



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de micronúcleos y otras anomalías nucleares en células del epitelio urinario de fumadores intensos y su asociación con los niveles de nicotina y cotinina detectados en la orina.

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:

EMMANUEL RAMÍREZ HERRERA

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



2006



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno
Ramírez
Herrera
Emmanuel
55 95 59 21
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología.
2. Datos del tutor
Doctora
María del Carmen Leticia
Calderón
Ezquerro.
3. Datos del sinodal 1
Doctora
Sandra Luz
Gómez
Arroyo.
4. Datos del sinodal 2
Doctor
Rafael
Villalobos
Pietrini.
5. Datos del sinodal 3
Doctora
María Elena
Calderón
Segura.
6. Datos del sinodal 4
Maestra en Ciencias
Ana Rosa
Flores
Márquez.
7. Datos del trabajo escrito
Título. Evaluación de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en células del epitelio urinario de fumadores intensos y su asociación con los niveles de nicotina y cotinina detectados en la orina
Número de páginas. 76
Año. 2006.

Agradecimientos

- *A mi directora de tesis, Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Por haberme enseñado tantas cosas valiosas tanto académicas como personales, por el cariño brindado y por que siempre estuvo la puerta abierta para cualquier duda o aclaración. Además, por el gran ser humano que es. Gracias por todo.*
- *A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por el gran ser humano que es, por todos sus consejos y por el invaluable apoyo para la realización de este trabajo, así como por sus acertados comentarios y el cariño brindado.*
- *Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por su valiosa revisión, apoyo y consejos sobre la realización de este trabajo.*
- *A la Dra. María Elena Calderón Segura por su apoyo, amistad y siempre buena disposición para cualquier duda, además de su valiosa revisión.*
- *A la M. en C. Ana Rosa Flores por todo su apoyo en el laboratorio, por la valiosa revisión de este trabajo, por sus consejos, por la gran persona que es y por la amistad brindada.*
- *Al M. en C Omar Amador Muños por su inestimable apoyo en la estandarización de la técnica para la cuantificación de la nicotina y cotinina y por su gran dedicación en el análisis de las muestras.*
- *Al Dr. René Drucker Colín por el apoyo brindado para la realización de la técnica de extracción de nicotina.*
- *A los Drs. M. en C. Ana Moreno Coutiño y René Drucker Colín por las facilidades brindadas para la obtención de las muestras.*

- *Al M. en Q. Hugo Saldañriaga Noreña y al M. en B. Leonel Hernández Mena por su apoyo en el análisis de las muestras de nicotina y cotinina.*
- *Al Dr. Raúl Sansores de la Clínica Anti-Tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por su amable ayuda, colaboración y labor de convencimiento en la búsqueda de los participantes de este estudio.*
- *Al Sr. Raúl Belmont Dávila por su apoyo en la estadística de este trabajo.*
- *Al Dr. José Luis Bravo Cabrera por el apoyo brindado en la estadística y por tan buenos consejos aportados para la realización de este trabajo.*
- *Al Lic. Francisco Estrada Porrúa por el apoyo y buenos consejos brindados para la realización de este trabajo, así como por su amistad y cordialidad de siempre.*
- *Al Biólogo Cesar Guerrero Guerra por todos sus consejos, apoyo y por colaborar en el arduo trabajo de las extracciones de nicotina y cotinina.*
- *A los Biólogos Selene Andrade y Antonio Reyes por todo el apoyo y los consejos brindados para la realización de este trabajo.*
- *A la Clínica Anti-Tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por toda la ayuda otorgada.*
- *Al Centro de Ciencias de la Atmósfera y en especial a los laboratorios de Citogenética Ambiental y Mutagénesis Ambiental por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.*
- *A las señoras: Emma y Vicky del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM por todo el apoyo y cariño brindados.*
- *A todas las personas que amablemente donaron las muestras. Gracias.*

Dedicatorias

- *A Dios por haberme creado.*

- *A mis padres por todo el amor, cariño, comprensión, apoyo, dedicación en educarme, guiarme y por estar siempre a mi lado. Por ser un ejemplo a seguir y unas maravillosas personas, por estar en cada momento bueno y malo. Gracias.*

- *A mi gran amor Erika por todo su apoyo, cariño, sus consejos, enseñanzas pero lo más importante por ser mi mejor amiga y por ser una gran mujer, y por estar allí siempre que la he necesitado. Te amo mi amor.*

- *A mis Abuelos Cuquis, Malu y Juve por su apoyo incondicional su cariño y todo su amor.*

- *A mis tíos Pepe, Mar, Chava, Paty, Temo, Ana Rosa, Marilú, Licha, Ismael y Mary por estar siempre a mi lado apoyándome y guiándome.*

- *A mis primos Pris; José, Meli, Magui, Miner Ismailito, Christian, Gary, Liz, Erick, Maury, Sandy y Ale, por estar a mi lado compartiendo todas las aventuras y por apoyarme siempre.*

- *A mi sobrina Fernanda por traer siempre alegría a nuestros días.*

- *A todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias.*

- *De todo corazón a la comunidad del anillo del laboratorio de citogenética y mutagénesis ambiental: Cony, Fer, Martita, Rodrigo, Rocío, Sofía, Alejandro P., Lilia, Ivonne, Ivonn, Alejandro F., Hilda Adriana, Eréndira, Julia, Isabel, Ana, Adriana, Zaira, Liliana, Nallely y Fabián por todo su apoyo y cariño.*

- *A mi siempre amiga Carolina por su amistad y apoyo de siempre.*

- *A todos aquellos que siempre me alentaron a seguir adelante y que siempre me apoyaron, brindándome su amistad y cariño.*

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmosfera. UNAM, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro.

INDICE

Contenido	Página
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Tabaquismo.....	6
Problemática.....	6
Compuestos químicos contenidos en el humo de cigarrillos.....	11
Alquitrán.....	11
Monóxido de carbono.....	11
Nitrosaminas.....	11
Nicotina.....	12
Cotinina.....	13
Biomarcadores de exposición.....	14
Daño genotóxico.....	15
Aberraciones cromosómicas.....	17
Sistemas de prueba para evaluar el daño genotóxico.....	19
Micronúcleos.....	20
Formación de micronúcleos.....	21
Características que deben cumplir los micronúcleos.....	24
Micronúcleos y otras anomalías nucleares.....	28
Antecedentes.....	30
Estudios de micronúcleos en epitelio urinario y bucal.....	30
Micronúcleos de fumadores.....	30

Hipótesis y Objetivos.....	35
Objetivo general	35
Objetivos particulares	36
Material y Métodos.....	37
Selección de las personas para la evaluación.....	37
Toma de muestras y prefijación.....	37
Lavado y fijación de la muestra.....	38
Preparación de laminillas.....	38
Hidrólisis de muestras de orina.....	39
Tinción de las laminillas.....	39
Preparación del reactivo de Schiff.....	39
Etiquetado de laminillas.....	40
Examen microscópico.....	40
Determinación y cuantificación de nicotina y cotinina.....	41
Extracción de nicotina y cotinina.....	41
Análisis cromatográfico.....	41
Análisis estadístico.....	42
Resultados.....	43
Variaciones intergrupales en la frecuencia de MN y otras AN.....	43
Cuantificación de nicotina y cotinina.....	47
Diferencias encontradas en un intervalo de siete meses.....	50
Fotografías de MN y otras AN observadas.....	54
Discusión.....	56
Conclusiones.....	64
Referencias.....	66

RESUMEN

En este estudio, se evaluó el daño genotóxico causado por el humo del tabaco en 30 fumadores intensos que asistieron a la Clínica Anti-tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), con la intención de dejar de fumar. Asimismo, se determinó el daño al ADN a lo largo de siete meses, después de que los fumadores abandonaron dicha adicción (ex-fumadores).

El análisis citogenético para evidenciar los efectos del tabaco, se realizó mediante el ensayo de micronúcleos (MN) y otras anormalidades nucleares (AN) en células del epitelio urinario. Al aplicar la prueba estadística U de Mann-Whitney a los resultados obtenidos, se encontró que había diferencia significativa entre la frecuencia de MN de los fumadores y sus testigos correspondientes. Asimismo, la frecuencia de células en picnosis también presentó incremento significativo. La evaluación del grupo de ex-fumadores mostró un decremento tanto de MN como de las otras AN a lo largo del tiempo, aunque en el tercer y cuarto mes se observó un ligero incremento.

El contenido de nicotina y cotinina en la orina de los fumadores y de los testigos fue determinado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, registrándose concentraciones mayores en el grupo de fumadores. Los niveles de nicotina y cotinina encontrados en los fumadores se asociaron mediante la prueba de correlación de Spearman con las frecuencias de MN y otras AN, observándose correlaciones significativas entre la cotinina y la frecuencia de MN y cariorrexis aunque en esta última no fue posible obtener resultados significativos en el análisis citogenético.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el hombre está expuesto a una gran diversidad de agentes químicos que contaminan el ambiente, los cuales ponen en riesgo la integridad del material genético y por consiguiente la salud. Aunado a esto, existen grupos de personas que de manera voluntaria ingieren o se exponen a compuestos mutagénicos o carcinogénicos, tales como los que se encuentran en el humo del tabaco.

