



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Evaluación de daño genotóxico en un grupo de mujeres fumadoras que asisten a la clínica Anti-tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).”

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
ROGACIANO ANTONIO SÁNCHEZ REYES**



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN EZQUERRO**



MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A mi mamá y papá, por su amor y apoyo en todo momento y por haber conformado la familia que somos y que la vida me los conserve por más tiempo. Gracias

A mis hermanas(os): Felipe, Leticia, Marilú, Graciela, Edson e Iguazú por ser lo que son y significan en mi vida.

A Selene por el amor que me ha dado.

A mis compañeros de laboratorio:
Emmanuel, Erika, Carolina, Ivonn, César, Rocio, Ana Vianey, Rodrigo, Martha, Conny, Alex; a la Sra. Emma y Vicky.

A Javier Contreras por su invaluable amistad.

A mis amigos y maestros.

A todos aquellos que me incentivaron.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen Calderón por haber asesorado este trabajo y por ser como es.

A la Dra. Sandra Gómez por sus sabios consejos y entereza.

Al M. en C. Med. Raúl Sansores quien ha vinculado el trabajo de clínica con la ciencia básica.

A la Dra. Josefina Cortés por sus acertadas sugerencias.

A la M. en C. Ana Rosa Flores por incentivar esta tesis.

A todos ellos por la revisión de la misma.

Al Dr. Rafael Villalobos y al Químico Raúl Belmont por la asesoría estadística.

A la Bióloga Selene Andrade por su asesoría y apoyo técnico.

A la Pasante de Biología. Erika Arroyo por su apoyo técnico.

A la Psicóloga Marlene Espinoza por su apoyo en el trabajo de la clínica anti-tabaco

Al Laboratorio de Citogenética Ambiental.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera.

A la Clínica anti-tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y personal que labora en esa institución y a los pacientes que voluntariamente participaron en este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“ Evaluación de daño genotóxico en un grupo de mujeres fumadoras que asisten a la Clínica anti-tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).”

realizado por Rogaciano Antonio Sánchez Reyes

con número de cuenta 8211164-5, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Directora de Tesis

Propietario Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro

Propietario Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Propietario M. en C. Med. Raúl Humberto Sansores Martínez

Suplente M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

Suplente Dra. Josefina Cortés Eslava

[Handwritten signatures of the listed individuals]

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN.....	5
1.0 INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Composición química y efectos en la salud.....	9
1.2 Epidemiología.....	10
1.3 Antecedentes.....	12
1.4 Sistema de prueba.....	18
1.5 Intercambio de cromátidas hermanas.....	19
1.6 JUSTIFICACIÓN.....	21
1.7 OBJETIVOS GENERALES.....	23
1.8 HIPÓTESIS.....	23
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 Prueba citogenética aplicada.....	25
2.2 Trabajo de laboratorio.....	26
2.3 Cosecha de linfocitos.....	26
2.4 Tinción diferencial.....	27
2.5 Cinética de Proliferación Celular.....	28
2.6 Análisis estadístico.....	29
3.0 RESULTADOS.....	29
4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	32
5.0 REFERENCIAS.....	38
5.1 TABLAS.....	61
5.2 ANEXO.....	66

RESUMEN

En este estudio, se evaluó el efecto genotóxico causado por humo de tabaco en 25 mujeres fumadoras que acuden a la Clínica Anti-tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la Ciudad de México.

El análisis citogenético se realizó mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de sangre periférica. Determinando también la cinética de proliferación celular (CPC), y los índices de replicación (IR) e índice mitótico (IM). Los resultados indicaron al aplicar la prueba estadística "t" de Student, que no hubo diferencia significativa entre la frecuencia de ICH, en el 41% de las mujeres en las que fue posible determinarlos y sus testigos correspondientes. Asimismo, al aplicar la prueba de Sperman no se observó correlación entre la frecuencia de ICH y la edad, el número de cigarros fumados por día, ni el tiempo fumando, así como tampoco entre la edad vs el número de cigarros fumados por día, ni edad vs tiempo fumando. Sin embargo, sí se registraron diferencias al comparar con la prueba de X^2 , el IM ($p < 0.01$) y la CPC ($p < 0.001$); y con la "t" de Student el IR (0.0001), entre las mujeres fumadoras y las no fumadoras.

Los resultados registrados para la CPC evidenciaron un claro retraso en el ciclo celular de las mujeres que fumaron con respecto a las que no presentaron dicha adicción, por lo que se cree que los agentes químicos que están presentes en el humo del tabaco, posiblemente afectan, tanto el proceso como la regulación del ciclo celular, principalmente de linfocitos, como el de diversas vías bioquímicas celulares (falta de respuesta a mitógenos y/o que el daño al ADN no sea tan severo).

1.0 INTRODUCCIÓN

El tabaco es originario de América y proviene de la planta *Nicotiana tabacum*, arbusto de hojas verdes grandes, de textura vellosa y pegajosa con sabor amargo, sus flores son de color blanco, amarillo y violeta. Se utiliza en agricultura como insecticida y en la industria química como fuente de ácido nicotínico. Para la industria tabacalera es la materia prima, por lo cual se ha incrementado su cultivo, llegando a ser una de las fuentes principales de ingreso para algunos países (Secretaría de Salud, 2001).

El humo que es expelido al fumar, proviene de la combustión del tabaco. En el extremo del cigarrillo que se está quemando se alcanzan temperaturas próximas a los 1000 °C, lo que transforma numerosos componentes originales de la planta y genera complejas reacciones químicas siendo una mezcla de residuos sólidos y gases disueltos, con aproximadamente 4,700 tipos diferentes de productos químicos. Entre los principales compuestos químicos que conforman la fase de partícula del humo del tabaco se encuentran el alquitrán y la nicotina. Mientras que en la fase de gas, se hallan compuestos como dióxido de nitrógeno (NO₂), monóxido de carbono (CO), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), aminas heterocíclicas (AH), formaldehídos y nicotina, entre otros (Hoffmann *et al.*, 1976; Yamashita *et al.*, 1986, IARC, 1991).

En la tabla 1 se indican algunos de los principales componentes del humo de tabaco y la concentración media por cigarrillo de algunos de ellos (Surgeon General, 1979; USDHHS, 2000).

Dentro de las (AH) que se desprenden en el humo se encuentra la (Hidroquinona) HQ, el 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido [4,3-b] indol, el 3-amino-1-metil-5H-pirido [4,3-b] indol, el 2-amino-9H-pirido [2,3-b] indol, el 2-amino-3-metil-9H-pirido [2,3-b] indol, y la 2-amino-1-metil-6-fenil-imidazo [4,5-b] piridina, las cuales han mostrado ser mutagénicas y carcinogénicas (Castonguay *et al.*, 1983). Una de las nitrosaminas más importantes en el humo de tabaco es 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), ya que puede ser reducida a 4-

(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL) clasificada como carcinógena en roedores (Castonguay *et al.*, 1983; Rivenson *et al.*, 1988). Aunque ambas en su forma oxidada no son genotóxicas, sí lo son cuando son hidroxiladas en el carbono metil o metileno formando grupos nitrosos que son compuestos electrófilos que reaccionan con macromoléculas biológicas, incluyendo proteínas y ADN (Castonguay *et al.*, 1991). Asimismo, se ha descrito que en hígado de rata el fosfato dinucleótido adenosina (ADP) forma aductos con NNK y NNAL (Peterson *et al.*, 1994; Staretz *et al.*, 1997). Otros estudios reportan que en la mucosa bucal la NNK es reducida a NNAL (95-99%), además de ser metabolizada por α -hidroxilación (0.6-3.8%) y por oxidación N-piridil (0.3-2.2%) (Sundqvist *et al.*, 1993).

Algunos de los componentes del humo de cigarro han sido reconocidos como sustratos o inhibidores competitivos del citocromo P450. Por ejemplo, Murphy y Heiblum (1990) señalaron que NNK y NNN son inhibidas por la presencia de nicotina y Lee y colaboradores (1996) demostraron que la mutagenicidad de NNK fue disminuida significativamente por el extracto acuoso del humo de tabaco, debido a los alcaloides piridina que se encuentran en este, como la nicotina.

En estudios para determinar el posible efecto mutagénico causado por el humo del tabaco, a través del ensayo de Ames que utiliza a *Salmonella* en presencia de la fracción S9, se estableció que la nicotina y la cotinina en concentraciones de 0.1 y 2.5 μ M, respectivamente, inhiben la activación metabólica de N-nitrosaminas, resultando en una reducción en los niveles de NNK (4-hidroxi.-1-(3-piridil)-1-butanona (HPB)) formadores de aductos con la hemoglobina (Brown *et al.*, 2001).

En relación a los HAP, se encuentran el antraceno, benzo(a)pireno y benzo(a) antraceno (IARC, 1986; Yamashita *et al.*, 1986; Kanai *et al.*, 1990; Manabe *et al.*, 1991) y se ha descubierto que varios de estos compuestos son metabolizados y llegan a producir aductos con el ADN e inducir alteraciones cromosómicas (Sorsa *et al.*, 1984; Kado *et al.*, 1985; Peluso *et al.*, 1990).

El individuo que fuma diariamente una cajetilla de cigarrillos recibe 0.38 mg de formaldehído que puede irritar los ojos, nariz y garganta (Kandarjian, 1989). Los otros agentes tóxicos citados son parcialmente responsables de la constricción bronquial, tos, disminución de la capacidad que tienen los pulmones de filtrar y limpiar el aire inhalado y otras alteraciones del aparato respiratorio. Asimismo, el monóxido de carbono (CO) constituye del 3 al 6% del humo inhalado. Éste es un gas que, debido a su afinidad con la hemoglobina de la sangre desplaza al oxígeno, lo que afecta adversamente la realización de ejercicio físico en pacientes cardíacos y personas saludables. De aquí que sea posible, que la exposición a éstos ocasione daño a corto plazo en el corazón, vía carboxihemoglobina o trombosis (Glantz y Parmely, 1991).

El agente químico benzo(a)pireno presente en el humo del cigarrillo es sometido en el hígado a una activación metabólica que lo transforma en un potente agente mutagénico que produce, sobre todo, mutaciones por transversión G o T. Cuando se aplica a células epiteliales bronquiales cultivadas, el benzo(a)pireno induce mutaciones inactivadoras en los codones 175, 248 y 273 del gen *p53*; estas mismas posiciones son puntos importantes de mutación para desarrollar un posible cáncer de pulmón. En consecuencia, hay una relación directa entre un agente químico carcinógeno definido en el humo de cigarrillo y el cáncer humano; es probable que dicho humo también cause mutaciones en otros genes (Conf. Clinicopat., 1999).

La nicotina es un alcaloide líquido, oleoso e incoloro ($C_{10}H_{14}N_2$) y una amina terciaria que está compuesta de dos anillos, uno de piridina y otro de pirrolidina. La nicotina es liberada del tabaco conforme se consume y viaja en el aire en forma de vapor y en partículas de alquitrán. La absorción de ésta es a través de las membranas biológicas debido a que es una base débil y por lo tanto se absorbe con facilidad en medios alcalinos. Cuando el humo del tabaco alcanza los alvéolos, ésta se absorbe rápidamente debido a dos factores: la enorme superficie que ofrecen los alvéolos y el pH fisiológico que permite su rápida absorción, además de ser una sustancia farmacológicamente activa y de doble efecto: estimulante y sedante. Asimismo, es la principal responsable de la

adicción, debido al estímulo placentero que produce al activar la vía dopaminérgica a través de los receptores colinérgicos y nicotínico del sistema nervioso central (USDHHS, 1988).

El consumo de nicotina en grandes dosis puede paralizar el sistema nervioso autónomo, impidiendo la transmisión de impulsos a través de los espacios intercelulares de las neuronas (espacios sinápticos), en dosis mayores puede provocar convulsiones y la muerte (Secretaría de Salud, 2001). Del mismo modo, el sistema genitourinario está expuesto a las toxinas del humo del tabaco por la excreción de compuestos incluso carcinógenos en la orina, (Sorsa *et al.*, 1984; Peluso *et al.*, 1990).

Algunos agentes carcinógenos se someten a una transformación metabólica en sus formas activas y cierta evidencia indica que los genes que determinan el metabolismo, tal vez sean susceptibles al humo de tabaco (Conf. Clinicopat., 1999).

1.1 Composición química y efectos en la salud

Los efectos del tabaquismo en la salud, han sido intensamente investigados desde mediados del siglo XX; acumulándose evidencia de que el hábito de fumar, produce enfermedades y otros efectos adversos en la salud de las personas de todas las edades y de ambos géneros (USDHHS, 1989).

La presencia de los diversos componentes químicos del humo de tabaco en el aire de ambientes intramuros, provoca efectos variados en los organismos expuestos. El alquitrán, cuyo término se ha utilizado para denominar a todos los componentes de la fase de partícula del humo del tabaco, contiene más de cuarenta sustancias cancerígenas (USDHHS, 2000). Mientras que el dióxido de nitrógeno (NO_2), al ser inhalado produce irritación en los pulmones causando alteraciones bioquímicas e histológicas. Algunos estudios (Jenkins y Gill, 1980; Norman *et al.*, 1983; ASHRAE, 1989) han revelado que del 80 al 90% de NO_2 de la atmósfera es absorbido en los pulmones por inhalación, observándose efectos severos en sujetos saludables que estuvieron expuestos a concentraciones

mayores de 2 ppm, mientras que en los susceptibles y en personas asmáticas los daños se registran al inhalar concentraciones de 0.1 y 0.5 ppm, respectivamente; además de provocar infecciones respiratorias. Algunos estudios, también mostraron que los niños son más propensos a padecer resfriado y tos cuando se exponen a este contaminante (EPA, 1990).

