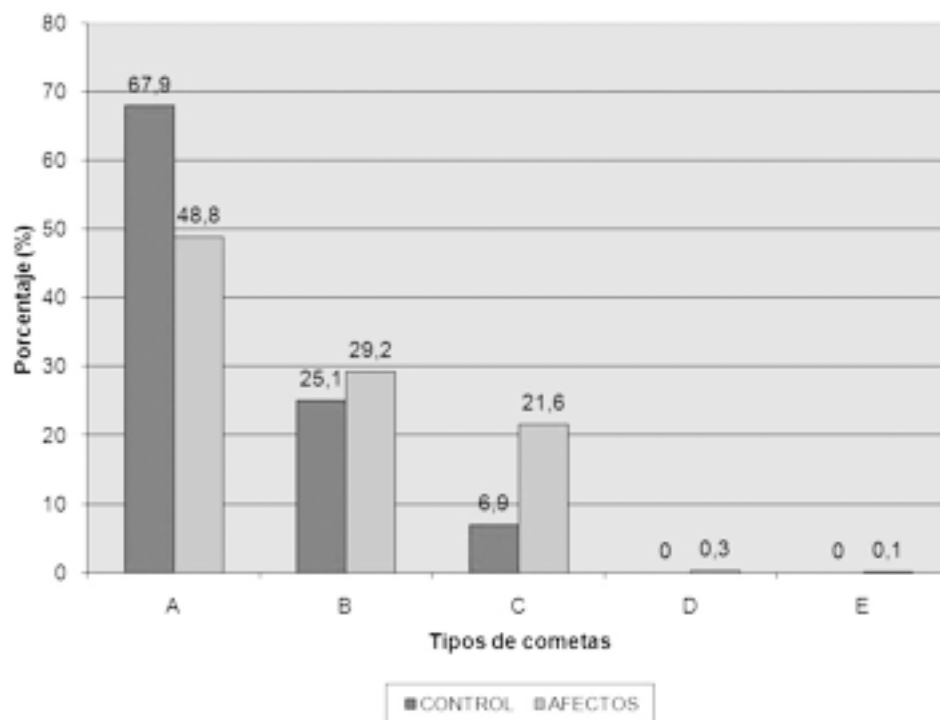
consiste en someter los leucocitos sanguíneos a un campo eléctrico. Si no hay daño celular el material genético no se altera y los núcleos celulares se mantienen circulares. Conforme se incrementa el daño al material genético, los núcleos celulares se van deformando por el desplazamiento de los fragmentos de las cadenas y van adquiriendo una forma de cometa estelar, de ahí su nombre, que en función del daño tendrá mayor o menor extensión de la dispersión (16).

Las muestras fueron analizadas por medio de la técnica descrita por Singh y colaboradores (17) con implementaciones realizadas en otras investigaciones (20, 21). Las placas fueron analizadas usando un microscopio de fluorescencia con una lámpara de mercurio y

RESULTADOS

Comparando los grupos expuestos y los control es a la actividad petrolera, se observa un incremento notable del cometa tipo C en el grupo de expuestos (21,6% daño medio), D (0,3% daño alto) y E (0,1% daño muy alto) que están presentes en una media del 22%, lo que significa tres veces más fragmentación del ADN que el grupo control de la Amazonía (Figura 2).

Se observa que en las comunidades donde existe mayor contaminación, como son en Los Vencedores y Flor de Manduro, existe una mayor cantidad de cometas tipo B y C. Los cometas tipo C se encuentran con mayor frecuencia en la población de Los Vencedores (Figura 3) y los cometas tipo B en la población



* n = Número de individuos

Figura 2. Relación entre afectados y grupo control. Los valores observados corresponden a la media de los resultados observados.

de Flor de Manduro y Joya de los Sachas (Figuras 4, 5). Mientras que la comunidad Payamino 15 de abril presenta mayor porcentaje de cometas tipo A (Figuras 6).

Se observa una relación entre la distancia de las viviendas de los individuos afectados con las fuentes de contaminación (mecheros) y los daños celulares registrados por el ensayo. Los individuos fueron agrupados en 3 categorías de acuerdo a la distancia de la que se encuentran de los focos de con-

taminación: distancia menor a 250 m, de 251 a 500 m y de 501 a 1.500 m.