El tabaquismo está catalogado como la mayor fuente de exposición a carcinógenos de la población en general y es considerado como un grave problema de salud pública cuyo impacto negativo se ha extendido por todo el planeta (Zavos y Zarmakoupis-Zavos, 1999; Pavanello *et al.*, 2002; DeMarini, 2004; Denton *et al.*, 2004; Tutka *et al.*, 2005). Por lo anterior, se han realizado estudios epidemiológicos y experimentales, que relacionan el hábito de fumar con la etiología de varios cánceres humanos, particularmente aquellos del sistema respiratorio que son la principal causa de muerte a nivel mundial (Burgaz *et al.*, 1995; Hecht, 1999a; Zavos y Zarmakoupis-Zavos, 1999; Arif *et al.*, 2000; Bonassi *et al.*, 2003; Dhar, 2004; Tutka *et al.*, 2005).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha identificado al consumo de cigarrillos como el causante de neoplasias en más órganos que ningún otro carcinógeno humano, principalmente cáncer de pulmón, de la cavidad oral, de la nasal, de los senos paranasales, de la laringe, del esófago, del estómago, del páncreas, del hígado, del riñón, del útero, de la vejiga urinaria, del cérvix y de la médula espinal (Burgaz *et al.*, 1995; Zavos y Zarmakoupis-Zavos, 1999; DeMarini, 2004; Hill *et al.*, 2005). Hasta ahora, los mayores problemas se habían confinado en gran medida a los países industrializados sin embargo, la promoción actual y la adopción de este hábito en los países en vías de desarrollo ha dado como resultado, un incremento en las enfermedades relacionadas con fumar (DeMarini, 2004).

El monitoreo citogenético ha sido tradicionalmente utilizado para la vigilancia de poblaciones expuestas a mutágenos ambientales incluyendo la radiación ionizante, agentes químicos, factores relacionados con el estilo de vida (tabaco, alcohol, alimentos, vitaminas, etc.), así como para tratamientos médicos (Majer *et al.*, 2001). La validez de estos estudios ha sido reforzada por los hallazgos recientes en poblaciones de diferentes partes del mundo, los cuales han mostrado a las aberraciones cromosómicas (AC), como una prueba para predecir el riesgo de padecer cáncer, robusteciendo su uso en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos (Brögger *et al.*, 1990; Bonassi *et al.*, 2000; Norppa, 2004).

Para corroborar el daño ocasionado al ADN por algún agente, es necesario recurrir a ensayos que indiquen cuando el material genético fue alterado. Para ello, existen diversas pruebas como: electroforesis unicelular (ensayo cometa), aductos, intercambio de cromátidas hermanas (ICH), AC y micronúcleos (MN) (Albertini *et al.*, 2000).

El ensayo de MN es utilizado para evaluar el impacto ambiental, genético y de estilo de vida en la susceptibilidad genómica de seres humanos (Neri *et al.*, 2003), ya que puede detectar daño al ADN tanto por pérdida como por rompimiento cromosómico de forma más rápida que la detección de AC (Martelli *et al.*, 2000; Fenech, 2000, 2002).

El análisis de MN se lleva acabo tanto en células de exfoliación como en células de sangre periférica, como es el caso de los linfocitos, que son cultivados para su observación. Las células de exfoliación no requieren de estimulación celular, no es un método invasivo y se pueden realizar muestreos repetidos (Fenech, 2000). También tiene la ventaja de un conteo fácil, bajo costo y tiempo relativamente corto para obtener resultados (Neri *et al.*, 2003).

Las células del epitelio urinario han sido utilizadas para evaluar el daño genotóxico, causado por el consumo de cigarrillos, ya que éstas se encuentran en contacto directo con los compuestos del humo del tabaco que ingresa al cuerpo, así como con los compuestos metabólicos derivados de ellos. Por lo que, la cuantificación de MN en células de epitelio urinario es una prueba apropiada para evaluar el daño al ADN (Burgaz *et al.*, 1995; Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000).

En el presente estudio, se evaluó el posible daño citogenético en fumadores intensos que viven en la Ciudad de México y su correlación con los niveles de nicotina y cotinina.

TABAQUISMO

Problemática

El tabaco es una planta originaria del continente americano, es el nombre común de dos plantas de la familia Solanácea, las especies *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana rustica*. Los indígenas del Caribe fumaban el tabaco valiéndose de una caña en forma de pipa llamada tobago, de donde deriva el nombre de la planta. Al parecer le atribuían propiedades medicinales y lo usaban en sus ceremonias (OPS, 1992; Belsasso, 2001).

Tiempo después el diplomático Jean Nicot, a quien la planta debe el nombre genérico de Nicotina, introdujo la semilla en Francia en 1560. En el siglo XVII se extendió a China, Japón y a la costa occidental de África. Posteriormente, el consumo de tabaco provocó que la América colonial anglosajona se convirtiera en el primer productor mundial de tabaco (OPS, 1992; Belsasso, 2001).

En 1964 surgieron los primeros reportes de los daños a la salud ocasionados por el tabaco, desde entonces se han invertido miles de millones de dólares en estudiar y tratar las diversas enfermedades relacionadas con el tabaquismo. Se estima que los costos relacionados con fumar exceden los 68 millones de dólares anuales (Villalba-Caloca *et al.*, 2001).

En el siglo XX, el tabaquismo se convirtió en una de las principales causas prevenibles de enfermedades y muerte en el mundo (Zavos y Zarmakoupis-Zavos, 1999; Denton *et al.*, 2004).

En la actualidad el hábito de fumar se considera como uno de los problemas más importantes de salud pública, esto es debido a la gran cantidad de padecimientos crónicos, progresivos e incapacitantes que ocasiona y que en la

mayoría de los casos, termina con la muerte prematura de los fumadores (Villalba-Caloca *et al.*, 2001).

Debido a que es una sustancia adictiva, socialmente aceptada y de consumo legal, su demanda lejos de disminuir, ha ido en aumento en muchos países. Sobre todo entre los jóvenes que son el principal mercado de las tabacaleras (WHO, 1997; SSA/CONADIC, 2000; Belsasso, 2001).

A nivel mundial, se estima que existen más de mil millones de fumadores; de los cuales, cerca de tres millones mueren al año debido al consumo de tabaco. Al incrementarse dicho hábito se calcula que la tasa de defunción anual llegue a ser de diez millones dentro de 30 a 40 años. Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), sugiere que de la población actual fallecerán quinientos millones de personas por enfermedades asociadas al tabaquismo (Salud Pública de México, 2000; Kuri *et al.*, 2002; DeMarini, 2004).

La OMS señala que de la población mundial el 30 % de los adultos son fumadores de los cuales 3.5 millones fallecen al año, lo que equivale a la muerte de siete personas cada minuto (Kuri *et al.*, 2002). Asimismo, ha establecido que el hábito de fumar cigarrillos es causa directa o indirecta de cerca de cuatro millones de defunciones al año en todo el mundo y de éstas, la tercera parte ocurre en países en desarrollo (BM/OPS, 2000; Belsasso, 2001).

En los últimos años, el consumo del tabaco en México ha mantenido una tasa de crecimiento anual del 20 % (Salud Pública de México, 2000), aunque el consumo *per cápita* ha disminuido de 1501 cigarrillos anuales en 1970 a 754 en 1997.

La Encuesta Nacional sobre Adicciones realizada en México durante el año de 1998, señaló que el 27 % de la población entre 12 y 65 años era fumadora, lo que representó más de 13 millones de habitantes. Haciendo hincapié, que el grupo

de edad con mayor prevalencia de tabaquismo fue el de 18 a 29 años. Destacando al mismo tiempo, que de la población en general alrededor del 10 % eran fumadores adolescentes (Villatoro *et al.*, 1998).

Al comparar la proporción de hombres fumadores con respecto al de las mujeres, en 1988 era de 3:1, mientras que diez años después se encontró que ésta disminuyó a 2:1 (Belsasso, 2002; CONADIC, 2003).

Al analizar las 10 primeras causas de mortalidad, se puede inferir la magnitud del daño ocasionado por el tabaquismo. De acuerdo con las estadísticas de mortalidad reportadas por el INEGI, las principales causas están en relación muy estrecha con este hábito. En 1997, de 440,437 muertes que se registraron, las enfermedades del corazón ocuparon el primer lugar. El segundo, los tumores malignos y el quinto, las afecciones cardiovasculares, todas estas enfermedades están vinculadas, en más del 80 % a esta adicción. De los tumores malignos el primer lugar lo ocupó el cáncer de pulmón, con el 12 % siendo el tabaquismo el factor de riesgo más importante para estas neoplasias (Villalba-Caloca *et al.*, 2001).

También la tasa de muerte por cáncer de pulmón ha aumentado en ambos sexos durante los últimos años en México, siendo más elevada entre los hombres en una proporción de 2.5 hombres por 1 mujer. Sin embargo, esta relación se está modificando, debido al incremento en el consumo de tabaco por las mujeres. Análisis estadísticos mostraron que entre 1992 y 1998 la mortalidad por tumores malignos de labio, cavidad bucal y faringe tendió a elevarse llegándose a registrar, en ese último año, a 735 defunciones (Belsasso, 2002; CONADIC, 2003).

La exposición directa o indirecta al humo del tabaco está asociada con el riesgo de padecer cáncer de pulmón, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades isquémicas cardíacas. En México, el tabaquismo representa la principal causa de muerte, con 42,516 defunciones registradas en

1997, con una tendencia ascendente desde hace más de 10 años (Sesma *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2002). Asimismo, en el año 2000, se estimó que más de 40,000 defunciones anuales están asociadas al consumo del tabaco, lo que equivale a 122 personas aproximadamente por día (Tapia *et al.*, 2001). El costo que este problema de salud pública tiene para la sociedad se refleja en las muertes prematuras, en la invalidez de la población productiva y en el deterioro de la calidad de vida de los mexicanos. Además, de que la atención a los padecimientos agudos y crónicos causados por el tabaquismo afectan severamente el presupuesto de los sistemas de atención a la salud (Villalba-Caloca *et al.*, 2001).

El fumar cigarrillos es el principal factor etiológico de cánceres pulmonares humanos. Hay reportes que indican que el 87 % de éstos se deben al hábito de fumar. La nicotina, el principal componente del tabaco, es la responsable de la adicción al cigarrillo y puede también estar involucrada en la carcinogénesis pulmonar. Se han identificado potentes carcinógenos pulmonares en el humo del cigarrillo, dentro de los cuales se encuentran: NNK, nitrosamina específica del tabaco, BaP benzo[a]pireno y PhIP amina heterocíclica (Hecht, 1999a, b; Zavos y Zarmakoupis-Zavos, 1999; Brown *et al.*, 2001; Hecht, 2002). Estos compuestos requieren de la activación metabólica mediada por las enzimas citocromo P450 para ejercer su efecto carcinogénico o tóxico (Wang *et al.*, 2005).