Actualmente, está plenamente demostrado que el tabaquismo tiene, como cualquier otra adicción, un origen multifactorial y que constituye una enfermedad prevenible que se relaciona con distintos tipos de cáncer: laringe, cavidad bucal, pulmón, vejiga, riñón y páncreas, entre otros. Así como cardiopatía isquémica, enfermedades vasculares, cerebrales, enfisema pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastorno en el estado de ánimo (depresión) y sueño e incremento en la mortalidad (Salín-Pascual y Drucker Colín, 1998 ; Secretaría de Salud, 2001).

1.2 Epidemiología

Plano Mundial

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que actualmente hay cerca de 1100 millones de fumadores alrededor del mundo; de ellos 300 millones viven en países desarrollados (Kuri, 1995., Secretaría de Salud, 1995).

El consumo de cigarrillos en el área de las Américas entre 1990 y 1995 muestra una tendencia decreciente en la región norte del continente donde se encuentran los Estados Unidos y Canadá, mientras que en las regiones del Centro y Sudamérica, por el contrario, se observa un ligero crecimiento en la demanda, sin llegar a los niveles de consumo de los países antes mencionados (ACS, 2000).

En los países del Cono Sur se manifiestan los consumos más elevados y cierta tendencia en los indicadores que sugieren su estabilidad (OPS, 2000).

Plano Nacional

Los estudios reportados en países como México son principalmente, de tipo epidemiológico, éstos han dado evidencia de que los daños a la salud por consumo de tabaco, tienen una clara relación con el aumento de morbilidad y mortalidad (Secretaría de Salud, 2001). Sin embargo han sido pocas las evaluaciones realizadas sobre la determinación de los efectos en salud, mediante pruebas de genotoxicidad realizadas directamente con fumadores activos y/o pasivos (Rojas *et al.*, 1996).

En México, los fumadores aumentaron de 9.2 millones en 1988 a 14.3 millones en 1998 y se estima que anualmente se presentan más de 6 mil muertes por cáncer de pulmón y más de 12 mil por cardiopatía, causadas directamente por el hábito de fumar (Kuri y Alegre, 2002; Salazar *et al.*, 2002).

En las últimas décadas se ha observado en el país un descenso en la mortalidad producto de enfermedades infectocontagiosas, modificándose las principales causas de muerte (Secretaría de Salud, 2001).

El tabaquismo se ubica dentro de las patologías que requieren más atención, ya que en México se estima que 122 personas mueren diariamente por causas asociadas al tabaco (Secretaría de Salud, 2001).

Desde 1980 las enfermedades del corazón, constituyen la primera causa de mortalidad y para 1998 representó el 15.4% de todas las defunciones; más de la mitad de estos casos (62.4%) corresponden a cardiopatía isquémica, patología asociada directamente con el tabaquismo. La tasa de muerte por cáncer de pulmón ha aumentado en ambos sexos durante los últimos años, en una relación de 2.5 hombres por una mujer. En 1992 y 1998 la mortalidad por tumores malignos en labio, cavidad bucal y faringe se incrementó, alcanzando 735 en el último año (Secretaría de Salud, 2001).

Las estadísticas nacionales de fumadores indican que la región centro (Aguascalientes, Guanajuato, Nayarit, Querétaro, Colima, Hidalgo, Zacatecas, Jalisco, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Estado de México y Distrito Federal) tiene una prevalencia de 32.3%, la región norte (Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Durango, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí y

Nuevo León) de 26.5% y la región sur (Michoacán, Guerrero, Veracruz, Tabasco, Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Oaxaca y Chiapas) de 18.5%, comparadas con un promedio nacional de 27.7% (Secretaría de Salud, 2001).

Respecto al género, 42% de los varones fuma, en comparación con 16.3% de mujeres. Según la Encuesta Nacional contra las Adicciones de 1998, el grupo con mayor prevalencia es el del 18 a 29 años de edad (38.1%), demostrando que, conforme avanza la edad, el consumo de tabaco disminuye a 11.2% en el grupo de 50 a 65 años (Secretaría de Salud, 2001):

En cuanto a la distribución de fumadores en población de 12 a 65 años según edad y escolaridad, se ha descrito que, para el grupo de 18 a 29 años de edad con escolaridad secundaria es de 34.4%, para el grupo comprendido entre 40-49 años con primaria la prevalencia es de 39.3% y en el de 50-65 años con primaria es de 60.1% (Secretaría de Salud, 2001).

Diversas investigaciones han demostrado el posible daño causado por este contaminante mediante biomonitorio genotóxico, lo que ha permitido implementar medidas de prevención y/o control de diversas enfermedades atribuibles al humo de tabaco.

Por lo anterior, es importante continuar realizando estudios sobre los efectos provocados por el humo del tabaco en la salud de la población.

1.3 Antecedentes

Algunas formas de exposición a mutágenos químicos se da de manera cotidiana por la dieta, por agentes químicos sintéticos (pesticidas, colorantes de cabello, cosméticos y drogas) y por mezclas complejas (contaminantes en el aire y agua).

Los mutágenos ambientales que se conocen y que pueden llegar a causar cáncer en el humano incluyen humo de cigarro, luz ultravioleta, rayos X y asbestos. entre otros (Ames, 1979).

Se tiene conocimiento de que el hombre comienza su exposición al humo de tabaco, por el año de 1900, aunque el cáncer de pulmón es detectado 25

años después. Mientras que, las mujeres empiezan a fumar alrededor de la segunda guerra mundial, ascendiendo su consumo al igual que la enfermedad (Ames, 1979).

La actividad mutagénica causada por la exposición al humo de tabaco ha sido comprobada mediante el sistema de prueba Ames que utiliza *Salmonella* aplicando concentraciones menores de 0.01mg contenidas en muestras de orina de fumadores (Houdt *et al.*, 1984; Husgasfel-Pursiainen *et al.*, 1986; Lofroth y Lazaridis, 1986; Sorsa y Lofroth, 1989). Asimismo, se ha determinado que el fumar puede afectar la fertilidad en humanos, ya que se asocia con la reducción en la cantidad y movilidad de espermatozoides de hombres saludables (Vine, 1996) debido a que el humo de cigarro contiene numerosos mutágenos y carcinógenos (como las nitrosaminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos) que puede producir diversos daños al ADN (IARC, 1986; Ginsberg y Atherholt, 1989).

Para comprender la toxicidad del humo del tabaco es importante conocer los procesos involucrados en su biotransformación. Ésta, es una modificación que sufre todo xenobiótico en su paso a través del organismo, dando como resultado la transformación en moléculas con mayor o menor actividad que el compuesto original.

Este proceso es crucial en la disposición de un compuesto tóxico *in vivo*. Generalmente, la función de fase de reacción I (citocromo P450) es modificar la estructura del xenobiótico por medio de la introducción de un grupo funcional que se pueda conjugar en la fase II (glutación, N-acetil transferasa etc.) para ser excretado en forma de ácido mercaptúrico soluble en agua (Conf. Clinicopat., 1999).

Existen diferentes tipos de patrones individuales de susceptibilidad a los efectos carcinogénicos del humo del tabaco, el cual sufre un proceso metabólico complejo que en última instancia modula la cantidad de metabolitos reactivos que pueden llegar al ADN, formar aductos e inducir mutagénesis, existe la posibilidad de que variaciones en estos patrones metabólicos puedan influir en la susceptibilidad individual a los efectos del tabaco. Esta susceptibilidad de las

personas, aunado al polimorfismo en una variedad de genes importantes en la activación metabólica (CYP1A1) y desintoxicación (GSTM1) de carcinógenos de tabaco, así como en la reparación al ADN (XRCC1), se asocian con el incremento en el cáncer de pulmón (Marchand *et al.*, 1998; Butkiewicz *et al.*, 2001). Un polimorfismo en el codón de XRCC1 da como resultado una sustitución del aminoácido de arginina a glutamina, asociándose con un incremento en el nivel de ICH y aductos de ADN en individuos fumadores y con genotipo homocigótico para el alelo glutamina en el codón 399 (Duell *et al.*, 2000).

El citocromo P450 (CYP) es importante, ya que lleva a cabo la inserción de un átomo de una molécula de oxígeno en el sustrato (Miller y Miller, 1977). Una característica relevante de este CYP1A1 es su habilidad de catalizar el primer paso en el metabolismo del humo del tabaco (HAP), llevándolo a una forma electrofílica el cual tiende a unirse covalentemente a zonas nucleófilas del ADN formando aductos, uniones relativamente estables entre el metabolito reactivo y alguna base nitrogenada. Una reparación deficiente de estos aductos puede conllevar que durante el siguiente ciclo de duplicación del ADN haya errores de copia y ello de lugar a mutaciones puntuales que se transmitan a la descendencia celular (Taningher *et al.*, 1999).

Una mutación de transición de T-C (Spurr *et al.*, 1987; Kawajiri *et al.*, 1990) determina tres genotipos A, B y C siendo silvestre, homocigoto y heterocigoto, respectivamente (Nebert *et al.*, 1996). Existen grandes diferencias entre la población con respecto a la frecuencia de polimorfismos, siendo del 31% para japoneses y del 12% entre los caucásicos y africanos, asumiendo que los genotipos homocigotos y heterocigotos poseen un exceso de función.

Una segunda mutación de transición de A-G, provoca un cambio de isoleucina-valina encontrada en la región hemo de la proteína (Hayashi *et al.*, 1991), responsable en varios grados en este polimorfismo, clasificándolos como tipo silvestre, heterocigoto y homocigoto, respectivamente. Esta mutación incrementa la inducibilidad y actividad de la enzima CYP1A1, involucrada en el

metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Crofts *et al.*, 1994), contenidos en el humo de tabaco.

Un tercer polimorfismo se ha asociado a la población afro-americana, con transición de A-G (Crofts *et al.*, 1993). Estos polimorfismos permiten que existan ocho diferentes haplotipos, algunos de los cuales, son característicos de un grupo étnico específico.

El genotipo silvestre se encuentra en poco menos de la mitad de los asiáticos y africanos. Además, existe otro polimorfismo que consiste en una transversión de C-A en la posición 4887 en el exón siete, descrito por Cascorbi *et al.* (1996) y regularmente hallado en caucásicos (Bailey *et al.*, 1998).

Se ha relacionado a CYP1A1 y el riesgo de cáncer en la población japonesa (Kawajiri *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1991; Nakachi *et al.*, 1991), pero no en caucásicos o afro-americanos (Tefré *et al.*, 1991; Shields *et al.*, 1993). Esta discrepancia puede reflejar la diferencia en frecuencia del alelo mutante existente en los grupos étnicos (Ccsma *et al.*, 1993).

Muchos de los trabajos sobre riesgo de cáncer son asociados al polimorfismo CYP1A1, combinado con una deficiente actividad de glutatión-S-transferasa (GST). La GST desintoxica gran cantidad de carcinógenos y productos del estrés oxidante, los cuales provienen del metabolismo de fase I. Existiendo diversos genes GST que son polimórficos en las poblaciones humanas, siendo los más destacados GSTM1 y GSTT1.

En particular, la enzima clase II (GSTM1) que inactiva productos del humo del tabaco como los epóxidos diol de HAP, que son metabolitos producidos por CYP1A1 (Mannervik y Danielson, 1988), lo que resulta en una sobreexpresión de CYP1A1 combinada con una deficiente actividad de GST, puede incrementar el riesgo de cáncer de pulmón, después de haber sido expuestos a HAP. Esto fue confirmado por Nakachi *et al.* (1993) quien estudió la incidencia de carcinoma celular escamoso en fumadores japoneses, en lo que se incrementó el riesgo, cuando los individuos poseían el genotipo B asociado con una deficiencia de GST clase II. Estos hallazgos mostraron un riesgo relativo de cáncer de pulmón

en los sujetos portadores de CYP1A1, cuando estos fuman menos de 10 cigarrillos al día (Nakachi *et al.*, 1993).

Kihara y Noda (1995) estudiando la población japonesa encontraron, que los sujetos portadores de CYP1A1 con genotipo GSTM1 positivo, tienen poco riesgo de desarrollar tumores, esto sugiere que CYP1A1 (B) puede proteger contra el cáncer de pulmón (relacionado al humo de tabaco), mientras Alexandrie *et al.* (1994) en la población sueca, reportan la presencia del alelo m2 combinado con GST nulo, asociado a un incremento significativo en el diagnóstico de cáncer antes de los 66 años en personas fumadoras.