Conforme los individuos se encuentran más lejos de los focos de contaminación se observa que la cantidad de cometas tipo C analizados también disminuye, pasando de 49,5 % presente en individuos que viven a una distancia menor a 250 m, a 24,2 % y 14 % observados en individuos que viven a una distancia de 251 a 500 m y 501 a 1.500 m, respectivamente (Figura 7). Usando una escala de distancia más precisa (de

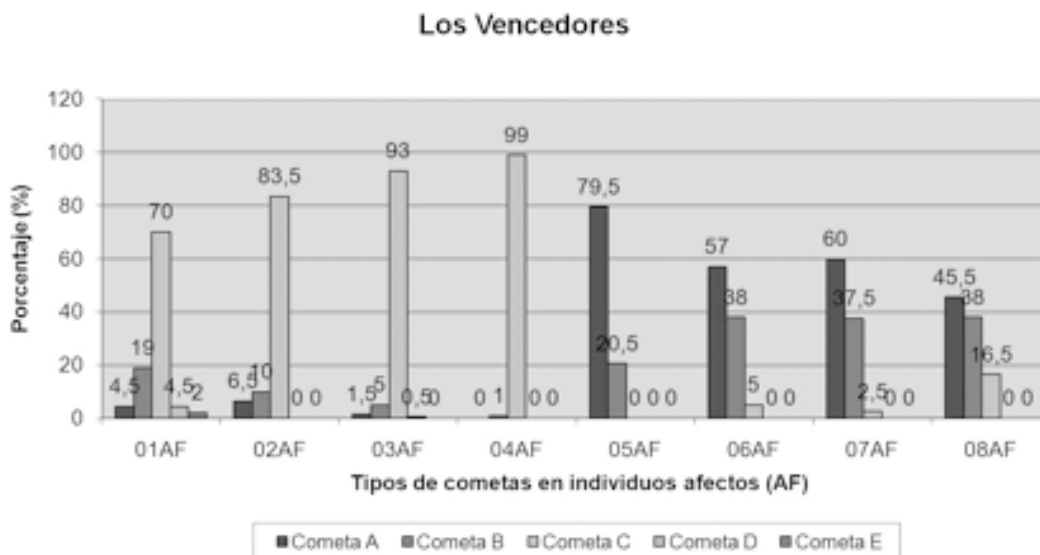


Figura 3. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos afectados de la comunidad Los Vencedores.

375 a 3 025 m), se observa que la cantidad de cometas tipo A presentes en la población estudiada van en aumento conforme los individuos viven más lejos de los focos de contaminación (6,5% de cometas A en una distancia de 375 m y 72% de cometas A en una distancia de 3.025 m; Figura 8).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La evidencia científica indica que los individuos expuestos a hidrocarburos presentan mayor riesgo mutagénico y carcinogénico (1). Los individuos que están expuestos a los agentes químicos usados en la indus-

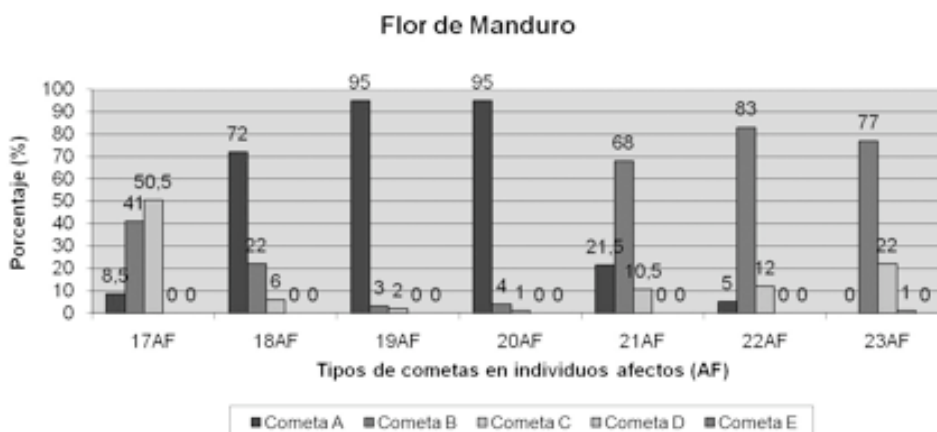


Figura 4. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos afectados de la comunidad Flor de Manduro.