El humo del tabaco contiene una mezcla compleja de compuestos químicos, incluyendo más de 60 carcinógenos, de los cuales las aminas aril, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas específicas del tabaco son las más estudiadas (Hecht, 1999a; Zavos y Zarmakoupis-Zavos, 1999; Brown *et al.*, 2001; Bonassi *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2003; Mohamadi *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2005). Se considera que estos productos químicos potencian su efecto después de haberse conjugado en el hígado (Kadlubar *et al.*, 1977; Wolf *et al.*, 2005).

Numerosas sustancias que están presentes en el humo del tabaco se convierten tanto en mutágenos como en carcinógenos al pasar por la activación metabólica son biotransformados a metabolitos más reactivos (Kadlubar *et al.*, 1992; Guengerich y Shimada, 1998; Satarug *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004). Ésta acción está mediada por la activación de las enzimas de la fase I, tales como son los miembros de la superfamilia de los citocromos P450 que incluye cuatro familias CYP1, CYP2, CYP3, y CYP4, que están involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Nebert *et al.*, 1996; Georgiadis *et al.*, 2004). Los agentes genotóxicos incluyendo los intermediarios reactivos producidos por las reacciones enzimáticas, también pueden ser transformados en metabolitos que son fácilmente excretados del cuerpo. Tales vías de desintoxicación son mediadas por las proteínas de la fase II, como la glutatión S-transferasa (GST) ó las familias N-acetiltransferasa (NAT) (Georgiadis *et al.*, 2004). Si los metabolitos reactivos no se pegan a las enzimas de la fase II pueden unirse al ADN ó a proteínas formando enlaces covalentes llamados aductos. Éstos, posteriormente causan mutaciones o alteraciones en las funciones enzimáticas y al presentarse éstas en las células, se puede promover la carcinogénesis. La formación eventual de aductos con el ADN en la vejiga, pueden ser el resultado de la reactivación, oxidación e incorporación de dichos metabolitos en las células uroteliales (DeMarini, 2004).

COMPUESTOS QUÍMICOS CONTENIDOS EN EL HUMO DE CIGARRILLOS

Alquitrán

Son los compuestos que se encuentran en la fase particulada del humo del tabaco, donde la mayoría son tóxicos y cancerígenos. El alquitrán se acumula en los pulmones de los fumadores, dificultando la entrada del oxígeno (Salazar *et al.*, 2002).

Monóxido de carbono

Es un gas incoloro y muy tóxico que se desprende de la combustión del tabaco y del papel del cigarro. Al aspirarse por vía pulmonar, desplaza al oxígeno y forma carboxihemoglobina, sustancia no apta para el transporte de oxígeno. El no fumador tiene 2 % de carboxihemoglobina en sangre, mientras que el fumador supera el 8 %, llegando hasta el 12 % y 14 %. Estas tasas producen disminución de la entrada de oxígeno, menor fijación de éste a la hemoglobina y aumento presumible de la arteriosclerosis, entre otros efectos (De Flora *et al.*, 2003).

Nitrosaminas

Las nitrosaminas en el humo del tabaco provocan cáncer de pulmón, de hígado y de las fosas nasales. Esta sustancia causante de cáncer se combina y daña el material genético dentro de cada célula. Como resultado, ésta muere o se transforma en célula cancerígena. La corriente secundaria de humo posee una concentración de este material tóxico 800 veces mayor que la de la corriente principal de humo (De Flora *et al.*, 2003).

Los componentes del humo de tabaco que contienen nitrógeno, tales como el amoníaco, también se convierten en nitrosaminas en el interior del cuerpo. Asimismo, los radicales libres destruyen y alteran el material genético de las

células. El daño a los tejidos provocado por éstos es asociado con el inicio del cáncer, enfermedades cardíacas y enfisema (De Flora *et al.*, 2003).

Nicotina

Es una amina terciaria compuesta por un anillo de piridina y otro de pirrolidina (Tutka *et al.*, 2005) (Fig. 6). Una vez absorbida, la nicotina es metabolizada por el hígado en gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios. Durante la cosecha y la fermentación la nicotina es convertida en numerosos compuestos biológicos importantes, entre las que destacan las nitrosaminas específicas del tabaco. La absorción de la nicotina puede ocurrir a través de la cavidad oral, piel, pulmones, paredes urinarias y tracto gastrointestinal. La nicotina que proviene de la combustión de los cigarrillos, se absorbe en 90 % en los pulmones (cada cigarrillo puede contener hasta 3.5 mg). La absorción de la nicotina en las paredes de la vejiga urinaria parece depender del pH de la orina. El movimiento de la nicotina a través de la mucosa de las paredes se incrementa cuando el alcaloide está sin ionizar y el pH está entre 8 y 9. Si está por debajo de 6 en la orina puede ser reabsorbida (Husgafvel- Pursiainen, 2004; Yildiz, 2004).

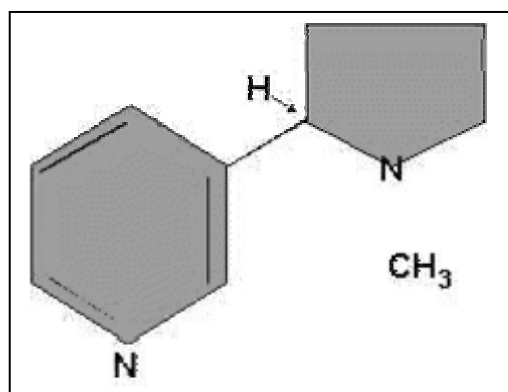


Figura 6. Fórmula estructural de la nicotina

La vida media de la nicotina es muy corta ($t_{1/2}$ alrededor de 2.6 h) y esto predispone su uso como un marcador preciso de la cantidad que una persona

ingiere por fumar cigarrillos. La cotinina es su metabolito principal, tiene una vida media de entre 15 y 17 horas y se ha convertido en un mejor marcador biológico para la cuantificación de la ingesta de nicotina (Tricker, 2003).

La medición de la nicotina y sus metabolitos en fluidos biológicos tiene la ventaja de ser específica para el consumo de cigarrillos, pero no es un indicador de la exposición a genotóxicos. Cuando el hábito de fumar se convirtió en uno de los estudios más importantes de exposición a genotóxicos en el ambiente, la medición de la nicotina urinaria y su metabolito la cotinina, ha sido muy usada para comprobar el consumo de cigarrillos. El incremento de la mutagenicidad en la orina de fumadores en comparación con personas no fumadoras, fue demostrada por primera vez por Yamasaki y Ames (1977) y desde entonces ha sido confirmada en varios estudios, indicando claramente, una exposición interna de los fumadores a agentes genotóxicos (Yamasaki y Ames, 1977; Pavanello, 2002).

Cotinina

La cotinina es un metabolito de la nicotina que se forma en el cuerpo cuando una persona ha estado en contacto por consumo y/o exposición al humo de tabaco (Fig. 7). Los niveles de cotinina en el organismo determinan el grado de exposición a la nicotina y es posible cuantificarla en muestras biológicas como sangre, saliva y orina (Byrd *et al.*, 1992; Adler *et al.*, 2003).

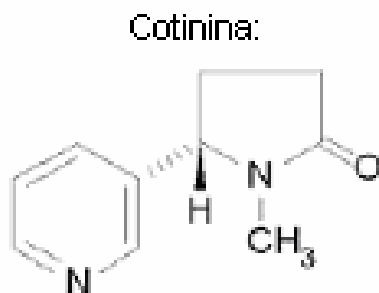


Figura 7. Fórmula estructural de la cotinina

BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

Existen diversos marcadores bioquímicos de la exposición a humo del tabaco que son producto de la pirolisis (combustión incompleta del tabaco que da como resultado diversos productos químicos) de los diversos componentes del mismo y son transformados en metabolitos tales como monóxido de carbono, tiacinato, óxido de nitrógeno, etilen 4 aminobifelin, nitrosaminas específicas del tabaco, nicotina y cotinina. Estos biomarcadores pueden determinarse en líquidos orgánicos y/o en el aire exhalado (Montes *et al.*, 1998; Doctor *et al.*, 2004).

Algunos de los compuestos antes mencionados, son inespecíficos para el tabaco, ya que pueden ser el resultado de reacciones ajenas a los compuestos del cigarrillo. Un ejemplo de ello, es la degradación pirolítica de los aminoácidos y proteínas del tabaco durante el proceso de fumar, lleva a la liberación de cianuro de hidrógeno en cantidades menores a 10 microgramos por cigarrillo. El cianuro de hidrógeno inhalado se absorbe rápidamente y el hígado lo convierte en tiacinato. Debido a que el tiacinato también puede derivar de la dieta alimenticia, éste es un marcador poco sensible para cuantificar la cantidad de humo inhalado (Montes *et al.*, 1998; Dhar, 2004).

Por lo anterior, la determinación de nicotina y cotinina es la que se utiliza cada vez con más frecuencia. La cotinina como se menciona anteriormente, es el principal metabolito de la nicotina y es el resultado de la oxidación del anillo de piridina. Debido a su estabilidad, su vida media es más larga que la de la nicotina (19 h contra 30 min) y al mismo tiempo su concentración en sangre, orina o saliva es mayor que la de nicotina, por lo que la cuantificación de este metabolito se ha utilizado como indicador de consumo de tabaco y de abstinencia, así como de exposición a humo de tabaco ambiental (Montes *et al.*, 1998; Dhar, 2004; Doctor *et al.*, 2004).