El polimorfismo de CYP1A1 y el riesgo de cáncer de pulmón debido al humo de tabaco, se relaciona con diversos grados de diferenciación de tumores, como el genotipo (*Val/Val*) que es un factor de riesgo para adenocarcinomas de pulmón y carcinomas de células escamosas (Nakachi *et al.*, 1991, 1993, 1995; Kihara y Noda, 1995) en poblaciones japonesas. El estudio de Nakachi *et al.* (1995) sobre la aparición de adenocarcinomas de pulmón muestra, que contrario a lo que se observa en carcinomas celulares escamosos, la presencia de estos genotipos eleva el riesgo sólo para tumores poco diferenciados y el riesgo no se incrementa cuando se fuman pocos cigarrillos.

El efecto de inducibilidad de CYP1A1 aunado a un genotipo poco eficiente de GSTM es un factor de propensión a desarrollar adenocarcinomas periféricos, mientras CYP1A1 no inducible se asocia con tumor bronquial.

El genotipo GSTM nulo se relaciona con fenotipos malignos, tales como nódulos linfáticos regionales o invasivos y metástasis (Goto *et al.*, 1996).

El posible papel de HAP en la etiología de cáncer de pecho fue considerado por Ambrosone *et al.* (1995). Además, estos pueden ser metabolizados por la glándula mamaria, ya que son lipofílicos y se llegan a almacenar en el tejido adiposo, por lo tanto el genotipo nulo de GSTM se ha relacionado con el riesgo de cáncer de pecho en mujeres fumadoras posmenopáusicas.

Otro citocromo relacionado al humo de tabaco es CYP2D6 que actúa en la activación de carcinógenos del tabaco para desarrollar cáncer de pulmón.

Observándose que el incremento de la actividad de CYP2D6, es un factor de riesgo entre los fumadores intensos. Kato *et al.* (1995) encuentran que los aductos de ADN en el pulmón se incrementan en función de la actividad de CYP2D6. London *et al.* (1997) observan una ligera asociación entre la actividad de CYP2D6 y la incidencia de cáncer de pulmón para los fumadores ligeros.

Una sobreexpresión de la actividad de CYP2D6 puede causar la activación de nitrosaminas presentes en el humo de tabaco (tales como NNK). La activación preferencial de carcinógenos específicos por un determinado tipo de células puede estar asociada a la prevalencia de tipos histológicos específicos (Gold *et al.*, 1989), debido a que HAP y NNK pueden actuar sobre diferentes células blanco.

Ryberg *et al.* (1994) comparan los niveles de aductos entre hombres y mujeres con relación a la actividad de GSTM1 y exposición al tabaco. Encontrando deficiencias de GSTM1 y en consecuencia, la formación de aductos más alto en mujeres que en hombres. Este hallazgo puede indicar que las mujeres poseen mayor riesgo para desarrollar cáncer de pulmón relacionado con el humo de tabaco.

Vineis *et al.* (1994) miden los niveles de aductos de 4-aminobifenil-hemoglobina y aductos en ADN en células exfoliadas de vejiga, revelando que aquellos que poseen deficiencia en N-acetil transferasa (NAT2) presentan mayor cantidad de aductos en la hemoglobina, evidenciándose en el incremento de acetiladores lentos, lo cual se relaciona con el grado de consumo de tabaco.

Brockmüller *et al.* (1996) revelan que los acetiladores lentos NAT2 son un factor de riesgo en fumadores intensos, mientras la insuficiencia en GSTM1 es un factor de riesgo independiente de fumar. Sin embargo, la deficiencia en ambos, puede actuar sinérgicamente.

Con respecto a las arilaminas que son inhaladas con el humo de tabaco (y transportadas por circulación al colon) incrementan su potencial carcinogénico en sujetos NAT2.

La asociación de fumar cigarrillos y NAT2 (Ambrosone *et al.*, 1996) se muestra como un factor de riesgo para cáncer de pecho, además en mujeres

fumadoras posmenopáusicas el riesgo se incrementa hasta cuatro veces. Con respecto al metabolismo de estrógenos, éste es determinado en parte por CYP1A1. Taioli *et al.* (1995) estudian el papel de polimorfismo en la susceptibilidad de cáncer de pecho en mujeres caucásicas y afro-americanas y encuentran que el polimorfismo Ile/Val y AA no está asociado con este tipo de cáncer.

1.4 Sistemas de prueba para evaluar el daño genotóxico

Se han desarrollado diversos sistemas de prueba que evalúan la genotoxicidad provocada por carcinógenos y/o mutágenos ambientales, así como diferentes indicadores que incluyen: hongos, animales y plantas. Algunos de estos métodos citogenéticos son: aberraciones cromosómicas, electroforesis unicelular (ensayo cometa), daño al ADN (aductos, rompimiento de cadenas, intercambios, sitios álcali lábiles), micronúcleos, anormalidades nucleares e Intercambio de cromátidas hermanas (Albertini *et al.*, 2000). Dichos métodos determinan alteraciones en el ADN que se pueden observar en interfase o mitosis. Estas incluyen rompimiento y rearreglo cromosómico (aberraciones cromosómicas estructurales).

Un sistema biológico de prueba que ha resultado ser ampliamente utilizado para detectar daño genotóxico, es el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos de sangre periférica, debido a que es un indicador extremadamente sensible, tanto en ensayos *in vitro*, como en individuos ocupacionalmente expuestos a diversos agentes químicos, presentando ventajas como la facilidad de disponer de gran cantidad de células a partir de una muestra pequeña y cuya obtención es sencilla (Evans y O' Riordan, 1975; Zurkov y Yakovenko, 1976).

El ICH evalúa eventos celulares, los cuales son compatibles con la supervivencia celular. A diferencia de las aberraciones cromosómicas que se asocian con muerte celular (Livingston y Fineman, 1983).

El ICH es el más empleado para evaluar poblaciones en contacto con los contaminantes ambientales, ya que es muy sensible y es posible inducirlo con concentraciones hasta 10 veces menores que las necesarias para producir aberraciones cromosómicas (Wolff y Perry, 1974; Perry y Evans, 1975). Dicho ensayo provee información del potencial genotóxico de tales agentes cuando están en el ambiente (Martelli *et al.*, 2000; Bukvic *et al.*, 2001).

1.5 Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

El ICH se define como el rompimiento y reunión de segmentos de secuencias alelicas en posiciones iguales entre cromátidas de un mismo cromosoma.

Es una prueba citogenética rápida y sensible, ofrece un método adecuado para detectar un amplio espectro de mutágenos y/o carcinógenos ambientales (Kato, 1974). Un ICH representa el rompimiento de 4 hebras de ADN, es decir, de 2 dobles hélices de un solo cromosoma y el rearrreglo de éstas en una nueva localización; es importante conocer que dicho rompimiento y rearrreglo del ADN son eventos que ocurren azarosamente sin producir modificaciones en el código genético, ya que se da en el mismo loci (Perry y Wolff, 1974).

Este intercambio molecular se puede observar fácilmente, en células en metafase, mediante la técnica de fluorescencia más Giemsa (FPG), que consiste en dejar a las células durante dos ciclos de replicación en presencia de un análogo de la base timina, la 5-bromo-2 χ desoxiuridina (BrdUrd) que es incorporada en cada cadena de ADN, mientras que una cromátida es sustituida unifilarmente, su cromátida hermana es sustituida en sus dos cadenas y los ICH observados son la suma de todos los intercambios ocurridos en las dos divisiones celulares. Las cromátidas hermanas sustituidas tiñen diferencialmente por combinación del fluorocromo Hoeschst 33258 y el colorante Giemsa (Perry y Wolff, 1974).

Existen varios modelos para explicar la formación de ICH y su significado biológico. El más aceptado hasta el momento, es el propuesto por Painter (1980)

que considera que los ICH se hallan con mayor frecuencia en las zonas de unión entre grupos de replicones durante la fase de síntesis (Liu *et al.*, 1980). Además Heartlein *et al.*, (1978) reportan que las personas que padecen síndrome de Bloom, presentan frecuencias basales más altas de ICH, mientras que sus niveles de topoisomerasa II son más bajos, lo que sugiere que la topoisomerasa II puede estabilizar el complejo de desviación en las células con síndrome de Bloom.

Se han realizado diversas investigaciones sobre monitoreo citogenético para evaluar el potencial genotóxico de la exposición en fumadores de cigarros (Carrano y Moore 1982).

Yamasaki y Ames (1977) demuestran que la orina de las personas fumadoras, pero no de las no fumadoras, contiene compuestos que son mutagénicos en la bacteria *Salmonella typhimurium*. Obe y Herha (1978) reportan que en cultivos de linfocitos humanos tomados de fumadores intensos, hay aumento relativo de aberraciones cromosómicas comparado con los fumadores ligeros y los no fumadores.

Este trabajo es seguido por Lambert *et al.* (1978), que estudian el ICH en linfocitos de fumadores y no fumadores, encontrando aumento de ICH en los primeros.

En investigaciones realizadas por Lambert *et al.* (1978), Murthy y Prema (1979), Hopkin y Evans (1979), Carrano y Moore (1982), Husum *et al.* (1982a), Livingston y Fineman (1983), Husgafvel-Pursiainen *et al.* (1984) y Wulf *et al.* (1984) hallan incremento en la frecuencia de ICH en los fumadores comparado con los no fumadores, siendo éste proporcional a la cantidad de cigarros fumados. Sin embargo, en algunos otros estudios, en la que se monitorearon a personas fumadoras se obtiene gran heterogeneidad en los resultados; Lambert *et al.* (1978); Lambert y Lindblad, (1980), Livingston y Fineman (1983) y Bukvic *et al.* (2001), describen frecuencia elevada de ICH. Por otra parte Butler (1981), Hollander *et al.* (1978) y Ardito *et al.* (1980), no detectan correlación entre la edad y el sexo evaluando el ICH; aunque, otros autores mencionan que los ICH son más altos en adultos con respecto a niños (Schmidt y Sanger, 1981; Husum

et al, 1986), mientras que en hombres es más baja la frecuencia que en mujeres (Soper *et al.*, 1984; Husum *et al*, 1986).

Soper *et al.* (1984) evidencian que el fumar y la edad son factores que acrecientan la frecuencia de ICH, por otro lado, la relación entre edad e ICH es menos clara (Schneider, 1982), muchos estudios no han encontrado relación entre éstas variables (De Arce, 1981; Carrano y Moore, 1982; Cohen *et al.*, 1982) y solo en dos ocasiones (Funes-Cravioto *et al.*, 1977; Ardito *et al.*, 1980) se halla incremento en la frecuencia de ICH en sujetos de edad avanzada comparada con recién nacidos o niños (Sarto *et al.*, 1982, 1984 a, b).

Vijayalaxmi y Evans (1982) demuestran en estudios *in vitro* que el condensado de humo de tabaco, cuando es aplicado a linfocitos humanos de fumadores y no fumadores, muestra una relación directa entre la dosis y el efecto medido a través del intercambio de cromátidas hermanas, y la frecuencia es más alta en fumadores que en no fumadores. Este estudio concluye que la frecuencia de ICH en fumadores (11.6 por célula) es significativamente mayor que la de los no fumadores (7.6 por célula).

Tucker (1987) trabajando con mujeres fumadoras encuentra que la cantidad de ICH es variable debido a los cambios hormonales en el ciclo menstrual, mientras Husgafvel-Pursiainen (1987), observa que las mujeres que fuman poseen un promedio de 9.1 ICH por célula por 7.1 para las no fumadoras.

Bukvic *et al.* (2001) utilizando parámetros como micronúcleos, ICH y edad en mujeres fumadoras, halla incremento de ICH con respecto al hábito de fumar, pero no en relación con la frecuencia de micronúcleos.

1.6 JUSTIFICACIÓN

La connotación que la cultura ha dado en los últimos años al consumo de tabaco por mujeres, vinculándolo a la igualdad de derechos, a la lucha por la equidad de género, de justicia y de autonomía, entre otros, han hecho que el tabaquismo en las mujeres tenga mayor aceptación social y crezca rápidamente,

a pesar de que su organismo es más vulnerable a los efectos del tabaco (Secretaría de Salud, 2001).

Sobre este tema se tienen que mencionar especialmente, las consecuencias que provoca el tabaco en madres fumadoras, quienes, durante el embarazo dañan su salud y la del producto, afectando sus pulmones y causando cambios permanentes en su estructura y funcionamiento. Debido a ello es necesario evaluar el efecto que causa el consumo de tabaco.

El tabaquismo es una causa importante de enfermedades cerebro vascular, por ejemplo, la hemorragia subaracnoidea es más probable en mujeres fumadoras que en las que no lo son, además, el uso simultáneo de cigarrillos y anticonceptivos orales aumenta este riesgo.

Algunos estudios indican que en el mundo existen aproximadamente 200 millones de mujeres fumadoras. La Encuesta Nacional de Adicciones (ENA) 1998, reporta que en México la prevalencia de mujeres fumadoras fue de 16.3%, lo que representa más de 4 millones de esta población (Secretaría de Salud, 2001).

A pesar de que en la actualidad se conocen los daños a la salud causados por fumar, el tabaquismo continúa en ascenso, especialmente en los países en desarrollo; por las proporciones alcanzadas se le considera un síndrome universal.

Globalmente, hay casi 1100 millones de fumadores, de los cuales 300 son de países desarrollados (relación de dos hombres por cada mujer), en comparación con los 800 en países en desarrollo (siete hombres por cada mujer) (WHO, 1977).