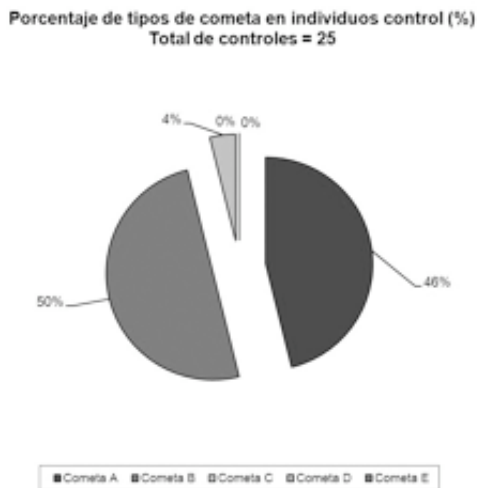


Figura 5. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos control de Joya de los Sachas

tria petrolera presentan ligeros, pero frecuentes síntomas de fatiga, micosis cutánea, dolores de cabeza, dermatitis, irritación nasal y ocular, gastritis, náusea y diarrea (1). El ensayo cometa es una técnica muy sensible a los cambios o alteraciones de una o de las dos cadenas de ADN, sobre las cuales

ha actuado el agente genotóxico. La genotoxicidad es la facilidad para producir alteraciones en el material genético y por lo tanto aumenta la propensión al cáncer, a las mutaciones y alteraciones en el embrión que pueden acabar en abortos (22).

Los datos indican que existe un mayor riesgo a padecer cáncer, malformaciones congénitas y abortos en las zonas ubicadas más cerca a la actividad petrolera, por ende con mayor exposición a factores tóxicos. Comparando estos resultados con los obtenidos en un estudio realizado en trabajadores petroleros de la comunidad de San Carlos en la provincia de Orellana, Ecuador, se observa que la exposición a hidrocarburos afecta directamente al daño del ADN en las células (1).

La presencia de cometas tipo C en las células de los individuos que se

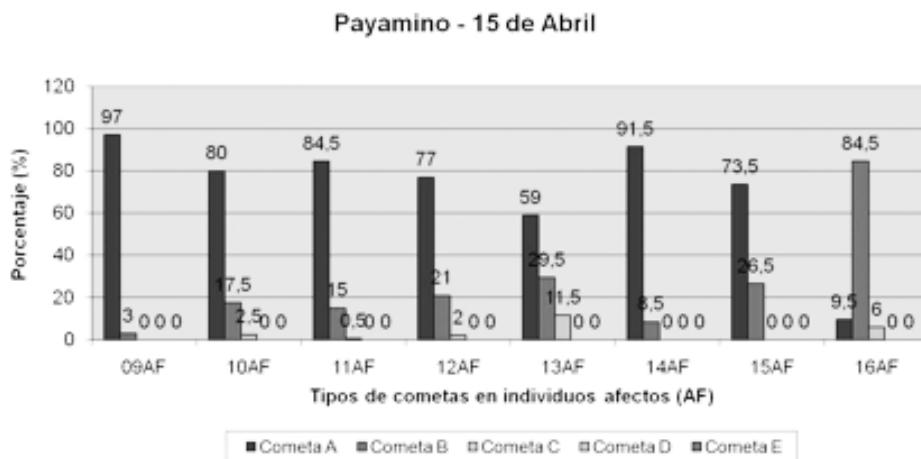


Figura 6. Porcentaje y tipos de cometas en los individuos afectados de la comunidad Payamino 15 de Abril.