DAÑO GENOTÓXICO

El ser humano se encuentra expuesto constantemente a cantidades variables de agentes químicos externos, que manejados experimentales han probado tener propiedades carcinogénicas y/o mutagénicas. La exposición puede ocurrir exógenamente cuando estos compuestos están presentes en la comida, el aire o el agua y endógenamente debido a los productos del metabolismo o estados patológicos como la inflamación. Se ha estimado que la exposición a carcinógenos ambientales, puede contribuir significativamente como causante de los cánceres humanos, cuando estos factores están relacionados al estilo de vida tales como la dieta, el consumo de tabaco, la ingesta de alcohol, etc. (Fenech y Ferguson, 2001; Wogan *et al.*, 2004).

Se han desarrollado diversos sistemas biológicos de prueba que permiten evaluar la genotoxicidad provocada por carcinógenos y/o mutágenos ambientales, así como diferentes indicadores que incluyen: bacterias, hongos, animales y plantas (Albertini *et al.*, 2000).

El estudio del daño al ADN a nivel cromosómico, es una parte esencial en la toxicología genética; ya que en ella se pueden reconocer los cambios en dichas estructuras, que pueden ser consecuencia de los productos reactivos generados a través del metabolismo, cuando interactúan con el ADN. Esto provoca lesiones premutagénicas o aductos, que en muchos casos se fijan y producen mutaciones cromosómicas, las cuales pueden ser puntuales como es el caso de las sustituciones de bases (transiciones y transversiones), o bien las mutaciones por corrimiento de marco de lectura que son a su vez un evento importante en la carcinogénesis (Hemmink *et al.*, 1994; Fenech, 2000; Fenech y Ferguson, 2001).

Las enzimas P450 juegan un papel muy importante en la activación metabólica de gran variedad de carcinógenos ambientales. Las enzimas de los citocromos P450 junto con otro grupo reductor NADPH citocromo P450 reductasa,

catalizan el metabolismo oxidante de gran variedad de drogas y otros xenobióticos. Asimismo, son las principales responsables de la activación metabólica de carcinógenos ambientales y tóxicos. A pesar de que éstas tienen su mayor expresión en el hígado, algunas se expresan predominantemente en tejidos extrahepáticos. La toxicidad de un compuesto está muy ligada con su destino metabólico en los tejidos blanco; además, se considera que la activación metabólica *in situ* de agentes carcinógenos y tóxicos mediada por las enzimas P450 extrahepáticas, es un aspecto determinante para la especificidad tejido-carcinógeno. Un ejemplo de enzimas extrahepáticas es la CYP 2S1 que se expresa predominantemente en traquea, pulmón, estómago, intestino delgado, bazo y piel (Wang *et al.*, 2005).

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

Los compuestos ya metabolizados pueden causar diversas mutaciones, por ejemplo cambios en la secuencia del ADN que promueven la carcinogénesis. Esto puede ser causado por daño al ADN o a la incorporación de nucleótidos no complementarios durante los procesos de síntesis, por ello es importante estudiar la estructura de los cromosomas (Wogan *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de las especies diploides tienen normalmente dos dotaciones haploides exactas de cromosomas, se conocen algunos casos con variaciones de este patrón. Las modificaciones incluyen variación en el número de cromosomas, así como reordenaciones del material genético dentro o entre cromosomas. Tales cambios se denominan, en conjunto, mutaciones cromosómicas o aberraciones cromosómicas, para distinguir tales alteraciones genéticas de las mutaciones génicas (Klug y Cummings, 1999).

Una anormalidad cromosómica puede ser: constitucional cuando todos los tejidos tienen la misma anomalía; adquirida cuando sólo está involucrado un órgano, siendo normales los otros tejidos; homogénea cuando todas las células portan la misma alteración y en mosaico cuando sólo algunas células la presentan, mientras que las otras células son normales o tienen otra anormalidad (Huert, 2000).

La variación en el número de cromosomas va desde la adición de una o más dotaciones haploides de cromosomas. Cuando un organismo gana o pierde uno o más cromosomas, pero no una dotación completa, se origina la aneuploidía. La pérdida de un solo cromosoma da lugar a una monosomía. La ganancia de un cromosoma en un genoma diploide resulta en una trisomía. Estas anomalías contrastan con la situación de euploidía, en donde están presentes dotaciones completas de cromosomas. Si hay tres o más dotaciones, se aplica el término más general de poliploidía. El segundo tipo de aberraciones cromosómicas incluye

cambios estructurales que eliminan, añaden o reordenan partes sustanciales de uno o más cromosomas. En esta categoría se encuentran las deleciones y las duplicaciones de genes o de parte de un cromosoma y las reordenaciones del material genético mediante las que segmentos de cromosomas se invierten, se intercambian con un segmento de cromosoma no homólogo, o simplemente se transfieren a otro, dando lugar a translocaciones (Klug y Cummings, 1999).

En muchos casos, estos cambios estructurales se deben a una o más rupturas distribuidas a lo largo del cromosoma, seguidas por la pérdida o reordenación de material genético. Los cromosomas pueden romperse espontáneamente, pero la tasa de ruptura aumenta en células expuestas a agentes químicos o a radiaciones (Klug y Cummings, 1999). Por tanto, los cambios visibles en la estructura y en la morfología de los cromosomas, se han considerado como una parte muy importante para indicar el daño genético tanto en estudios clínicos como de cáncer (Savage, 2000).

A pesar de que el conocimiento de la estructura cromosómica es incompleto, las evidencias sugieren que las anormalidades cromosómicas son consecuencia directa y manifestación de daño al ADN; por ejemplo, el rompimiento cromosómico puede resultar de un doble rompimiento no reparado en el ADN y el rearreglo cromosómico puede darse por una mala reparación de rompimientos en una hebra de ADN. También se reconoce que la pérdida de cromosomas y su inadecuada segregación (no disyunción), son un evento importante en el desarrollo de cáncer. Lo anterior, es probablemente causado por defectos en el huso mitótico, en el centrómero o como consecuencia de una baja condensación de la estructura cromosómica antes de la metafase (Burgaz *et al.*, 1995; Fenech, 2000).

SISTEMAS DE PRUEBA PARA EVALUAR EL DAÑO GENOTÓXICO.

Los marcadores biológicos se han convertido en herramientas útiles para determinar puntos intermedios en la formación de neoplasias, en estudios epidemiológicos sobre los efectos en la salud, asociados tanto a exposición ambiental como ocupacional (Titenko-Holland *et al.*, 1994).

Muchos de los productos químicos industriales son importantes carcinógenos, tales como el benceno, el arsénico y los formaldehídos, ya que producen daño en los cromosomas (Titenko-Holland *et al.*, 1994).

Los cambios en la estructura de los cromosomas pueden ser detectados mediante la evaluación de aberraciones cromosómicas, determinando el número de cromosomas anormales, rotos o faltantes en una metafase; la formación de micronúcleos (cromosomas o fragmentos que no migran a los polos durante la división celular y permanecen en el citoplasma) y el intercambio de cromátidas hermanas, que cuenta el número de intercambios en las metafases. El ensayo de MN en el caso de células de epitelio, no requiere de estímulo celular. Los MN han sido estudiados en células animales por más de 20 años. Asimismo, también fueron adoptados por primera vez en células exfoliadas de personas por Stich y colaboradores en 1982 quienes aplicaron esta técnica para realizar sus investigaciones en células de boca, nariz, bronquios y tracto urinario (Stich *et al.*, 1982; Titenko-Holland *et al.*, 1994).

Los biomarcadores citogenéticos tales como las células de epitelio, pueden reflejar la exposición a agentes genotóxicos ocurrida meses antes de que se colecten las muestras celulares, las mediciones individuales de los metabolitos urinarios o de las concentraciones ambientales pueden no ser representativas para el periodo de exposición (Norppa, 2004).

MICRONÚCLEOS

Los MN son uno de los mejores biomarcadores establecidos para detectar daño cromosómico, ya que permiten detectar pérdida cromosómica que se da durante la anafase. Se usan en pruebas *in vitro* de compuestos químicos y radiaciones para determinar genotoxicidad. Asimismo, se utilizan *in vivo* para detectar la exposición a agentes genotóxicos, así como para evaluar deficiencias de micronutrientes como por ejemplo: vitaminas y minerales. También se utilizan para identificar enfermedades de inestabilidad cromosómica (Fenech, 2000, 2002; Bukvic, 2001; Fenech *et al.*, 2003b; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Los MN se originan de fragmentos acéntricos y/o cromosomas completos que no se ubican adecuadamente en anafase por carecer de centrómero, tener un centrómero deficiente o bien por defectos en los mecanismos de ensamblaje por lo cual no se distribuyen correctamente hacia los polos de la célula. Durante la telofase, se les forma una envoltura nuclear alrededor de los cromosomas y/o fragmentos, los cuales entonces asumen gradualmente la morfología de los núcleos en interfase, pero con la excepción de que éstos son más pequeños que el núcleo original en la célula (Fig. 1) (De Serres, 1983; Rosin, 1992; Tolbert *et al.*, 1992; Fenech *et al.*, 1999, 2003a, 2003b; Fenech, 2000, 2002; Bukvic, 2001; Majer *et al.*, 2001; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Como consecuencia, los MN sólo se expresan en células que han completado la primera división celular. Por lo tanto, la formación de MN es inducida por sustancias que causan rompimiento de cromosomas (clastógenos), así como por agentes que afectan el huso mitótico (aneugenos). Además, los MN son el resultado de lesiones/aductos a nivel del ADN, de rupturas cromosómicas o a nivel de las proteínas involucradas directa o indirectamente en la segregación de los cromosomas (por ejemplo, la tubulina) (Kirsh-Volders *et al.*, 2003). Por lo anterior, es posible observar incremento en la formación de MN por diferentes agentes tanto físicos como químicos y obtener un índice real de rompimientos y

pérdida cromosómica (De Serres, 1983; Rosin, 1992; Fenech, 2000; Bukvic, 2001; Majer *et al.*, 2001).