La mayoría de los estudios realizados sobre el tema, se han llevado a cabo en países desarrollados, cuyas poblaciones, en algunos casos, difieren ampliamente, en los hábitos de fumar, en la edad de inicio de ésta adicción y/o en la presencia de diversos factores biológicos y sociales importantes. Es del conocimiento general, que en cada inhalación, la mucosa de la boca, nariz, faringe y árbol traqueal de cada fumador, está expuesta a todos los compuestos

químicos que conforman el humo del tabaco (Taningher et al., 1999; Casse et al., 2003).

En México han sido pocos los estudios realizados con respecto a la determinación de los daños citogenéticos en la población de mujeres, asociados a su consumo y/o exposición.

Considerando lo anterior, es importante evaluar los posibles efectos genotóxicos en mujeres fumadoras mexicanas.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Evaluación de posibles efectos genotóxicos en mujeres fumadoras, mediante el análisis de intercambio de cromátidas hermanas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto genotóxico en fumadoras, mediante la determinación de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de sangre periférica.
- Detectar la posible acción del consumo de tabaco sobre el índice mitótico y la cinética de proliferación celular.
- Correlacionar el daño citogenético con variables como número de cigarros fumados por día, tiempo fumando y edad de cada mujer estudiada.

1.8 HIPÓTESIS

Fumar por tiempo prolongado y exponerse a elevadas concentraciones del humo de tabaco, induce ICH en linfocitos y/o alteraciones en la cinética de proliferación celular e índice mitótico.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la población por evaluar:

Para seleccionar a la población que participó en el estudio, se procedió a lo siguiente:

- 1) Invitación a las mujeres que asistieron a la Clínica anti-tabaco del INER para participar, voluntariamente, en el estudio.
- 2) Aplicación de un cuestionario propuesto por Carrano y Natarajan (1988) y adecuado a las condiciones de nuestra población.
- 3) Análisis de cada uno de los cuestionarios aplicados para determinar si las mujeres fumadoras cumplían o no con los criterios de inclusión establecidos para participar en el presente proyecto de investigación.

Criterios de exclusión

- Que se encontraran con algún tratamiento médico severo.
- Que estuvieran expuestas cotidianamente, debido a su ocupación laboral, a compuestos químicos (gases) u otro tipo de contaminantes ambientales (partículas) potencialmente genotóxicos.
- Que tuvieran algún otro tipo de adicción.

Criterios de inclusión

Para la población fumadora participante, se tomó en cuenta, principalmente:

- a) número de cigarrillos fumados por día
 - Mayor de 10 cigarros/día (ligeros).
 - Entre 11 y 19 cigarros/día (moderados).
 - Mayor de 20 cigarros/día (intensos).

- b) edad
 - Mayores de 15 años
 - Menores de 73 años
- c) tiempo fumando
 - De 1 a 10 años
 - De 11 a 20 años
 - Más de 21 años

La población que conformó el grupo testigo incluyó a mujeres que:

- No fumaban.
- No estaban expuestas al humo de tabaco ni en su trabajo, ni en su casa, por lo que su exposición se puede considerar como mínima (reuniones sociales, restaurantes, etc.).
- Se buscó que las mujeres testigo estuvieran pareadas con respecto a la edad de cada una de las fumadoras.
- El estudio se llevó a cabo en dos partes:

Se seleccionaron 25 fumadoras activas que iniciarían tratamiento para dejar de fumar en la Clínica anti-tabaco del INER, así como 25 mujeres que conformaron el grupo testigo.

2.1 Prueba citogenética aplicada:

Toma de muestra sanguínea para el análisis de ICH

Se tomaron 5 ml de sangre periférica con vacutainer conteniendo 0.1 ml de heparina (sustancia anticoagulante).

Las muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente durante su traslado al laboratorio para ser procesadas.

2.2 Trabajo de laboratorio

Cultivo de linfocitos

A 100 ml de medio de cultivo Gibco RPMI 1640 estéril se le adicionaron 4 ml de fitohemaglutinina (FHG) (la cual se esterilizó a través de su paso por un filtro miliporo de 0.22 μm).

Cuatro ml del medio de cultivo conteniendo la FHG se transfirieron a cada tubo de cultivo de 15 ml, adicionándole posteriormente, 400 μl de sangre. Este tratamiento se hizo por triplicado para cada paciente.

Los tubos se incubaron a 37°C durante 72 horas.

A las 24 horas de iniciado el cultivo se agregó a cada tubo 100 μl de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdUrd) volviéndose a incubar a 37°C.

A las 71 horas, se sacaron los cultivos de la incubadora, se agitaron suavemente para resuspender el botón y se les añadió 100 μl de colchicina a una concentración de 0.002 g/ml, una vez realizado lo anterior, se incubaron durante 1h más a 37°C.

A las 72 horas, se realizó la cosecha.

2.3 Cosecha de linfocitos

Después de sacar los tubos de cultivo de la incubadora, cada botón celular se resuspendió (agitando suavemente cada uno) e inmediatamente se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min.

Posteriormente, se eliminó el sobrenadante de cada tubo de cultivo hasta dejar un volumen de 0.5 ml, se agitó con vortex y se agregó 6 ml de solución hipotónica de KCL [0.075M]. Los tubos fueron incubados a 37°C por 20 min.

PREFIJACIÓN Y FIJACIÓN

Prefijación

A cada tubo se le adicionó, lentamente, 1 ml de fijador frío metanol-ácido acético 3:1, después se agitó y dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 min.

Fijación

Se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido y agitado con vortex, lentamente se fue agregando fijador frío hasta completar 10 ml.

Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min.

Se repitió el procedimiento hasta que el botón celular se vio de color claro.

Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1ml de fijador frío, hasta un volumen final de 1.5 ml.

Preparación de laminillas

El botón celular fue resuspendido en el fijador y con pipeta Pasteur se gotearon las células sobre porta objetos limpios y fríos (se mantuvieron dentro de metanol a -4°C). El goteo se realizó a una distancia de 1.5 m.

Las laminillas se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

2.4 Tinción diferencial de cromátidas hermanas

Las laminillas se introdujeron dentro de una caja de Koplín grande conteniendo el colorante fluorocromado Hoechst 33258 (solución acuosa 1:9). Las laminillas permanecieron dentro del colorante durante 30 min en obscuridad, transcurrido este tiempo se sacaron y lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. Posteriormente, las laminillas fueron irradiadas con luz negra (20

watts) a una distancia de 2 cm, cubriéndola con Citrato de Sodio Salino (CSS, [0.03 M]) durante una hora.

Las laminillas fueron lavadas en agua corriente y secadas al aire.

Inmediatamente, fueron colocadas en baño María dentro de una caja Koplín con CSS a 60 °C durante una hora, transcurrido este tiempo cada laminilla fue lavada con agua corriente y secada al aire.

Cuando las laminillas estuvieron secas se colocaron en una canastilla, la cual se introdujo en una caja Koplín conteniendo el colorante Giemsa (solución acuosa 1:10) durante 2 min. Se lavaron haciéndolas pasar por dos recipientes con agua limpia y se dejaron secar al aire colocándolas en gradillas.

Una vez teñidas las laminillas fueron re-etiquetadas para su observación.

Para la evaluación del ICH se revisaron 50 metafases que incorporaron la BrdUrd durante dos ciclos (M2) por individuo, cuantificándose los intercambios distales como un evento y los intersticiales como dos.

2.5 Cinética de proliferación celular

Para la determinación del índice de replicación celular se registraron 100 metafases consecutivas, anotando la cantidad que estaban en primera, segunda y tercera divisiones celulares y se empleó la fórmula propuesta por Krishna *et al.* (1985), con el objeto de determinar el índice de replicación (IR), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IR = \frac{1(M1) + 2(M2) + 3(M3)}{100}$$

En donde: M1, M2 y M3, representan la cantidad de metafases de 1ª, 2ª y 3ª divisiones celulares. Se consideraron en M1 aquellos cromosomas cuyo ADN se replicó sólo una vez después de la adición de la BrdUrd y todos los cromosomas tiñeron oscuro (sustitución unifilar), en M2 a los cromosomas cuyo ADN se duplicó dos veces en presencia de éste análogo y las cromátidas presentaban tinción diferencial (sustitución bifilar) y en M3, las células con mayor

número de cromátidas bifilarmente sustituidas, que aquellas unifilarmente sustituidas (Krishna *et al.*, 1985).

Índice mitótico

El índice mitótico (IM) fue determinado como el número de metafases que se encontraron en un total de 3000 células estimuladas (C.E.), para calcularlo se empleo la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{Met.}}{\text{C.E.}}$$

En donde: M es la cantidad de metafases registradas y C.E. es el número de células estimuladas.

2.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando diversas pruebas: *t* de Student, X^2 , análisis de varianza y/o pruebas de correlación de Spearman. Con estos dos últimos análisis se correlacionó: la edad vs tiempo fumando, la edad vs número de cigarros/día, número de cigarros vs ICH, tiempo fumando vs ICH entre las mujeres fumadoras y las no fumadoras (grupo testigo) con el fin de determinar posibles diferencias significativas entre ambos grupos.

3.0 RESULTADOS

Los resultados de genotoxicidad obtenidos al comparar 25 mujeres fumadoras con 25 mujeres no fumadoras (grupo testigo), mediante la prueba citogenética de intercambio de cromátidas hermanas y la determinación de la cinética de proliferación celular, índice de replicación e índice mitótico, se muestran concentrados en las tablas 2 a 5, en las que también se indica la edad de las mujeres que participaron en el estudio (entre 16 y 73 años), el tiempo en el

que las mujeres habían fumado (entre 7 y 61 años), así como el número de cigarrillos fumados por día, con lo que se determinó si las mujeres eran fumadoras ligeras, moderadas o intensas, ya que éstos fluctuaron entre 7 y 40 cigarrillos diarios.

Para el análisis de resultados los datos registrados fueron divididos con base en aquellas muestras en las que se obtuvo el número de células en interfase establecido previamente (3000 células/individuo), para obtener el IM y/o el número de metafases (100/individuo) necesarias para calcular la CPC y el IR. En la tabla 2, se presentan las frecuencias de la CPC, el IR e IM de 15 mujeres fumadoras y no fumadoras en las que se registraron 3000 células estimuladas, mientras que la Tabla 3, muestra el mismo tipo de frecuencias, pero en 10 mujeres en las que se determinaron menos de 3000 células en interfase y en la mayoría de los casos, con menos de 100 metafases .

El análisis comparativo entre el primer grupo de mujeres evaluado (indicado en la tabla 2), se llevó a cabo para el IM y la CPC utilizando la X^2 , encontrándose diferencias significativas entre los IM ($p < 0.01$), y entre las metafases de 1ª, 2ª y 3ª división ($p < 0.001$) en las células de las mujeres fumadoras y las no fumadoras. Con respecto al IR entre ambos grupos de mujeres, también se obtuvo diferencia significativa al aplicar la prueba estadística de "t" de Student ($p < 0.0001$), registrándose en promedio un IR para las células de las fumadoras de 1.6 con una desviación estándar (D.E.) de 0.3, mientras que el de las mujeres no fumadoras fue 2.0 con DE 0.1. Lo anterior, sólo fue posible determinarlo en 15 de las 25 mujeres evaluadas. Los valores de la CPC evidencian un claro retraso en el ciclo celular de las mujeres que fuman con respecto a las que no tienen dicha adicción.

Las otras 10 mujeres fumadoras presentaron menos de 3000 células en interfase (tabla 3) por lo que no se obtuvo el IM, en ocho de ellas no se pudo calcular el IR y en otras tres se determinó inhibición de la mitosis. Debido a estos resultados no fue posible llevar a cabo ningún análisis estadístico comparativo con los valores registrados de las mujeres no fumadoras sin embargo, tanto la CPC en la cual el retraso celular se observó claramente, con un mayor número

de metafases en 1ª división, como la carencia de IM, IR e inhibición celular, reflejaron el efecto genotóxico que causaron los componentes del humo del tabaco entre las mujeres fumadoras.

En lo referente a la frecuencia de ICH registrada en ambos grupos de mujeres (fumadoras y testigos), se aplicó el criterio de separar los resultados de aquellas mujeres en las que se registraron las 50 metafases de 2ª división celular con más de 40 cromosomas y en las que fue posible determinar los ICH, de aquellas con menos de 50 metafases.

En la tabla 4, se agrupa al 42% de las mujeres fumadoras en las que la frecuencia promedio de ICH fue de 3.7 con una D.E. de 1.4. Al aplicar la prueba estadística "t" de Student para comparar los valores de ICH obtenidos en las mujeres fumadoras con respecto a los de las mujeres del grupo testigo, no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Para establecer posibles correlaciones entre la frecuencia de ICH/célula vs edad, número de cigarrillos fumados por día y tiempo fumando, se aplicó la prueba de Spearman, no encontrándose ninguna asociación.

En la Tabla 5, se muestra el 58% de las mujeres fumadoras que presentaron menos de 50 metafases por lo que no fue posible determinar la frecuencia de ICH.

4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se ha comprobado que fumar es un factor de riesgo para la salud, elevando las enfermedades cardiovasculares, infecciones respiratorias agudas y/o crónicas, cáncer de pulmón y otros órganos, así como alteraciones en las funciones inmunológicas de humanos y de animales (USDHEW, 1979; USDHHS; 1982; Geng *et al.*, 1995).