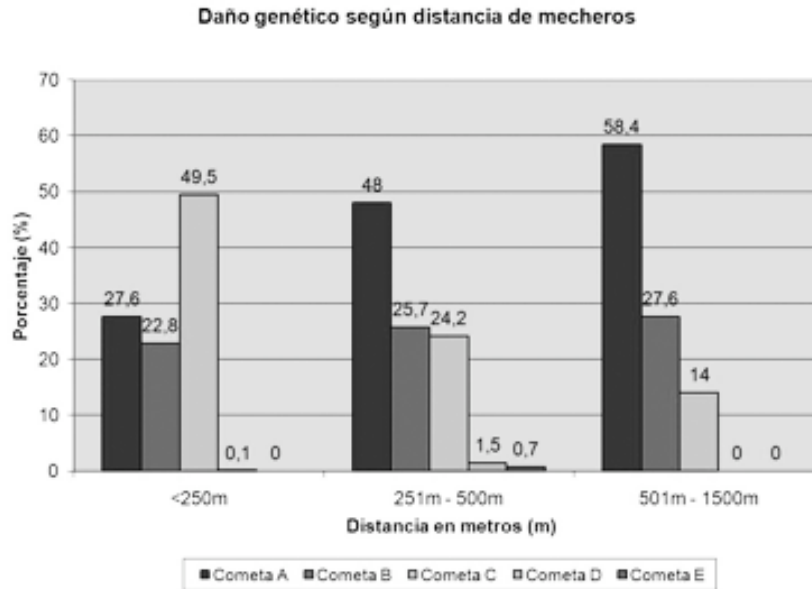


Figura 7. Daño genético observado en cometas, de acuerdo a la distancia de la fuente de contaminación (mecheros).

encuentran expuestos a contaminantes hidrocarbúricos indican daño genético medio en la población afectada. Los individuos que viven más cerca de los focos de contaminación o mecheros presentan una mayor cantidad de daño genético (como cometas tipo C) a diferencia de los individuos que viven más lejos de los focos de contaminación que no presentan daño genético (cometas tipo A) o daño genético bajo (cometas tipo B). Este dato sugiere que la distancia está relacionada con una mayor exposición a agentes contaminantes.

La distancia al foco de emisión de agentes genotóxicos y la asimilación de los mismos facilitan la mutación del ADN en las células, originando fallas en los sistemas de reparación (1). En el

estudio realizado en San Carlos, se relaciona los resultados de individuos expuestos a hidrocarburos con polimorfismos del gen *MSH2*, en el cromosoma 13, encargado de la reparación de nucleótidos mal pareados en el ADN (1). Los resultados obtenidos en ese estudio demuestran que los individuos expuestos a hidrocarburos y los polimorfismos en los genes tienen una mayor susceptibilidad mutagénica, carcinogénica y teratogénica (1), lo que nos permite suponer que las comunidades que viven cerca de los focos de contaminación presentes en los Bloques 7 y 21 pueden presentar alteraciones genéticas.

Los derrames de petróleo y de desechos tóxicos en el ambiente sin tratamiento son problemas graves en el

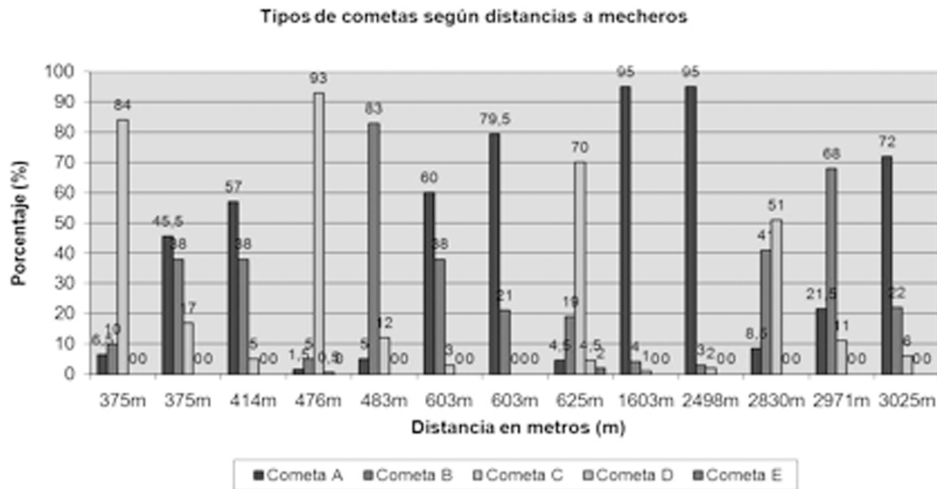


Figura 8. Cometas según distancia a la fuente de contaminación (mecheros).