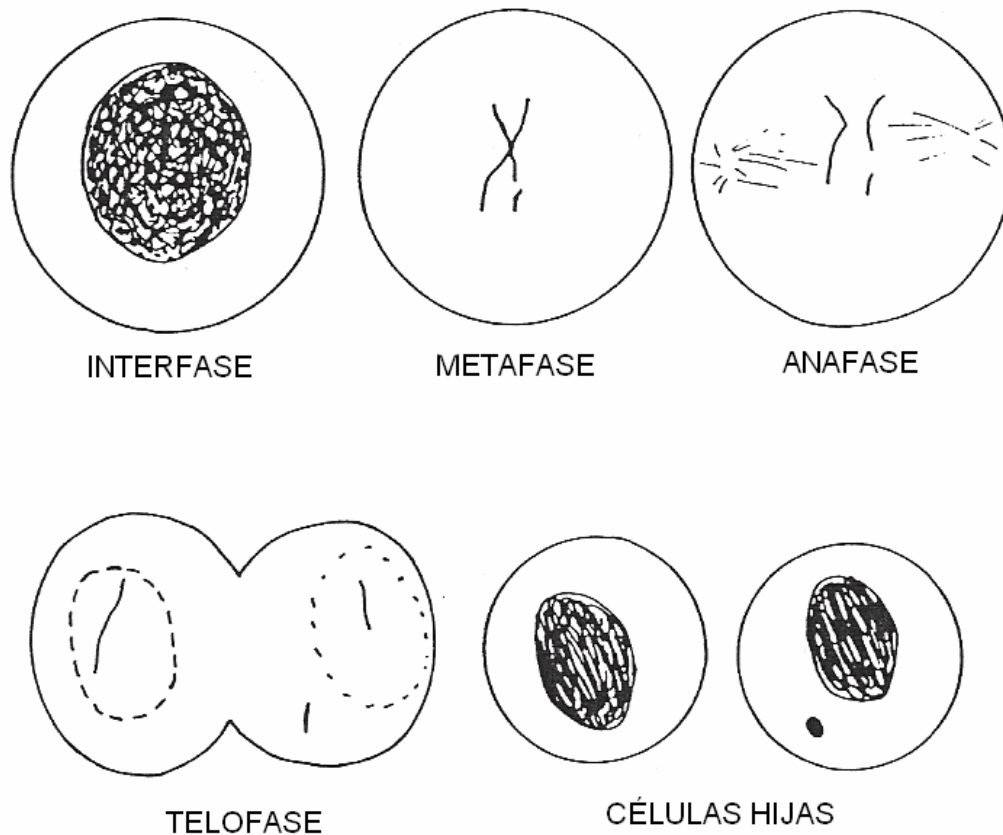


Figura 1. Formación de micronúcleos (Tomado de De Serres, 1983).

FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS

Obe en 1994 propuso cuatro posibles mecanismos en la formación de MN durante la mitosis:

a) Fragmentos acéntricos. Son fragmentos cromosómicos que carecen de centrómeros y de cinetocoros por lo que no pueden unirse a las fibras del huso mitótico impidiendo que se integren al núcleo hijo, generando entonces un MN.

b) Cromosomas multicéntricos. Son cromosomas que están en contacto con fibras del huso mitótico de ambos polos impidiendo el movimiento de las cromátidas, por lo que el material génico no es incluido en el núcleo hijo.

c) Daño a los cinetocoros. Para que las cromátidas puedan ser guiadas hacia los polos se requiere de un cinetocoro intacto para que las fibras del huso mitótico se unan a él. Si éste está dañado, este proceso no se lleva a cabo, dando como resultado que una cromátida no se integre al núcleo hijo.

d) Daño al aparato mitótico. Se ha observado que el daño al aparato mitótico con sustancias como la colchicina y vincristina forma MN con cromosomas completos (Obe, 1994).

Se ha propuesto que las células binucleadas se deben a un bloqueo de la citocinesis en células de la capa basal, donde el daño citogenético de este tipo puede ser significativo. Dicha prueba, ha sido validada para más de 100 compuestos químicos genotóxicos y/ o carcinogénicos, usando diversos sistemas biológicos como: cultivos de fibroblastos, hepatocitos, linfocitos, mielo y eritroblastos humanos o animales. Otros tejidos en los que se utiliza la prueba de MN, es en células exfoliadas de epitelio de las cavidades oral y nasal, bronquios, esófago, cervix, vejiga y tracto urinario. Stich *et al.* 1985, desarrollaron esta prueba con el propósito de detectar el daño genotóxico en órganos humanos, que son blanco de carcinógenos específicos y en los que se desarrollan carcinomas. Esta técnica tiene la ventaja de ser poco invasiva y permite la realización de muestreos repetidos (Reali *et al.*, 1987).

Debido a que las células epiteliales no necesitan ser estimuladas, las aberraciones cromosómicas inestables pueden ser estudiadas mediante la detección de MN en células en interfase, tanto en secciones tisulares como en células exfoliadas. La determinación de MN en células exfoliadas de varios tejidos humanos, provee evidencia de exposición a compuestos carcinogénicos y

clastógenicos. Esta prueba es usada para identificar individuos particulares o grupos de población de alto riesgo para desarrollar cáncer. Los MN en células exfoliadas reflejan los eventos genotóxicos que ocurrieron en la capa basal en división de las últimas tres semanas o más (Tolbert *et al.* 1992) (Fig. 2). Las células de la capa superficial del epitelio reflejan el daño genotóxico en tejidos epiteliales, que es en donde aparecen cerca del 92 % de los cánceres (Burgaz *et al.* 1995; Gonsebatt *et al.* 2000; Rosin, 1992; Martelli *et al.* 2000).

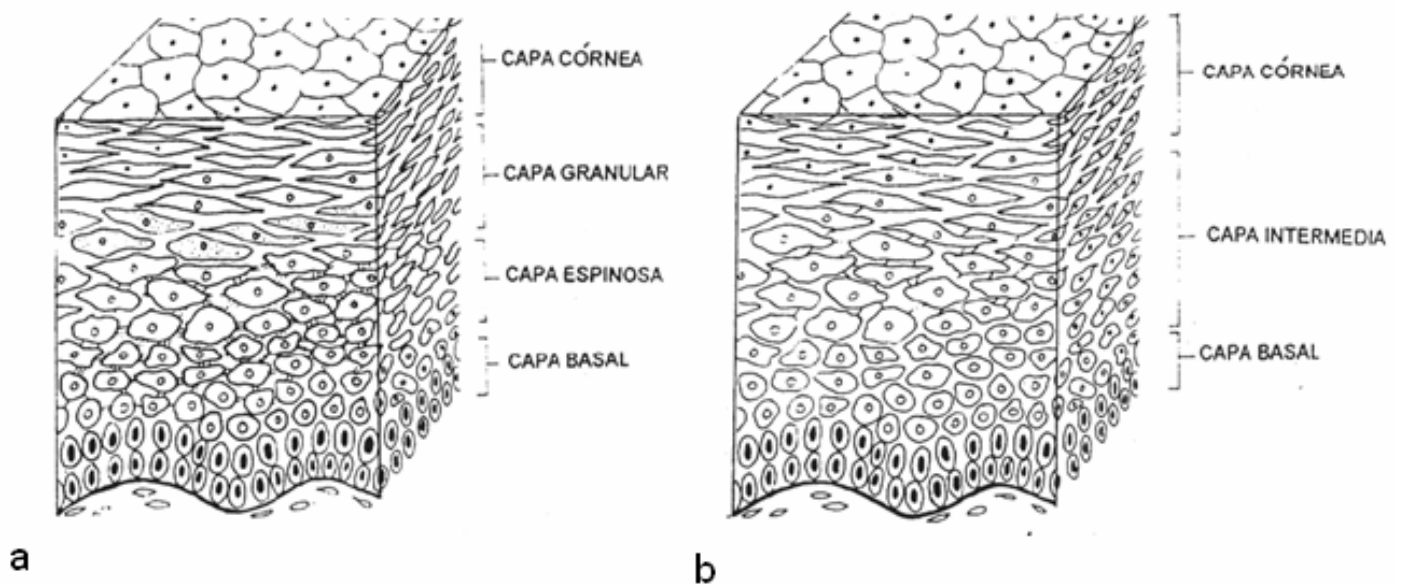


Figura 2. Cortes histológicos de epitelio (Tomado de Estrada *et al.*, 1982). (a) El epitelio queratinizado, en la piel; se caracteriza por presentar los cuatro estratos celulares. (b) El epitelio no queratinizado presenta una capa celular intermedia como modificación de las capas granulosa y espinosa del epitelio queratinizado, por lo que es más grueso en la mucosa bucal.

Los MN que se formaron por daño cromosómico en las células basales del epitelio (Rosin, 1992) (Fig. 3), provienen de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros, excluidos del núcleo original en las células hijas cuando estas células se dividen. Estos fragmentos forman su propia membrana y aparecen como cuerpos específicos de Feulgen en el citoplasma. Estas células son las que posteriormente maduran y son exfoliadas (Lehucher- Michel *et al.*, 1996).