La evaluación de los efectos genotóxicos causados por el consumo y/o exposición al humo de tabaco, han demostrado que la citotoxicidad puede ser medida a través de la viabilidad y el desarrollo celular (Andreoli *et al.*, 2003). La estimación de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), así como la determinación de la cinética de proliferación celular (CPC), han permitido establecer el grado de genotoxicidad y citotoxicidad tanto en células de mamífero cultivadas (Hopkin y Evans, 1979; Sorsa *et al.*, 1982; Takehisa, 1982) como en animales experimentales (Schneider y Kram, 1982).

Entre los estudios sobre genotoxicidad causada por el humo de tabaco, se han encontrado fuertes discrepancias en los resultados obtenidos. Lambert *et al.* (1978) fueron los primeros en demostrar diferencias significativas en la frecuencia de ICH en personas fumadoras con respecto a las no fumadoras, lo cual fue corroborado en otras investigaciones (Bala-Krishna, 1979; Husgafvel-Pursiainen *et al.*, 1980; Husum *et al.*, 1982a; Lazutka *et al.*, 1994). Mientras que autores como Hollander *et al.* (1978) no hallaron diferencias entre la frecuencia de ICH al comparar a 69 fumadores con 6 sujetos no fumadores. Asimismo, al realizar investigaciones similares Ardito *et al.* (1980), Crossen y Morgan (1980) y Waksvik *et al.* (1981) tampoco registraron diferencias significativas entre las frecuencias de ICH observados. Estos últimos resultados coinciden con los reportados en el presente estudio, en el cual, de 25 mujeres fumadoras, solamente en 10 fue posible registrar la presencia de ICH, en las que no hubo diferencias significativas al compararlos con las del grupo testigo.

Es posible que la baja cantidad de ICH registrada (3.4 ICH/célula) se deba al tamaño reducido de la población (n=10) en la que se pudo estimar el ICH, aunque Husgafvel-Pursiainen y colaboradores (1986) señalaron un incremento en la frecuencia de ICH en 7 mujeres fumadoras intensas, con una media de consumo de 22 cigarros/día, un promedio de 35 años de edad y un promedio de 9.1 ICH/célula. Sin embargo, en la presente investigación se determinó que el efecto citotóxico en las 25 mujeres fumadoras (con promedios de 22 cigarros por día y 47 años de edad), se manifestó desde el inicio de la división celular, ya que se observó retraso en el ciclo celular, el cual se evidenció por el hecho de encontrar al 60.5% de células en primera división, al 24.9% en segunda y al 14.6% en tercera división celular, obteniéndose diferencias significativas en cuanto a la disminución de células en división con respecto al grupo de mujeres no fumadoras, este mismo comportamiento también se reflejó en los índices mitótico y de replicación, lo que no permitió determinar los ICH en el total de mujeres fumadoras evaluadas.

Las discrepancias halladas en los diversos estudios con respecto a las frecuencias de ICH reportados entre los sujetos fumadores y no fumadores se deben probablemente, a factores como susceptibilidad génica, sexo, edad y/o factores externos, tales como hábitos alimenticios, ingesta de medicamentos, exposición a agentes contaminantes como pintura, gasolina, consumo de café, alcohol, entre otros (Lambert *et al.*, 1982; Scarpato *et al.*, 1996); observándose que los individuos responden diferencialmente a cada compuesto genotóxico. Además, en el caso particular de las mujeres, se ha propuesto que uno de los factores fisiológicos que pueden afectar la frecuencia de ICH son las hormonas, tanto endógenas, como exógenas (Murthy y Prema, 1979, 1983; Husum *et al.*, 1982b), así como el embarazo (Sharma y Das, 1986; Dedonyte *et al.*, 1990) y el ciclo menstrual (D'Souza *et al.*, 1988; Furuya *et al.*, 1991).

Sarto *et al.* (1985) descubrieron que la frecuencia de ICH se incrementa linealmente con la edad y el fumar, independientemente del sexo, además de no hallar interacción entre el número de cigarrillos fumados y la edad, concluyendo que ésta última es el factor más importante en el incremento de la frecuencia de

ICH. Soper *et al.* (1984) también demostraron que el fumar y la edad son dos factores importantes en el incremento de ICH sin embargo, el orden de importancia se invierte, siendo el humo de tabaco el principal inductor de ICH. En este estudio no se encontró correlación significativa entre estas mismas variables, ni con respecto al tiempo (años) en las mujeres que habían fumado, probablemente es necesario incrementar la muestra de mujeres fumadoras para obtener una relación entre la frecuencia de ICH, el número de cigarrillos fumados por día, el tiempo de fumar y los diferentes estados fisiológicos en los que se encuentra cada mujer participante.

Con respecto a la susceptibilidad génica y su asociación con el humo del tabaco se propone que éste último induce daño al ADN y a genes involucrados en desintoxicación de compuestos químicos externos (xenobióticos), en particular de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por ejemplo, el benzo(a)pireno que forma aductos con el ADN, debido a un mal funcionamiento de citocromo P450 de la familia 1A1 (CYP1A1) y glutatión S transferasa de la familia M1 (GSTM1) (Rojas *et al.*, 2000). Además, GSTM1 se asocia con el incremento de la frecuencia de ICH (Cheng *et al.*, 1995) y se ha observado que el genotipo nulo de GSTM1 se relaciona con cáncer de pulmón, laringe y vejiga y que el riesgo se eleva con la cantidad de cigarrillos fumados (Lafrente *et al.*, 1993; Kihara y Noda, 1994; Ford *et al.*, 2000). Otros investigadores han encontrado que los aductos inducidos por el humo de tabaco y el rompimiento cromosómico, se dan en mayor proporción en los fumadores con genotipo nulo que en aquellos con genotipo no nulo (Salama *et al.*, 1999; Godschalk *et al.*, 2001), así como también un aumento en la frecuencia de ICH (Lei *et al.*, 2002).

Con respecto a la CPC en personas fumadoras, se han observado resultados contradictorios; Husgafvel-Pursiainen (1987) descubrió más células de primera división celular en sujetos no fumadores cuando los comparó con los fumadores, mientras que Ostrosky-Wegman *et al.* (1991) mostraron que la CPC se retrasaba en individuos con exposición aguda y crónica a hidroarsénico. Otros reportes utilizando linfocitos de humano, así como de bovino, indicaron que el arsenato de sodio y arsenato inhiben dicha proliferación (Petres *et al.*, 1977; Wen

et al., 1981; Mc Cabe *et al.*, 1983, Lazutka *et al.*, 1994). Por lo que compuestos químicos similares a estos y que están presentes en el humo del tabaco posiblemente pueden estar interviniendo directa o indirectamente en el retraso de la CPC.

El análisis de proliferación celular y su retraso sugieren daño al ADN e inhibición en la síntesis del ADN (Lazutka, 1991), lo que representa fisiológicamente una disminución en la velocidad de la blastogenesis debido a que las células no responden a mitógenos (Lucivero *et al.*, 1988; Sopori *et al.*, 1993), asociándose a un estado de anergia en los linfocitos T (Ausencia de respuesta celular e incapacidad de los linfocitos T para responder a un antígeno específico) (Singh *et al.*, 2000).

Debido a que existen más de 4700 compuestos químicos (IARC, 1991), incluyendo 30 carcinógenos potentes en el humo de tabaco, sobresaliendo los HAP cuyo prototipo es el benzo(a)pireno, las aminas aromáticas y las nitrosaminas específicas del tabaco como la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) (De Flora, 2003). La exposición al humo de tabaco se considera como un factor de riesgo, principalmente a enfermedades respiratorias (Haynes *et al.*, 1996). El incremento de la susceptibilidad a estas enfermedades, puede deberse a las propiedades de inmunosupresión, siendo la proliferación de los linfocitos T crítica para la respuesta inmune (Li *et al.*, 1996; Sopori *et al.*, 2002).

El cigarro común, tiene aproximadamente 1 μmol de hidroquinona (HQ) y catecol que llegan a los pulmones por pirolisis de flavonoides del tabaco, éstos químicos mimetizan muchos de los efectos biológicos. Se ha demostrado que el catecol y la HQ son inhibidores de la proliferación celular de linfocitos T (Li *et al.*, 1996, 1997; McCue *et al.*, 2000).

Por otra parte, la nicotina (NT) es una droga altamente neuroactiva, sus efectos se evidencian en la disminución de la respuesta inmune, regulada por el sistema nervioso central vía hipotálamo-pituitaria-adrenal (Blalock, 1994; Sopori *et al.*, 1998). La NT es el principal compuesto psicoactivo de la fase particulada del humo de tabaco (Dube y Green, 1982).

Se ha demostrado en linfocitos de rata expuestas crónicamente a NT, que las células T muestran un estado de anergia y disminución en la proliferación (Sopori *et al.*, 1993). Esta anergia se vincula con receptores de membrana en linfocitos T defectivos (TCR), la cual media la activación constitutiva de la proteína tirosin cinasa (PTK) y fosfolipasa C- γ -1 (PLC- γ 1) inhabilitando a las células T a entrar a la fase S del ciclo celular (Sopori *et al.*, 1993, Geng *et al.*, 1996). Además, la concentración de calcio citoplásmico (Ca^{2+}) se incrementa, lo que depende de PLC- γ 1 por PTK, produciendo inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), el cual induce la liberación de calcio (Weiss y Littman 1994; Clapham, 1995; Geng *et al.*, 1996).

El humo del tabaco también provoca estrés oxidante el cual se asocia con bajos niveles de antioxidantes, lipoperoxidación, modificación de proteínas y daño al ADN (Bridges *et al.*, 1993; Nishio y Watanabe, 1997; Godschalk *et al.*, 2002; Mayne, 2003). El estrés oxidante está vinculado con el sistema de desintoxicación dependiente de glutatión reductasa (GSH), éste es el principal antioxidante utilizado para eliminar peróxidos y mantener a las vitaminas C y E en su forma reducida (Buettner, 1993). Sin embargo, el GSH es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG) en el plasma humano de acuerdo con la edad, exposición al humo de tabaco, quimioterapia y diabetes (Samiec *et al.*, 1998; Jonas *et al.*, 2002).

La GSH se sintetiza a partir de cisteína (Cys), glicina (Gly) y glutamato (Glx), siendo primordial la Cys para su síntesis en su estado reducido. Estudios recientes muestran que la velocidad de proliferación celular depende del estado reducido de Cys/CySS en medio de cultivo (Jonas *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002) y a su vez se relaciona con la resistencia a apoptosis (Jian *et al.*, 2001), ya que el humo de tabaco contiene compuestos como la acrolina que reaccionan con cisteína llevándola de un estado reducido a uno oxidado (Reddy *et al.*, 2002), así como otros agentes reactivos que llevan de un estado reducido GSH a un estado oxidado GSSG (Moriarty *et al.*, 2003).

Los diversos agentes químicos que se encuentran en el humo de tabaco, probablemente afecten tanto el proceso y la regulación del ciclo celular,

principalmente de linfocitos, como el de diversas vías bioquímicas celulares (falta de respuestas a mitógenos y/o que el daño al ADN no sea tan severo), causando directa y/o indirectamente el retraso en la CPC, la alteración del IM, así como la citotoxicidad observada en el presente estudio.

5.0 REFERENCIAS

Albertini R. J., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Herminki K., Merlo F., Natarajan A. T., Norppa H., Shuker D. E. G., Tice R., Waters M. D. y Aitio A. 2000. IPCS Guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* **463**:111-172.

Alexandrie A. K., Sundberg M. I., Seidergard J., Tornling G. y Rannug A. 1994. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on best factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* **15**: 1785-1790.

Ambrosone C. B., Freudenheim J. L., Graham S. *et al.* 1996. Cigarette smoking, *N*-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *J. Am. Med. Assoc.* **276**: 1494-1501.

Ambrosone C. B., Freudenheim J. L., Graham S., Marshall J. R., Vena J. E., Brasure J. R., Laughlin R., Nemoto T., Michalek A. M. y Harrington A. 1995. Cytochrome P4501A1 and glutathione-S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Res.* **55**: 3483-3485.

American Cancer Society (ACS). 2000. Tobacco Control Profiles. 11th World Conference on Tobacco and Health. Atlanta, GA.

Ames B. N. 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**: 587-593.

Andreoli C., Gigante D. y Nunziata A. 2003. A review of *in vitro* methods to asses the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicology in Vitro* **17**: 587-594.

Ardito G., Lamberti L., Ansaldo E. y Pozzetto P. 1980. Sister chromatid exchange in cigarette-smoking human females and their newborns. *Mutat. Res.* **78**: 209-212.

American Society of Heating, Refrigerating, and Air- Conditioning Engineers (ASHRAE). 1989. Standard: Ventilation for Acceptable Indoor Air Quality, Atlanta, Geor. Inc.,pp.1-26

Bailey R. L., Roodi N., Verrier C.S., Yee C. J., Dupont W. D. y Parl F. F. 1998. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasian and African Americans. *Cancer Res.* **58**: 65-70.

Bala-Krishna M. P. 1979. Frequency of sister chromatid exchange in cigarette smoke. *Hum. Genet.* **52**: 343-345.