Ecuador. No existe una legislación clara que proteja a los habitantes de las cercanías de los campos de explotación, ni al ambiente de la selva ecuatoriana. Se deben desarrollar programas de control de explotación de recursos hidrocarbúricos, productos primarios y secundarios derivados del petróleo y desechos generados por la explotación petrolera para disminuir el impacto de la misma en la Amazonía a nivel ambiental, sanitario y social.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paz-y-Miño C., López-Cortés A., Arévalo M., Sánchez M. 2008. Monitoring of DNA damage in individuals exposed to petroleum hydrocarbons in Ecuador. *Annals of the New York Academy of Science (NYAS)* 1140, 121-8.
2. Kimmerling J., Henriksen S. 1991. *Amazon crude*. Natural Resources Defense Council. New York, USA.
3. Jochnick C., Normand R., Zaidi S. 1994. Rights violations in the Ecuadorian Amazon: The human consequences of oil development. The Center for Economic and Social Rights.
4. San Sebastián M. 2000. Informe Yana Curi – Impacto de la actividad petrolera en poblaciones rurales de la Amazonía Ecuatoriana. Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria “Manuel Amunárriz”. Ecuador.
5. Centro de Derechos Económicos y Sociales (CDES). 1994. Violaciones de derechos en la Amazonía Ecuatoriana. *Hombre y ambiente*. Abya Yala. Quito, Ecuador.

6. ARC. 1989. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: Occupational exposures to petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels. International Agency for Research on Cancer Vol 45. Lyon, France.
7. Hurtig AK., San Sebastián M. 2002. Cáncer en la Amazonía del Ecuador (1985-1998). Instituto de Epidemiología y Salud Comunitaria "Manuel Almunárriz". Coca, Ecuador.
8. Bass M., Finer M., Clinton N., Kreft H., Cisneros-Heredia D., McCracken S., Pitman N., English P., Swing K., Villa G., Di Fiore A., Voigt C., Kunz T. 2010. Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PLoS One* 5(1), e8767.
9. Almeida A. 2000. Reseña sobre la historia ecológica de la Amazonía Ecuatoriana. En: Martínez E. (ed.). Ecuador post petrolero. Acción Ecológica. Quito, Ecuador.
10. Vives I., Grimalt J., Guitart R. 2001. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología. Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE)* 3, 45-51.
11. Ortiz P., Varea A. 1995. La explotación petrolera en el Ecuador: historia e impactos socioambientales. Marea negra en la Amazonía: Conflictos socioambientales vinculados a la actividad petrolera en el Ecuador. Abya-Yala. Quito, Ecuador.
12. IARC. 1983. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: Polynuclear aromatic hydrocarbons. International Agency for Research on Cancer Vol 34. Lyon, France.
13. Mastrangelo G., Fadda E., Marzia V. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspectives* 104(11), 1166-1170.
14. Nadon L., Siemiatycki J., Dewar R., Krewski D., Gerin M. 1995. Cancer risk due to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *American Journal of Industrial Medicine* 28, 303-324.
15. Campbell D., Cox D., Crum J., Foster K., Christie P. 1993. Initial effects of the grounding of the tanker Braer on health in Shetland. *British Medical Journal* 307(6914), 1251-1255.
16. Maldonado A., Saravia A., Valladares C., Álvarez S., Bonilla M., Maldonado P., Supliguicha V. 2008. Estudio del Impacto de la Actividad Petrolera de Perenco en el Bloque 7 de la Región Amazónica Ecuatoriana. Acción Ecológica. Quito, Ecuador.

17. Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1), 184-91.
18. Monroy C., Cortes A., Sicard D., de Restrepo H. 2006. Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate. *Biomedica* 25(3), 335-45.
19. Leroy T., van Hummelen P., Anard D. 1996. Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 47(5), 409-422.
20. Paz-y-Miño C., Sánchez M.E., Arévalo M., Muñoz M.J., Witte T., Oleas De-la-Carrera G., Leone P. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology* 30(2), 456-460.
21. Paz-y-Miño C., Dávalos V., Sánchez M.E., Arévalo M., Leone P. 2002. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 516 (1-2), 57-61.
22. Paz-y-Miño C., Bustamante G., Dávalos V., Burgos R., Pérez J., Sánchez M.E., Leone P. 2000. Monitoreo citogenético en población ecuatoriana expuesta ocupacionalmente a pesticidas. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas* 25(1), 15-21.