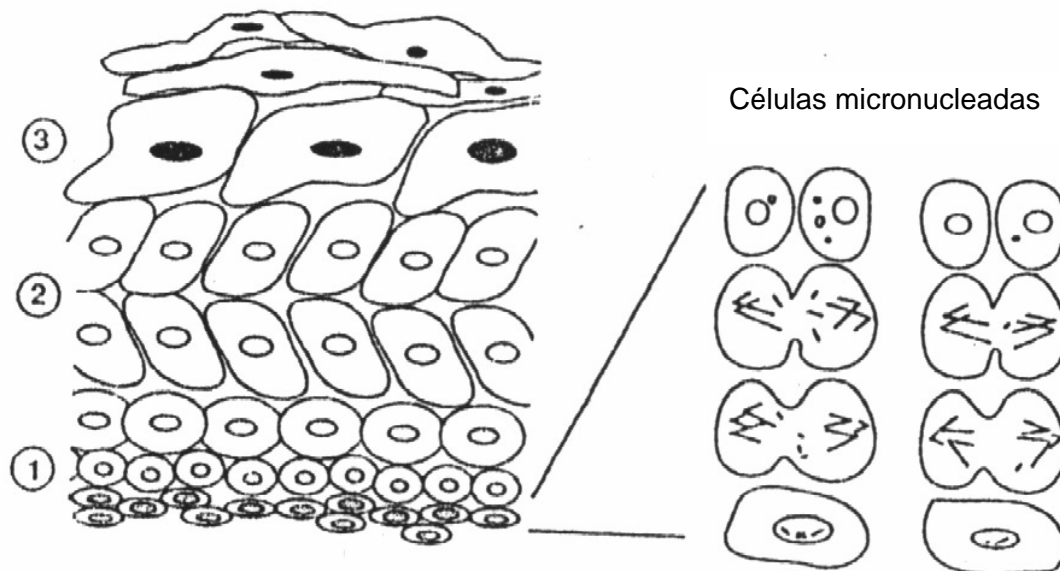


Figura 3. Formación de MN en un epitelio escamoso estratificado. Las capas celulares son (1) células en división en la capa basal, (2) la parte de maduración, células intermedias sin división y (3) células superficiales (Tomado de Rosin, 1992).

CARACTERÍSTICAS QUE DEBEN CUMPLIR LOS MICRONÚCLEOS

Los MN deben contar con las siguientes características: no ser mayores a $1/3$ del núcleo original ni menores de $1/16$, estar completamente separados del núcleo original y teñirse con el mismo colorante que éste y con igual intensidad, además de poseer su propia membrana, estar en el mismo plano que el núcleo original y tener textura similar, su forma debe ser de redonda a ovalada (Tolbert *et*

al., 1992; Burgaz *et al.*, 1995; Murray y Edwards, 1999; Fenech 2000; Fenech *et al.*, 2003b).

Los MN en células epiteliales representan eventos genotóxicos que afectaron las células de la capa basal de una a tres semanas después de haber sido expuestas a cigarrillos, sus derivados o al arsénico (Tolbert *et al.*, 1992; Jen *et al.*, 2002). En pacientes con radioterapia, la frecuencia de MN se incrementó durante el periodo de radiación y sólo regresó a sus niveles basales varios meses después del tratamiento. Las células sobrevivientes de la capa basal son las que migran a la epidermis, de tal manera que las células epiteliales exfoliadas son un buen indicador de daño al ADN, inducido en las células de diferentes capas. Sin embargo, el proceso involucrado en la proliferación de la capa basal es dinámico y además hay variación entre individuos (Jen *et al.*, 2002).

Las células uroteliales exfoliadas son colectadas por procedimientos no invasivos y son utilizadas como sitios blanco para identificar efectos genotóxicos causados por agentes químicos. Son importantes en estudios de cinética para cualquier biomarcador, especialmente para aquellos en que los procesos de maduración y diferenciación tisular, influyen en el tiempo entre la inducción del daño y la toma de las células con daño para su análisis (Reali *et al.*, 1987; Lehucher- Michel *et al.*, 1996).

La cinética de formación de los MN en tejidos epiteliales puede variar mucho entre una a persona y otra, así como la exfoliación de dichas células. Los diferentes tipos de epitelio se clasifican según su número de capas en el tejido y la forma de las células en la superficie. Por ejemplo el epitelio escamoso estratificado es característico de tejidos tales como cérvix o la cavidad oral. Estos tejidos están compuestos por células de las capas basales, intermedia y superficial. La primera contiene las células madre ("stem cells"), que son capaces de auto renovarse. Estas células inclusive se dividen para producir células hijas, las cuales experimentan maduración a otros tipos celulares y migran a la superficie para

reemplazar a las células perdidas. El tiempo requerido para que la célula se divida, madure y migre a la capa superficial va a variar dependiendo del tejido en estudio y en mayor grado del propio individuo. El daño causado por agentes físicos, químicos e infecciosos puede también alterar el promedio de proliferación de los tejidos (Rosin, 1992). Por ejemplo, el promedio de vida en la nasofaringe es de 15 días, mientras que en la vejiga urinaria puede tardar hasta 60 días (Gonsebatt *et al.*, 2000).

La exfoliación diaria de las células epiteliales del sistema urotelial varía mucho entre personas, aunque la cantidad de células uroteliales en la orina del mismo individuo a diferentes tiempos en el día permanece prácticamente constante. Se ha observado que la cantidad de células uroteliales en la orina es mayor después del ejercicio (Lehucher- Michel *et al.*, 1996).

Es evidente que el patrón de formación de MN en un individuo depende mucho del tipo de carcinógeno al que se expone. Se va a producir un patrón diferente en un tejido que sólo reciba una sola exposición por un corto tiempo (Fig. 4, línea A), a aquel con una exposición crónica, es decir, uniforme (Fig. 4, línea B). Otra alternativa puede ser que la exposición al carcinógeno sea repetida pero errática, con intervalos de varios días ocurriendo entre exposiciones. Las frecuencias de MN podrían variar significativamente entre muestras (Fig. 4, Línea C). Tales patrones pueden ser también producidos si ocurre una gran diferencia entre la dosis del carcinógeno en reiteradas exposiciones (Rosin, 1992).

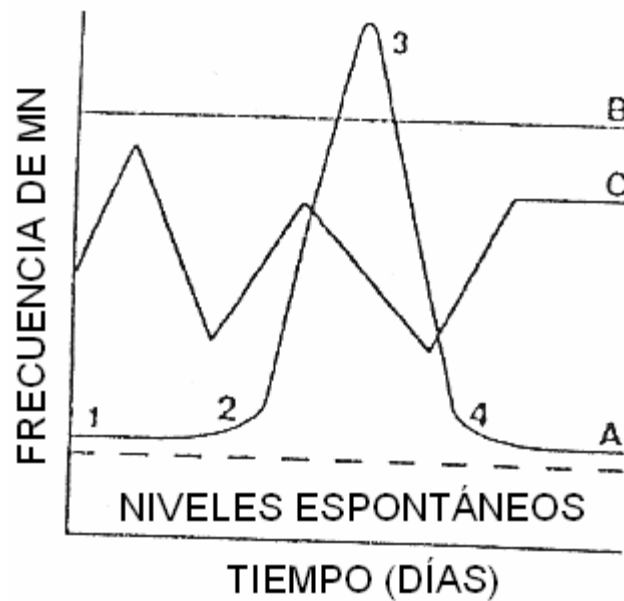


Figura 4. Producción de MN en tejidos epiteliales en respuesta a diferentes patrones de exposición a carcinógenos: A, exposición limitada y corta; B, exposición uniforme y constante; C, exposición constante, tanto con variaciones en las dosis como en los tiempos de exposición (Tomado de Rosin, 1992).

En la figura 4 se nota que los puntos de la curva A son: 1, exposición; 1 a 2 tiempo requerido para que las células de la capa basal con daño se dividan, para formar MN y para que estas células migren a la superficie; 3, la mayoría de las células alcanzan la superficie; y 4, las frecuencias de MN caen a los niveles espontáneos porque todas las células dañadas han sido exfoliadas y ya no se está produciendo rompimiento cromosómico en las células de la capa basal (Rosin, 1992).

MN Y OTRAS ANORMALIDADES NUCLEARES (AN)

Además de los MN, diversos cambios nucleares degenerativos han sido sugeridos como marcadores de genotoxicidad. Éstos incluyen *picnosis*, *condensación de cromatina* y *cariorrexis* que están relacionados con citotoxicidad (necrosis y queratinización), mientras que la *cariólisis* está asociada con toxicidad celular. En poblaciones saludables, la frecuencia de MN en células epiteliales se encuentra en un intervalo de 0 a 4 por cada 1 000 células (Jen *et al.*, 2002).

Durante la interfase se experimentan mecanismos que pueden ser factores de confusión en el análisis de MN, ya que las células exfoliadas son células moribundas que están en procesos degenerativos como: *cariorrexis*, *cariolisis*, *picnosis* y rompimiento de huevo (“*broken-egg*”) (Fig.5), que se asocian con apoptosis (muerte celular programada), que es una forma de destrucción nuclear, en la cual el núcleo se desintegra por fragmentación, lo mismo que sucede con la *cariorrexis*, pero en ésta, además, ocurre la destrucción de la membrana nuclear. Los fragmentos que conforman la *cariorrexis* pueden confundirse con MN durante el análisis citológico. La *picnosis* y el *rompimiento de huevo* son otros de los procesos nucleares que pueden dar lugar a estructuras que es posible confundir con MN, aunque los primeros se pueden diferenciar porque presentan la cromatina más condensada, mientras que los segundos son fragmentos de material nuclear, que aún están unidos al núcleo principal por un pequeño puente (Tolbert *et al.*, 1992).