Blalock J. E. 1994. The immune system: our sixth sense. *Immunologist.* **2**: 8-15.

Bridges A. B., Scott N. A., Parry G. J. y Belch J. J. 1993. Age, sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans. *Eur. J. Med.* **2**: 205-208.

Brockmoller J., Cascorbi I., Kerb R. y Roots I. 1996. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine *N*-acetyl-transferase 2, glutathione-S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.* **56**: 3915-3925.

Brown B., Avalos J., Lee C. y Doolittle D. 2001. The effect of tobacco smoke, nicotine, and cotinine on the mutagenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). *Mutat. Res.* **494**: 21-29.

Buettner G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 535-543.

Bukvic N., Gentile M., Susca F., Fanelli M., Serio G., Buonadonna L., Capurso A. y Guanti G. 2001. Sex chromosome loss micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat. Res.* **498**: 159-167.

Butkiewicz D., Rusin M., Enewold L., Shields P. G., Chorazy M. y Harris C. C. 2001. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* **22**: 593-597.

Butler M. G. 1981. Sister- chromatid exchange in 4 human races. *Mutat. Res.* **91**: 377-379.

Carrano A. V. y Moore D. H. 1982. The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchange in humans. En : J. A. Heddle (Ed.) *New horizons in genetic toxicology*. Academic Press, Nueva York, pp. 267-304.

Carrano A. V. y Natarajan A. T. 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **204**: 379-406.

Cascorbi I., Brockmüller J., Roots I. 1996. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on the lung cancer susceptibility. *Cancer Res.* **56**: 4965-4969.

Casse C., Chuan Hu Y. y Ahrendt S. A. 2003. The XRCC1 codon 399 Gln allele is associated with adenine to guanine p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Mutat. Res.* **528**: 19-27.

Castonguay A., Lin D., Stoner D. G., Radok P., Furuya K. y Hecht S. 1983. Comparative carcinogenicity in A/J mice and metabolism by cultured mouse peripheral lung of N'-nitrosornicotine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, and their analogues. *Cancer Res.* **43**: 1223-1229.

Castonguay A., Pepin P. y Briere N. 1991. Modulation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone demethylation and denitrosation by rat liver microsomes. *Cancer Lett.* **59**: 67-74.

Cheng T. J., Christiani D. C., Xu X., Wain J. C., Wiencke J. K. y Kelsey K. T. 1995. GST mu, diet and smoking as determinants of sister chromatid exchanges in lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**: 535-542.

Clapham D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.

Cohen M. M., Martin A. O., Obe C. y Simpson S. J. 1982. A family study of spontaneous sister chromatid exchange frequency. *Am. J. Hum. Genet.* **34**: 294-306.

Conferencia clinicopatológica (Conf.Clinicopat.). 1999. Tabaco y cáncer: de la asociación epidemiológica a la evidencia molecular. *Med. Clin.* **112**: 584-591.

Cosma G., Crofts F., Currie D., Wirgin I., Toniolo P. y Garte S. J. 1993. Racial differences in restriction fragment length polymorphisms and messenger RNA inducibility of the human CYP1A1 gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2**: 53-57.

Crofts F., Cosma G., Currie D., Taioli E., Toniolo P. y Garte S. 1993. A novel CYP1A1 gene polymorphisms in Africans-Americans. *Carcinogenesis* **14**: 1721-1731.

Crofts F., Taioli E., Trachman J., Cosma G., Currie D., Toniolo P. y Garte S. 1994. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* **15**: 2961-2963.

Crossen P. E. y Morgan W. F. 1980. Sister chromatid exchange in cigarette smokers. *Hum. Genet.* **53**: 425-426.

De Arce M. A. 1981. The effects of donor, sex, and age on the number of sister chromatid exchange in human lymphocytes growing *in vitro*. *Hum. Genet.* **57**: 83-85.

Dedonyte V. V., Lazutka J. S. y Lekevicius R. K. 1990. A lowered frequency of sister chromatid exchange in pregnant women. *Tsitologiya* **32**: 520-523.

De Flora S., D'Agostini F., Balansky R., Camoirano A., Bennicelli C., Bagnasco M., Cartiglia C., Tampa E., Longobardi M. G., Lubet R. A. e Izzoti A. 2003. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* **524**: 237-252.

Dube M. F. y Green C. R. 1982. Methods of collection of smoke for analytic purposes. *Recent Adv. Tobacco Sci.* **8**: 42-102.

D'Souza D., Thomas I. M. y Das B. C. 1988. Variation in spontaneous chromosomal damage as a function of biologic rhythms in women. *Hum. Genet.* **79**: 83-85.

Duell E. J., Wiencke J. K., Cheng T. J., Varconyi Z. F., Zuo T. D. S., Ashok E. J., Mark J. C., Wain J. C., Christiani K. y Kelsey T. 2000. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* **21**: 965-971.

Evans H. J. y O' Riordan M. L. 1975. Human peripheral blood lymphocyte for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat. Res.* **31**: 135-148.

Environmental Protection Agency (EPA). 1990. Federal register 55. **209**: 43406-43407.

Ford J. G., Li Y., O'Sullivan M. M., Demopoulos R., Garte S., Taioli E. y Buandt-Rauf P.W. 2000. Glutathione S-transferase M1 polymorphisms and lung cancer risk in African-Americans. *Carcinogenesis* **21**:1971-1975.

Funes-Cravioto F., Zapata-Gayon C., Kilmodin-Hedman B., Lambert B., Lindsten J., Norberg E., Nordeuskjold M., Olin R. y Swensson A. 1977. Chromosome aberrations and sister chromatid exchange in chemical laboratories and a rototyping factory and in children of women laboratory workers. *Lancet* **8033**: 332-335.

Furuya T. J., Hagiwara H., Ochi H., Tokuhiko R., Kikawada R., Karube T. y Watanabe S. 1991. Changes of common fragile sites on chromosomes according to the menstrual cycle. *Hum. Genet.* **86**: 471-474.

Geng Y., Savage S. M., Seagrave J., Johnson L. y Sopori M. L. 1995. Effects of nicotine on the immune response, I. Chronic exposure to nicotine impairs the antigen receptor-mediated signal transduction in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **135**: 268-278.

Geng Y., Savage S. M., Razani-Boroujerdi S. y Sopori M. L. 1996. Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. *J. Immunol.* **156**: 2384-2390.

Ginsberg G. L., y Atherholt B. 1989. Transport of DNA-adducting metabolites in mouse serum following benzo(a)pyrene administration. *Carcinogenesis* **10**: 673-679.

Glantz S, y Parmely W. 1991. Passive smoking and heart disease. *Circulation* **83**: 1-12.

Godschalk R. W., Dallinga J. W., Wikman H., Risch A., Kleinjans J. C., Bartsch H. y Van Schooten F. J. 2001. Modulations of DNA and protein adducts in smokers by genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1, NAT1 and NAT2. *Pharmacogenetics* **11**:389-398.

Godschalk R. W., Nair J., Van Schooten F. J., Risch A., Drings P., Kayser K., Dienemann H. y Bartsch H. 2002. Comparison of multiple DNA adduct types in tumor adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis* **23**: 2081-2086.

Gold L. S., Slone T. H. y Bernstein L. 1989. Summary of carcinogenic potency and positivity for 492 rodent carcinogens in the carcinogenic potency database. *Environ. Health Perspect.* **79**: 259-272.

Goto I., Yoneda S. y Yamamoto M. 1996. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **56**: 3725-3730.

Hayashi S. I., Watanabe J., Nakachi K. y Kawajiri. K. 1991. Genetic linkage of lung cancer associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J. Biochem.* **110**: 407-411.

Haynes Jr. W.F., Krstulovic V. J. y Bell Jr. A. L. 1996. Smoking habit and incidence of respiratory tract infections in a group of adolescent males. *Am. Rev. Respir. Dis.* **93**: 730-735.

Heartlein M. W., Tsuji H. y Latt S. A. 1978. 5-Bromodeoxyuridine-dependent increase in sister chromatid exchange formation in Bloom's syndrome is associated with reduction in topoisomerase II activity. *Exp. Cell Res.* **169**: 245-254.

Hoffmann D., Patrianakos C., Brunnemann K. D. y Gori G. B. 1976. Chromatographic determinations of vinyl chloride in tobacco smoke. *Anal. Chem.* **48**: 47-50.

Hollander D. H., Tockman M. S., Liang Y. W., Borgaonkar D. S. y Frost J. K. 1978. Sister chromatid exchanges in peripheral blood of cigarette smokers and in lung cancer patients; and the effect of chemotherapy. *Hum. Gen.* **44**: 165-171.

Hopkin J. M. y Evans H. J. 1979. Cigarette smoke condensates damage DNA in human lymphocytes. *Nature* **279**: 241-242.

Houdt J. J., Jongen G. M. y Boleiji J. S. M. 1984. Mutagenic activity of airborne particles inside outside homes. *Environ. Mutagen.* **6**: 861-869.

Husgafvel-Pursiainen K., Mäki-Paakkanen J., Norppa H. y Sorsa. M. 1980. Smoking and sister-chromatid exchange. *Hereditas* **92**: 247-250.

Husgafvel-Pursiainen. K., Sorsa M., Järventaus H. y Norppa H. 1984. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes of smokers in an experimental study. *Mutat. Res.* **138**: 197-203.

Husgafvel-Pursiainen, K., Sorsa M., Moller M. y Benestad C. 1986. Genotoxicity and polynuclear aromatic hydrocarbon analysis of environmental tobacco smoke samples from restaurants. *Mutagenesis* **1**: 287-292.

Husgafvel-Pursiainen K. 1987. Sister-chromatid exchanges and cell proliferation in cultured lymphocytes of passively smoking restaurant personnel. *Mutat. Res.* **190**: 211-215.

Husum B., Wulf H. C. y Niebuhr E. 1982a. Increased sister chromatid exchange frequency in lymphocytes in healthy cigarette smoke. *Hereditas* **96**: 85-88.

Husum B., Wulf H. C. y Niebuhr E. 1982b. Normal sister chromatid exchange in oral contraceptive users. *Mutat. Res.* **103**: 161-164.

Husum B., Wulf H. C. y Niebuhr E. 1986. Sister chromatid exchange frequency correlates with age, sex and cigarette smoking in a 5-year material of 553 healthy adults. *Hereditas* **105**: 17-21.

IARC. 1986. International Agency for Research on Cancer, Tobacco Smoking. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. **38** Lyon, Francia.

IARC. 1991. International Agency for Research on Cancer, Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxin. En: O' Neill Chen J., Barsch H. (Eds.). IARC, Lyon, Francia.

Jenkins R. A. y Gill B. E. 1980. Determination of oxides of nitrogen (NO_x) in cigarette smoke by chemiluminescent analysis. *Anal. Chem.* **52**: 925-928.

Jian S., Moriarty S. E., Miller N. R., Jones D. P. y Sternberg P. Jr. 2001. Regulations of human retinal pigment epithelial (hRPE) cell growth and cellular

glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) redox status by changing extracellular cysteine/cystina (Cys/CySS). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 75-78.

Jonas C. R., Ziegler T.R., Gu L. H. y Jones D. P. 2002. Extracellular Thiol/disulfide redox state affects proliferation rate in a human colon carcinoma (Caco2) cell line. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 1499-1506.

Kado N. Y., Manson C., Eisenstadt E. y Hsieh D. P. 1985. The kinetics of mutagens excretion in the urine of cigarette smokers. *Mutat. Res.* **157**: 227-233.

Kanai Y., Wada O. y Manabe S. 1990. Detection of carcinogenic glutamic acid pyrolysis products in cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* **11**: 1001-1003.

Kandarajian L. 1989. Federal policy options for indoor air pollution from combustion appliances. En: J. D. Harper (Eds.). *Combustion Processes and Quality of the Indoor Environment*, Air y Waste Management Association, Pittsburgh, Fil., pp. 310-321.

Kato S., Bowman K. D., Harrington A. M., Blomeke B. y Shields P. G. 1995. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 902-907.

Kato H. 1974. Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchange. *Nature* **251**: 70-72.

Kawajiri K., Nakachi K., Imai K., Yoshii A., Shinoda N. y Watanabe J. 1990. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS. Lett.* **263**: 131-33.

Kihara M. y Noda K. 1994. Lung cancer risk of GSTM1 null genotype is dependent on the extent of tobacco smoke exposure. *Carcinogenesis* **15**: 415-418.

Kihara M. y Noda K. 1995. Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. *Carcinogenesis* **16**: 2331-2336.

Krishna G., Xu J., Nath J., Petersen M. y Ong T. 1985 *In vivo* cytogenetics studies on mice exposed to ethylene dibromide. *Mutat. Res.* **158**: 81-87

Kuri M. P. y Alegre D. J. 2002. Mortalidad atribuible al consumo de tabaco en México. *Salud Publica Mex.* **44**: 29-33.

Kuri M. P. 1995. Tabaquismo: una epidemia mundial. (Boletín) Epidemiología Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. **12**: 1-2, semana 35.

Lafrente A., Pujol F., Carretero P. y Villa J. P. 1993. Human glutathione S-transferase mu deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett.* **68**: 49-54.

Lambert B., Lindblad A., Nordenskjold M. y Werelius B. 1978. Increased frequency of sister chromatid exchanges in cigarette smokers. *Hereditas* **88**: 147-149.