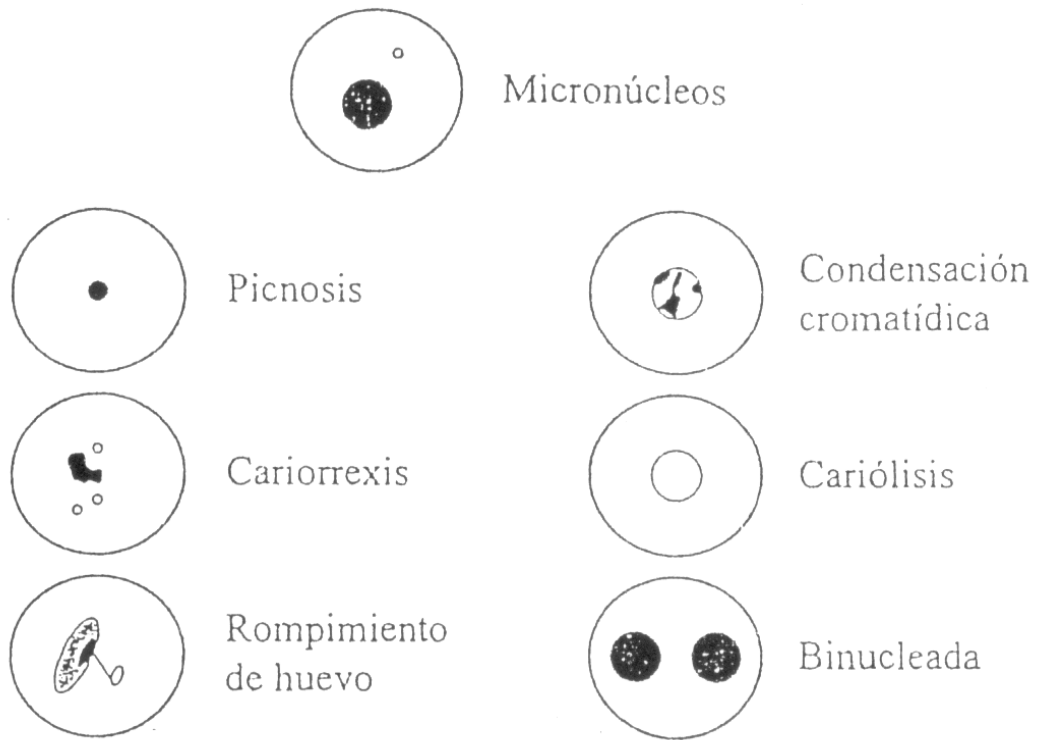


Figura 5. Micronúcleos y otras anomalías (Tomado de Tolbert *et al.*, 1992).

ANTECEDENTES

Estudios de micronúcleos en epitelio urinario y bucal

El ensayo de MN en células exfoliadas ha sido ampliamente utilizado para detectar efectos genotóxicos de mutágenos ambientales, agentes infecciosos y enfermedades hereditarias (Reali *et al.*, 1987; Titenko-Holland *et al.*, 1994).

Stich *et al.* (1982) realizaron un estudio en células provenientes de la cavidad oral, en el que utilizaron la prueba de MN en células exfoliadas del epitelio bucal de fumadores de tabaco y describieron una frecuencia elevada de células con micronúcleos (CMN) en los individuos examinados, al compararlos con sus respectivos testigos.

Micronúcleos de fumadores

Reali *et al.* (1987) evaluaron el daño genético y el posible aumento en la concentración de mutágenos en la orina de personas que fumaban, por medio de la prueba de MN y así determinar el daño que estos mutágenos causan al ADN y también aplicaron el ensayo de Ames que es una prueba basada en el aumento de la frecuencia de revertantes de la bacteria *Salmonella typhimurium* en respuesta a mutágenos, la cual se empleó para determinar la mutagenicidad en la orina de las personas en estudio. La cantidad de MN mostró aumento en células de epitelio urinario de fumadores, pero no se encontró relación entre el daño genotóxico y el número de cigarrillos consumidos o la edad de los individuos. Asimismo, al analizar la orina de los fumadores mediante la prueba de Ames se determinó un incremento de los mutágenos contenidos en los cigarrillos, pero no fue posible hacer una correlación entre el daño al ADN y dichos mutágenos ni con la edad de los fumadores.

Lehucher-Michel *et al.* (1995) realizaron un estudio con 75 personas para evaluar el daño citogenético causado por fumar, los sujetos se dividieron en 3 subgrupos, uno constituido por 33 no fumadores, otro por 27 fumadores y el último por 13 ex-fumadores, que tenían por lo menos 2 años sin consumir cigarrillos. Los resultados mostraron que únicamente en los fumadores se observó, incremento significativo en la frecuencia de MN.

Burgaz *et al.* (1995) llevaron a cabo un estudio para evaluar el daño citogenético mediante la prueba de MN en epitelio urinario, así como la excreción de tioéter en la orina de fumadores. Para ello, analizaron un grupo de 43 personas, 23 fumadores y 20 no fumadores, todos ellos hombres saludables. A los participantes se les aplicó un cuestionario, con el fin de saber su edad, estado civil, uso reciente de medicamentos, hábitos de fumar, consumo de café y de alcohol. En este estudio sólo se tomó en cuenta la presencia de MN y no la de otras AN. Los resultados obtenidos mostraron que la frecuencia de MN fue significativamente más alta en los fumadores que en sus testigos ($p < 0.001$). No se encontró diferencia significativa entre los que fumaban de 11-20 cigarrillos diarios y los de más de 20; así como tampoco se registró correlación entre la frecuencia de MN y la edad, el café o el consumo de alcohol.

Lehucher-Michel *et al.* (1996) realizaron una investigación para determinar la cinética de formación de MN en células exfoliadas del epitelio urinario. Se emplearon muestras de cuatro mujeres saludables, que voluntariamente dieron su orina durante seis días consecutivos. Los autores reportaron que los niveles de células uroteliales micronucleadas variaron entre ellas ($p < 0.001$), pero permaneció constante el número de células con MN de la misma persona durante días consecutivos y a diferentes horas del día. Las frecuencias de MN de las tres ex-fumadoras fueron elevadas, especialmente para la mujer que sólo tenía un año de haber dejado de fumar (Lehucher-Michel *et al.*, 1996).

Lehucher-Michel *et al.* (1997) realizaron un estudio para determinar el efecto de fumar sobre las células epiteliales del cérvix uterino. Se seleccionaron 112 mujeres, de las cuales 45 eran fumadoras y 67 no fumadoras. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas de MN en las células del cérvix entre ambos grupos de mujeres. Asimismo, no se encontró diferencia significativa entre el número de cigarrillos y los niveles de MN. Cabe mencionar que en este estudio sólo se contabilizaron 1000 células por paciente (Lehucher-Michel *et al.*, 1997).

Cerqueira *et al.* (1998) llevaron a cabo una investigación para detectar el daño genético en células del cérvix uterino causado por fumar cigarrillos. En particular para determinar la interacción y la asociación entre fumar cigarrillos y la progresión a transformaciones malignas. En este estudio participaron 116 mujeres que asistían regularmente al ginecólogo (grupo 1), 57 que habían asistido a un centro para la prevención de cáncer (grupo 2), ya que se tenía sospecha de alguna alteración y por último, 27 mujeres que se encontraban en una prisión de São Paulo (grupo 3). La frecuencia de MN en este estudio fue significativamente más alta en las fumadoras de los diferentes grupos, cuando se les comparó con los testigos. Asimismo, se encontraron diferencias entre el primer grupo y los otros dos. Registrando una cantidad menor de MN para el grupo 1 con respecto al 2 y 3. Las otras AN no fueron tomadas en cuenta.

Jen *et al.* (2002) realizaron un estudio de MN y otras AN en células exfoliadas del tracto urinario, en residentes expuestos a suelos contaminados con radiación nuclear, así como en un sub-grupo de fumadores. Las frecuencias de MN fueron significativamente más altas que la de los testigos. Los resultados que se obtuvieron en la determinación de MN en fumadores, no fueron diferentes significativamente al compararlos tanto con sus testigos como con las personas expuestas.

Estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre la inflamación crónica y un alto riesgo de contraer cáncer, a pesar de que los mecanismos que lo llevan a cabo no han sido determinados. En el análisis realizado por Hofseth et al. (1996), se muestra que el daño al ADN es inducido en el epitelio de tejidos durante dicho proceso inflamatorio. Existe un creciente interés por explotar el papel de procesos inflamatorios en el desarrollo de cáncer, en gran parte, porque la evidencia acumulada sugiere que las células inflamadas tienen la capacidad de inducir daño al ADN en células vecinas. Este daño puede ser el resultado directo de la liberación de especies de oxígeno reactivas o por la inducción indirecta de la bio-activación de algún carcinógeno para la célula o para la formación de nitrosaminas, compuestos que también se encuentran en el humo de tabaco (Hofseth *et al.*, 1996).

Murray y Edwards (1999) estudiaron los efectos causados en el ADN por el humo del tabaco y el 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline) (MOCA) que es un agente comúnmente utilizado en la manufactura de productos de polietileno para uso resistente, este compuesto está relacionado con la estructura de la benzidina, un carcinógeno humano conocido que causa cáncer de vejiga en grupos expuestos ocupacionalmente. Asimismo, realizaron un análisis a un grupo de personas que además de encontrarse expuestos al MOCA, también lo estaban al humo del tabaco por consumo. Se ha demostrado el potencial carcinogénico del MOCA en animales de laboratorio, el cual causa hepatomas en ratones y ratas, así como tumores mamarios y pulmonares en ratas y cáncer de vejiga en perros. A pesar de que es claro que el MOCA es genotóxico, que ha demostrado formar aductos con el ADN y causar intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos de trabajadores expuestos a dicha sustancia, hay muy poca evidencia de que sea un carcinógeno humano (Murray y Edwards, 1999).

En el estudio antes mencionado se determinó que las frecuencias de MN tanto en linfocitos como en células uroteliales de los que laboran en las fábricas de dicho compuesto fueron significativamente más altas, en comparación con los

testigos. Asimismo, se encontró que las personas que fumaban a pesar de ser un grupo reducido, no reflejaron cambio en las frecuencias de micronúcleos (Murray y Edwards, 1999).

Para evaluar el daño genético en personas que trabajaban en el proceso de curtir piel González *et al.* (1991), emplearon técnicas para observar aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica y la formación de micronúcleos en células exfoliadas de orina. Los resultados obtenidos de las AC en los trabajadores expuestos no fueron significativos con los testigos. Al comparar los resultados de los fumadores con los no fumadores tampoco mostraron diferencias significativas. Los resultados de MN tampoco fueron significativos.