Lambert B. y Lindblad A. 1980. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations in lymphocytes of laboratory personnel. *J. Toxicol. Environ. Health* **6**: 1237-1243.

Lambert B., Lindblad A., Holmberg K. y Francesconi D. 1982. The use of the sister chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents. En: S. Wolff (Ed.), *Sister Chromatid Exchange*, Wiley, Nueva York, pp.149-183.

Lazutka J. R., Dedonyte V. y Krapavickaite D. 1994. Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutat. Res.* **306**: 173-180.

Lazutka J. R. 1991. Replication index in cultured human lymphocytes: Methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ. Mol. Mutagen.* **17**: 188-195.

Lee C. K., Fulp C., Bombick B. R. y Doolittle D. 1996. Inhibition of mutagenicity of *N*-nitrosamines by tobacco smoke and its constituents. *Mutat. Res.* **367**: 83-92.

Lei Y. C., Shing-Jen H., Chuen-Chau C., Hsen-Wen K., Jiin-Chyuan L., Ming J. W. C. y Tsun-Jen C. 2002 Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat. Res.* **519**: 93-101.

Li Q., Geiselhart L., Mittler J. N., Mudzinski S. P., Lawrence D. A. y Freed B. M. 1996. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **139**: 317-323.

Li Q., Aubrey M. T., Christian T. y Fredd B. M. 1997. Differential inhibition of DNA synthesis in human T lymphoblast proliferation by hydroquinone and catechol. *Fundam. Appl. Toxicol.* **38**: 158-165.

Liu L. F., Liu C. C y Alberts B. A. 1980. Type II DNA topoisomerases: enzyme wich unknot a topologically knotted DNA molecule via reversible double strand break. *Cell* **19**: 697-704.

Livingston G. K. y Fineman R. M. 1983. Correlation of human lymphocytes SCE frequency with smoking history. *Mutat. Res.* **119**: 59-64.

Löfröth G. y Lazaridis G. 1986. Environmental tobacco smoke: comparative characterization by mutagenicity assay of sidestream and mainstream smoke. *Environ. Mutagen.* **8**: 693-704.

London S. J., Daly A. K., Leathart J. B., Navidi W. C., Carpenter C. C. e Idle J. R. 1997. Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk in African-Americans in Los Angeles County. *Carcinogenesis* **18**: 1203-1214.

Lucivero G., Surico G., Mazzini A., Dell'Osso G. y Bonomo L. 1988. Age-related changes on the proliferative kinetics of phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. Analysis by uptake of tritiated precursors of DNA, RNA and proteins, and by flow cytometry. *Mech. Ageing Dev.* **43**: 259-267.

Manabe S., Tohyama K., Wada O. y Aramaki T. 1991. Detection of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), in cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* **12**: 1945-947.

Mannervik B. y Danielson U. H. 1988. Glutathione transferase structure and catalytic activity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **23**: 281-337.

Marchand L. L., Sivaraman L., Pierce L., Seifried A., Lum A., Wilkewns L. R., y Lau A. F. 1998. Association of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res.* **58**: 4858-4863.

Martelli A., Robbiano L., Cosso M., Perrone C., Tagliazucchi A., Giuliano L., Aresca G. F. y Brambilla G. 2000. Comparison of micronuclei frequencies in mono, bi- and poly-nucleated lymphocytes from subjects of a residential suburb and subjects living near a metallurgical plant. *Mutat. Res.* **470**: 211-219.

Mayne S. T. 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* **133**: 933-940.

McCabe M., Maguire D. y Nowak M. 1983. The effects of arsenic compounds on human and bovine lymphocyte mitogenesis in vitro. *Environ. Res.* **31**: 323-331.

McCue J. M., Link K. L., Eaton S. S. y Freed B. M. 2000. Quenching of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase by cigarette tar. *J. Immunol.* **165**: 6771-6775.

Miller J. A. y Miller E. C. 1977. Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. En: Hiatt H. H., Watson J. D. y Winstein J. A. (Eds.). *Origin of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 605-628.

Miller L. T., Watson W. H., Kirilin W. G., Ziegler T. R. y Jones D. P. 2002. Oxidation of the glutathione/glutathione disulfide redox state is induced by cysteine deficiency in human colon carcinoma HT29 cells. *J. Nutr.* **132**: 2303-2306.

Moriarty S. E., Shah J. H., Lynn M., Jiang S., Openo K., Jones D. P. y Sternberg P. Jr. 2003. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking. *Free Radic. Biol. Med.* **35**:1-7.

Murphy S. E. y Heiblum R. 1990. Effect of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on the metabolism of NNN and NNK by rat oral tissue. *Carcinogenesis* **11** : 1663-1666

Murthy P. B. y Prema K. 1979. Sister chromatid exchange in oral contraceptive users. *Mutat. Res.* **68**: 149-152.

Murthy P. B. y Prema K. 1983. Further studies on sister chromatid exchange frequency in users of hormonal contraceptives. *Mutat. Res.* **119**: 351-354.

Nakachi K., Imai K., Hayashi S., Watanabe J. y Kawajiri K. 1991. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in the relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.* **5**: 5177-5180.

Nakachi K., Imai K., Hayashi S. I. y Kawajiri K. 1993. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.* **53**: 2994-2999.

Nakachi K., Hayashi S. I., Kawajiri K. e Imai K. 1995. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis* **16**: 2209-2213.

Nebert D. W., Mc Kinnon R. A. y Puga A. 1996. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on the risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.* **15**: 273-280.

Nishio E. y Watanabe Y. 1997. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxanase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 289-293.

Norman V., Larsen T. M. y Moss B. L. 1983. The effect of some nitrogenous blend components on NO/NO_x and HCN levels in mainstream and sidestream smoke. *Beitr. Tabakforsch. Internat.* **12**: 55-62.

Obe G. y Herha J. 1978. Chromosomal aberrations in heavy smokers. *Hum. Genet.* **41**: 259-263.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. El tabaquismo en América Latina, Estados Unidos y Canadá (Periodo 1990-1999).

Ostrosky-Wegman P., Gonsebatt M., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J., Palao A., Cortinas C., Carcía-Vargas G., Del Razo L. M. y Cebrián M. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.* **250**: 477-482.

Painter R. B. 1980. A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **70**: 337-341.

Peluso M., Castegnaro M., Malaveille C., Talaska G., Vineis P., Kadlubar F. y Bartsch H. 1990. ³²P postlabeling analysis of DNA adducted with urinary mutagens from smokers of black tobacco. *Carcinogenesis* **74**: 3555-3559.

Perry P. y Evans H. J. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* **258**: 121-122.

Perry P. y Wolff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids exchange. *Nature* **215**: 156-158.

Peterson L. A., Ng D. K., Stearns R. A. y Hecht S. S. 1994. Formation of NADP(H) analogs of tobacco-specific nitrosamines in rat liver and pancreatic microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* **7**: 599-608.

Petres J., Baron D. y Hagedorn R. 1977. Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: Cytogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.* **19**: 223-227.

Reddy S., Finkelstein E. I., Wong P.S., Phung A., Cross C. E. y van der Vliet A. 2002. Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:1490-1498.

Rivenson A. D., Hoffman D., Prokopczyk B., Amin S. y Hecht S. S. 1988. Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and Areca-derived *N*-nitrosamines. *Cancer Res.* **48**: 6912-6917.

Rojas M. I., Cascorbi K., Alexandrov E., Kriek G., Auburtin L., Mayer A., Kopp-Schneider I., Roots H. y Bartsch T. 2000. Modulation of benzo(a)pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* **21**: 35-41.

Rojas, E., Valverde M., Sordo, M. y Ostrosky-Wegman, P. 1996. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* **370**: 115-120.

Ryberg D., Hewer A., Phillips D., y Haugen A. 1994. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female cancer patients. *Cancer Res.* **54**: 5801-5803.

Salama S. A., Abdel-Rahman S. Z., Sierra-Torres C. H., Hamada E. A. y Au W. W. 1999. Role of polymorphic GSTM1 and GSTT1 genotypes on NNK-induced genotoxicity. *Pharmacogenetics* **9**:735-743.

Salazar M., Sánchez Z. y Estrada N. 2002. El tabaquismo y su fracción atribuible en la enfermedad isquémica cardiaca. *Salud Publica Mex.* **44**: 34-43.

Salín-Pascual R. y Drucker-Colín R. 1998. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* **9**: 57-60.

Samiec P. S., Drews-Botsch C., Flagg E. W., Kurtz J. C., Sternberg P. Jr., Reed R. L. y Jones D. P. 1998. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **24**: 699-704.

Sarto F., Cominato I., Bianchi V. y Levis A. G. 1982. Increased incidence of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in workers exposed to chromic acid in electroplating factories. *Carcinogenesis* **3**: 1011-1016.

Sarto F., Cominato I., Pinton A. M., Brovedani P. G., Merler E., Peruzzi M., Bianchi V. y Levis A. G. 1984a. A cytogenetic study on workers exposed to low concentrations of benzene. *Carcinogenesis* **5**: 827-832.

Sarto F., Cominato I., Pinton A. M., Brovedani P. G., Faccioli M.C., Bianchi V. y Levis A. G. 1984b. Cytogenetic damage in workers exposed to ethylene oxide. *Mutat. Res.* **138**: 185-195.

Sarto F., Faccioli M.C., Cominato I. y Levis A. G. 1985. aging and smoking increase the frequency of sister chromatid exchanges (SCE) in man. *Mutat. Res.* **114**: 183-187.

Scarpato R., Migliore L., Hirvonen A., Falek G. y Norppa H. 1996. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of GSTM1, GSST1 and NAT2 genotypes. *Env. Mol. Mutagen.* **27**: 233-269.

Schmidt M. A. y Sanger W. G. 1981. Sister chromatid exchange in aged human lymphocyte. *Mech. Ageing. Develop.* **16**: 67-90.

Schneider E. L. 1982. Aging and sister chromatid exchange. En: Sandberg A. A. (Eds.), *Sister Chromatid Exchange*. Liss, Nueva York, pp. 195-203.

Schneider E. L. y Kram D. 1982. *In vivo* methods for detecting sister chromatid exchange. En: Wolff S. (Ed.), *Sister Chromatid Exchange*, Wiley, Nueva York, pp. 229-242.

Secretaría de Salud. 1995. Consejo Nacional contra las Adicciones. Situación actual de las adicciones. México: SSA, pp. 3-43.

Secretaría de Salud. 2001. Programa de acción contra las adicciones: Tabaco. Secretaría de Salud: www.ssa.gob.mx/unidades/conadic.

Sharma T. y Das B. C. 1986. Higher incidence of spontaneous sister-chromatid exchange (SCEs) and X-rays induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes during pregnancy. *Mutat Res.* **174**: 27-33.

Shields P. G., Caporaso N. F., Falk R. T., Sugimura H., Trivers G. E., Trump B. F., Hoover R. N., Weston A. y Harris C. C. 1993. Lung cancer, race, and CYP1A1 genetic polymorphism. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2**: 481-485.

Singh S. P., Kalra R., Puttfarcken P., Kozak A., Tesfaigzi J. y Sopori M. L. 2000. Acute and chronic nicotine exposure modulate the immune system through different pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **164**:65-72.

Soper K. A., Stolley P. D., Galloway S. M., Smith J. G., Nichols W. W. y Wolman S. R. 1984. Sister chromatid exchange (SCE) report on control subjects in a study of occupationally exposed workers. *Mutat. Res.* **129**: 77-88.

Sopori M. L., Savage S. M., Christner R. F., Geng Y. y Donaldson L. A. 1993. Cigarette smoke and the immune response: Mechanism of nicotine-induced immunosuppression. *Adv. Biosci.* **86**: 663-672.

Sopori M. L., Geng Y., Savage S. M., Kozak W., Soszynski D., Kluger M. J., Perryman E. K y Snow G. E. 1998. Effect of nicotine on the immune system: Possible regulation of immune responses by central and peripheral mechanisms. *Psychoneuroendocrinology* **23**: 198-204.

Sopori M. 2002. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nature Rev. Immunol.* **2**: 372-377.

Sorsa, M., Hemminki K. y Vainio H. 1982. Biologic monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **2**: 137-150.

Sorsa, M., Falck K., Heinonen T., Vainio H., Norppa H. y Rimpela M. 1984. Detection of exposure to mutagenic compounds in low-tar and medium-tar cigarette smokers. *Environ. Res.* **33**: 312-321.

Sorsa, M. y Lofroth G. 1989. Genotoxicity of environmental tobacco smoke and passive smoking. *Mutat. Res.* **222**: 71-72.

Spurr N. K., Gough A. C., Stevenson K. y Wolf C. R. 1987. Msp-I polymorphism detected with a cDNA probe for the P450 1 family on chromosome 15. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5901.

Staretz M. E., Murphy S. E., Nunes M.G., Koehl W. y Amin S. 1997. Comparative metabolism of tobacco smoke carcinogens benzo(a)pyrene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1butanol, and N' nitrosornicotine in human hepatic microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **25**: 154-162.

Sundqvist Y. K. L., Belinsky S.A., Castonguay A., Tjalve H. y Grafstrom R. C. 1993. Metabolism and macromolecular interaction of tobacco-specific carcinogen

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in cultured explants and epithelial cells of human buccal mucosa. *Carcinogenesis* **14**: 2383-2388.

Surgeon General. 1979. The Health Consequences of Smoking: A Reference Edition. DHHS, PHS, CDC. Office on Smoking and Health. Rockville, MD, pp. 359.

Taioli E., Trachman J., Chen X., Toniolo P. y Garte S. J 1995. A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. *Cancer Res.* **55**: 3757-3758.

Takeisha S. 1982. Induction of sister chromatid exchange by chemical agents, En: Wolff S. (Ed.), *Sister Chromatid Exchange*, Wiley, Nueva York, pp.88-147.

Taningher M., Malacarne D., Izzotti A., Ugolini D., Parodi S. 1999. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res.* **436**: 227-261.

Tefre T., Ryberg D., Haugen A., Nebert D., Skaug V., Brøgger. A. y Børresen A. 1991. Human CYP1A1 (cytochrome P₄₅₀) gene: lack of association between the MspI restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics* **1**: 20-25

Tucker J. D., et al. 1987. Variation in the human lymphocyte sister chromatid exchange frequency as a function of time: results of daily and twice-weekly sampling. *Environ. Mol. Mutagen.* **10**: 69-79.

USA. Department of Health, Education and Welfare (USDHEW). A report of surgeon general: Smoking and Health. 1979.

USA. Department of Health and Human Services (USDHHS). A report of the surgeon general: The health consequences of smoking. Cancer Public Health Service, Rockville, Maryland. 1982.

USA. Department of Health and Human Services (USDHHS). A report of the surgeon general: The health consequences of smoking. Nicotine Addiction. Office on smoking and health, Rockville, Maryland. 1988.

USA. Department of Health and Human Services (USDHHS). A report of the surgeon general: Reducing the health consequences of smoking. 25 years of progress. Washington. 1989.

USA. Department of Health and Human Services (USDHHS). A report of Surgeon General: Reducing tobacco use. Atlanta, GA. 2000

Vine M. F. 1996. Smoking and male reproduction: a review, *Int. J. Androl.* **19**: 323-337.

Vineis P., Bartsch H., Caporaso N., Harrington A., Kadlubar F., Teresa M., Malaveille L., Shields P., Skipper P., Talaska G. y Tannenbaum S. 1994. Genetically based N-acetyltransferasa metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens. *Nature* **369**:154-156.

Vijayalaxmi B. y Evans H. 1982. *In vivo* and *in vitro* effects of cigarette smoke on chromosomal damage and sister chromatid exchange in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* **92**: 321-332.

Waksvik H., Magnus P. y Berg K. 1981. Effects of age, sex and genes on sister chromatid exchange. *Clin. Gent.* **20**: 449-454.

Weiss A. y Littman D.R. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-274

Wen W. N., Lieu T. L., Chang H. J., Wu S. W., Yau M. L. y Jan K. J. 1981. Baseline and sodium arsenite-induced sister chromatid exchanges in cultured lymphocytes from patients with Blackfoot disease and healthy persons. *Hum. Gent.* **59**: 201-203.

Wolff S. y Perry P. 1974. Different Giemsa staining of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* **48**: 341-353.

WHO. (World Health Organization) The smoking epidemic-A fire in the global village. 25th August, Ginebra: 1977, Press Release WHO/61.

Wulf H. C., Husum B., Plesner A. M. y Niebuhr E. 1984. Distribution of SCEs in lymphocytes in persons with normal, slightly increased, and heavily increased SCEs. *Mutat. Res.* **125**: 263-268

Yamasaki E. y Ames B. N. 1977. Concentration of mutagens from urine by adsorption with the non polar resin XAD-2: cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 3555-3559.

Yamashita M., Wakabayashi K., Nagao M., Sato S., Yamaizumi Z., Takahashi M., Kinae N., Tomita I. y Sugimura T. 1986. Detection of 2-amino-3-methylimidazole >4,5-f<-quinoline in cigarette smoke condensate. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**: 419-422

Zurkov V. S. y Yakovenko K. N. 1976. The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals. *Mutat. Res.* **41**:108-112.

5.1 TABLAS

TABLA 1. **Componentes del humo de tabaco**

Algunos componentes de la fase de partículas del humo del cigarrillo

Componente	Concentración media por cigarrillo
Alquitrán	1-40 mg
Nicotina	1-2.5 mg
Fenol	20-150 mg
Catecol	130-280 mg
Pireno	50-200 mg
Benzo (a) pireno	20-40 mg
2,4 Dimetilfenol	49 mg
m- y p-Cresol	20 mg
p-Etilfenol	18 mg
Sigmasterol	53 mg
Fitosteroles (total)	130 mg

Algunos componentes de la fase gaseosa del humo del cigarrillo

Componente	Concentración media por cigarrillo
Dióxido de carbono	20-60 mg
Monóxido de carbono	10-20 mg
Metano	1.3 mg
Acetaldehido	770 mg
Isopreno	582 mg
Acetona	100-600 mg
Cianidina de hidrógeno	240-430 mg
2-Butanona	90-250 mg
Tolueno	108 mg
Acetonitrilo	120 mg
Acroleína	84 mg
Amoniaco	80 mg
Benceno	67 mg
Nitrobenceno	25 mg

Fuente: Surgeon General, 1979

TABLA 2. Frecuencias de la cinética de proliferación celular (CPC), índice de replicación (IR) e índice mitótico (IM) de mujeres fumadoras y no fumadoras (grupo testigo).

Individuo	Número de cigarrillos	Tiempo fumando (años)	Cinética de proliferación celular de mujeres fumadoras					Cinética de proliferación celular de mujeres no fumadoras (grupo testigo)				
			1ª	2ª	3ª	IR	IM	1ª	2ª	3ª	IR	IM
1	12	48	60	31	9	1.49	6.2	33	45	22	1.89	3.6
2	12	31	40	54	6	1.66	3.3	27	42	31	2.04	4.4
3	40	14	58	19	23	1.65	7.4	30	42	28	1.98	5.0
4	20	34	43	33	24	1.81	13.0	29	43	28	1.99	4.2
5	6	35	38	29	33	1.95	3.9	26	45	29	2.03	3.9
6	20	25	39	32	29	2.06	7.1	28	43	29	1.96	3.8
7	35	28	60	19	21	1.61	5.1	26	39	35	2.09	3.4
8	25	12	22	38	41	2.06	6.7	32	37	31	1.99	3.5
9	40	20	47	40	13	1.66	3.3	27	42	31	2.11	4.4
10	25	50	41	33	26	1.85	5.8	27	43	30	2.03	3.7
11	40	40	38	52	10	1.82	7.7	23	45	32	2.07	5.1
12	15	21	71	22	7	1.36	6.2	16	46	38	2.22	4.4
13	20	18	93	5	2	1.09	3.3	27	42	31	2.11	3.6
14	14	61	59	20	21	2.00	3.3	33	45	22	1.89	4.2
15	40	39	90	6	4	1.14	3.3	29	43	28	1.99	3.1
Suma			799	433	268	25.11	85.6	413	642	445	30	60
\bar{X}			53.3**	28.9**	17.9**	1.6***	5.7*	27.5	42.8	29.7	2.0	4.0
D.E.			19.8	14.2	11.5	0.3	2.6	4.2	2.4	4.1	0.1	0.6
E.E.			5.1	3.7	2.9	0.7	0.7	1.1	0.6	1.1	0.0	0.1

- Se aplicó la X^2 para la CPC y el IM
- Se aplicó la "t" de Student para el IR en 100 metafases
- *Significativo $p < 0.01$
- **Significativo $p < 0.001$
- *** Significativo $p < 0.0001$

TABLA 3. Frecuencias de la cinética de proliferación celular de mujeres fumadoras y no fumadoras, índice de replicación (IR) e índice mitótico (IM), así como número de cigarrillos fumados y tiempo fumando de cada participante.

Individuo	Núm. de cigarrillos	Tiempo fumando (día)	Cinética de proliferación Celular de mujeres fumadoras					Cinética de proliferación celular de mujeres no fumadoras (grupo testigo)				
			1ª	2ª	3ª	IR	IM	1ª	2ª	3ª	IR	IM
16	25	29	78	19	3	1.79	B	26	39	35	2.09	3.4
17	15	32	59	36	5	1.28	B	26	45	29	2.03	3.9
18	20	33	89	4	3	A	B	23	45	32	2.09	3.1
19	20	24	86	5	1	A	B	27	43	30	2.03	3.7
20	25	9	42	0	5	A	B	27	43	30	1.85	4.3
21	15	2	13	0	1	A	B	31	42	27	1.96	2.8
22	20	17	Inhibición celular					26	39	35	2.09	3.4
23	20	32	Inhibición celular					32	40	28	1.96	5.1
24	12	33	Inhibición celular					23	45	32	2.09	3.1
25	10	20	49	9	8	A	B	27	42	31	2.11	4.4

A) No se completaron las 100 metafases para obtener el IR

B) No se completaron las 3000 células en interfase para obtener el IM

TABLA 4. Frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) de mujeres fumadoras* y no fumadoras* que conformaron el grupo testigo.

Individuo	Edad	Número de cigarrillos/día	Tiempo fumando	ICH/Metafase en fumadoras			ICH/Metafase no fumadoras		
				\bar{X}	\pm	E. E.	\bar{X}	\pm	E. E.
1	73	12	48	7.20		0,68	3		0.302
2	49	12	31	3.30		0,30	4		0.264
4	54	20	34	2.58		0,26	3		0.365
5	50	6	35	2.78		0,25	3		0.248
6	40	20	25	3.18		0,36	4		0,337
7	44	35	28	3.14		0,28	4		0.38 i
8	40	25	12	2.54		0,22	4		0.247
9	39	40	20	4.14		0,43	3		0.216
10	64	25	50	3.16		0,26	3		00291
11	58	40	40	4.65		1,45	3		0.247
			Suma	37			34		
			\bar{X}	3.7			3.4		
			D. E.	1.4			0.5		
			E. E.	0.45			0.16		

* n= 50 metafases

TABLA 5. Frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en mujeres fumadoras y no fumadoras

Individuo Número	Edad (años)	Número de cigarros (día)	Tiempo fumando (años)	ICH/Metafase en fumadoras			ICH/Metafase no fumadoras		
				\bar{X}	\pm	E. E.	\bar{X}	\pm	E. E.
25	39	10	20		A		3	\pm	0.216
17	50	15	32		A		3	\pm	0.248
12	36	20	21		A		3	\pm	0.392
13	39	14	18		A		3	\pm	0.216
14	65	40	61		A		3	\pm	0.302
15	54	7	39		A		3	\pm	0.365
16	44	25	29		A		4	\pm	0.381
18	47	20	33		A		3	\pm	0.251
19	64	20	24		A		3	\pm	0.291
20	26	25	9		A		3	\pm	0.278
21	18	15	2		A		3	\pm	0.258
22	44	20	17		A		4	\pm	0.381
23	47	12	33		A		3	\pm	0.251
24	49	20	32		A		3	\pm	0.216

A) No se completaron metafases de segundo ciclo (<50) para determinar los ICH

5.2 ANEXO

LINEAMIENTOS BIOETICOS PARA LOS INVESTIGADORES Y PERSONAS DE ESTUDIO.

RESPECTO A LAS PERSONAS

De acuerdo al **Artículo 13, párrafo primero del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud**, en vigor; “En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio de respeto a su dignidad y la protección a sus derechos y su bienestar”.

OBLIGATORIEDAD

De acuerdo al **Artículo 42, párrafo primero, de la Ley de Información Estadística y Geografía**, en vigor “Los informantes estarán obligados a proporcionar con veracidad y oportunidad los datos e informes que les solicitan las autoridades competentes para fines estadísticos, censales y geográficos, y a prestar el auxilio y cooperación que requieran las mismas”.

CONFIDENCIALIDAD

Conforme a las disposiciones del **Artículo 16, del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud**, en vigor; “En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y este lo autorice”.

En la referencia directa el **Artículo 38, de la Ley de Información Estadística y Geografía**, en vigor; enuncia “Los datos e informes que los participante proporcionen para fines estadísticos o provengan de registros administrativos o civiles, serán manejados para efectos de seta Ley, bajo la observancia de los principios de confidencialidad y reserva y no podrán comunicarse, en ningún caso; en forma nominativa o individualizada, ni harán prueba ante autoridad administrativa o fiscal, ni en juicio o fuera de él”.

INER

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

DIRECCION DE INVESTIGACION
COMITE CIENTIFICO

México, D.F. a 13 de junio de 2002
DAT-2002-138

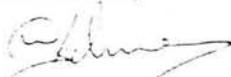
Dr. Raúl Sansores Martínez,
Investigador Principal
Presente

Por medio de la presente, le informo que su protocolo: "**Estudio ambiental y evaluación clínica de fumadores activos e involuntarios expuestos en ambientes intramuros (casa-habitación) contaminados con humo de tabaco (gases y partículas)**", fue revisado por los Comités Científico y Bioético y ha sido:

APROBADO

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente,



Dr. Moisés Selman Lama,
Director de Investigación

c.p. **Dr. José Pérez Neria,**
Comité de Bioética