HIPÓTESIS

El humo del tabaco es una mezcla compleja de alrededor de 4000 sustancias, de las cuales, más de 60 están clasificadas como mutagénicas y carcinogénicas en humanos y en animales. Algunos de los compuestos antes mencionados, se forman por la misma combustión de los cigarrillos y otros deben pasar por activación metabólica para iniciar un daño o alteración al ADN. De lo anterior, se puede concluir que gran parte de los metabolitos reactivos son además genotóxicos y se acumulan en los tejidos urinarios, ya que es en este lugar donde se almacenan temporalmente para ser excretados del cuerpo.

Por lo antes mencionado, en este estudio se espera determinar el daño al ADN, causado por el humo de tabaco, a través del incremento de la frecuencia de MN en las células del epitelio urinario, así como de otras AN.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico en fumadores intensos que habitan en la Ciudad de México, mediante el análisis de micronúcleos y otras anormalidades nucleares, en células exfoliadas del epitelio urinario y su correlación con los biomarcadores de exposición nicotina y cotinina.

Objetivos particulares

1. Determinar la frecuencia de micronúcleos y de otras anormalidades nucleares en células del epitelio urinario de fumadores intensos.
2. Establecer la presencia de nicotina y cotinina en la orina de las personas en estudio, así como evaluar posibles diferencias entre ellos.
3. Relacionar la frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades nucleares encontradas con los niveles de nicotina y cotinina.
4. Estimar el cambio en las frecuencias de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en un intervalo de tiempo para un grupo de ex-fumadores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de las personas para la evaluación de las muestras de epitelio urinario.

Las muestras de orina fueron colectadas de personas fumadoras, que asistieron a la Clínica Antitabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), con la intención de dejar de fumar. Los fumadores fueron seleccionados tomando en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

- Tuvieron edades entre 20 y 60 años.
- Que fumen más de 20 cigarrillos diariamente.
- No estén bajo tratamiento médico severo.
- No tengan ninguna otra adicción.

La población que conformó el grupo testigo incluyó personas:

- Entre 20 y 60 años.
- Que no fumen o estén en contacto con fumadores.
- Que no estén bajo tratamiento médico severo.
- Que no tengan ninguna otra adicción.

Toma de muestra y prefijación

Se colectaron 250 mL de la primera orina de la mañana, de la cual se tomaron nueve alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -70 °C para la determinación de nicotina y cotinina mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. La muestra restante fue fijada inmediatamente, con ácido acético glacial al 100 % (10 mL/ 250 mL) y almacenada a 4 °C hasta su procesamiento.

El fijador ácido acético glacial al 100 % es utilizado para evitar la putrefacción y la autólisis, ya que son la causa de las rápidas modificaciones que

experimentan las células al morir. En la autólisis, se debe evitar la acción de las enzimas celulares ya que cuando cesa la actividad de la célula, en vez de ayudar al proceso de síntesis protoplásmica actúan de manera inversa. Asimismo, se debe evitar el crecimiento de bacterias que destruyen los tejidos dando lugar al fenómeno de putrefacción (Estrada *et al.*, 1982).

Lavado y fijación de la muestra

Se colocaron 8 mL de la muestra prefijada en tubos de 15 mL, hasta terminar con todo el volumen de orina. Los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm 10 minutos, posteriormente el sobrenadante fue desechado. El botón celular fue resuspendido en 5 mL de solución isotónica (cloruro de sodio al 0.9%), agitándolo nuevamente y centrifugándolo a 1200 rpm 10 min, éste paso se realizó tres veces. Al término del tercer lavado y de extraer el sobrenadante, al botón celular se le agregaron 5 mL de solución hipotónica (cloruro de potasio 75 mM). La mezcla se agitó suavemente y se dejó reposar por 20 min, posteriormente se centrifugó a 1200 rpm 10 min y se desechó el sobrenadante. El botón celular resultante se fijó con 8 mL de fijador (metanol-ácido acético [3:1] frío), el cual fue adicionado por las paredes del tubo, después se agitó ligeramente y se centrifugó a 1200 rpm 10 min para posteriormente desechar el sobrenadante, este paso se realizó por triplicado. Por último, el botón se dejó con 1 mL de fijador.

Preparación de laminillas

El botón celular se resuspendió en el mililitro de fijador donde se conservó, para ser goteado sobre diez portaobjetos limpios previamente colocados en alcohol y refrigerados. El goteo se realizó a una altura de 5 a 15 cm y las laminillas se dejaron secar al aire. Cada portaobjeto se etiquetó y se marcó con una clave.

Hidrólisis de muestras de orina

Una vez secas las laminillas, fueron colocadas en una caja de Koplín con agua destilada a temperatura ambiente, durante 10 min. Transcurrido este tiempo, las laminillas se transfirieron a otra caja de Koplín conteniendo ácido clorhídrico (HCl) 1N a temperatura ambiente por 10 min. Después, se transfirieron a otra caja con HCl 1N en baño María, a 60 °C durante 10 min. Por último, se enjuagaron en agua destilada para detener la hidrólisis y se dejaron secar a temperatura ambiente antes de sumergirlas en el colorante.

Tinción de las laminillas

Las laminillas totalmente secas se colocaron en una caja Koplín con el reactivo de Schiff durante 60 ó 90 min. Transcurrido ese tiempo, se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire en gradillas.

Preparación del reactivo de Schiff

Se disolvieron 0.5 g de fucsina básica (Hycel de México) gradualmente en 100 mL de agua destilada a temperatura de ebullición, dejándose descender la temperatura hasta 58 °C para pasarse por papel filtro Whatman #1. Una vez que la solución bajó a 26 °C se añadieron 10 mL de HCl 1 N y 1 g de metabisulfito de sodio, almacenándose en oscuridad. Posteriormente, al transcurrir 24 horas, se le agregó 1 g de carbón activado que fue dejado 24 horas con el fin de que adsorbiera las impurezas y el reactivo quedara incoloro. Al cumplirse este tiempo se filtró y guardó en refrigeración.

La fucsina básica es un colorante magenta que se puede decolorar tratándolo con HCl y metabisulfito de sodio. Esta sustancia ya decolorada, produce un nuevo compuesto, también de color magenta al reaccionar con aldehídos. La hidrólisis moderada de ácidos nucleicos con HCl libera grupos aldehídos al extraer

las purinas del ADN a nivel de la unión desoxirribosa-purina. Si éstos se sumergen en la forma incolora de la fucsina básica, los aldehídos reaccionan con el colorante y recobrarán su color magenta, esto se conoce como reacción nuclear de Feulgen (González, 1996) (Fig. 8).

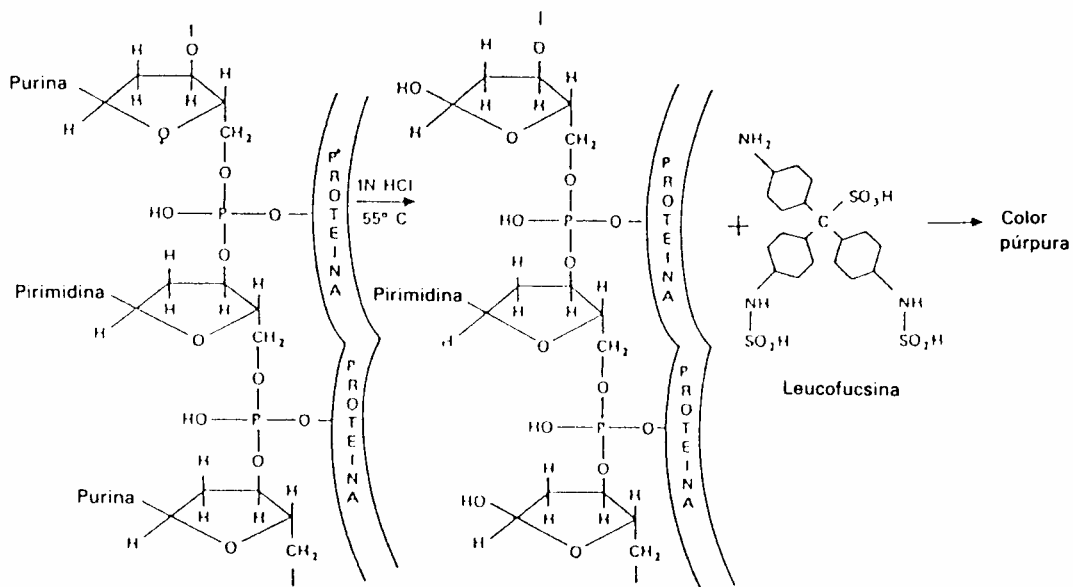


Figura 8. Esquema de la reacción nuclear de Feulgen (De Lessler, tomado de De Robertis y De Robertis, 1981).

Etiquetado de laminillas

Una vez teñidas las laminillas fueron re-etiquetadas con una nueva clave asignada y desconocida para el observador, con el fin de evitar algún tipo de predisposición al realizar la búsqueda de MN y/o AN.

Examen microscópico

La lectura de las laminillas se realizó con los aumentos de 16x y 40x observándose 3000 células por persona, para poder determinar el daño al ADN mediante la cuantificación de MN y otras AN.

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NICOTINA Y COTININA EN MUESTRAS DE ORINA

Extracción de nicotina y cotinina.

A cada tubo de Toxi-Lab A® (que contenían una mezcla de disolventes y sales amortiguadoras) se le transfirieron 2 mL de las alícuotas de cada muestra de orina y se mezclaron por 5 min en un vortex. Posteriormente, se centrifugaron a 3100 xg (3955 rpm) por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se transfirió la fase orgánica a cada uno de los matraces volumétricos clase A de 2 mL que contenían 50 µL de metanol acidificado (0.1 % HCl en metanol), con el fin de prevenir la evaporación excesiva de los compuestos. Éstos se sometieron a una corriente de nitrógeno para reducir el volumen a la mitad. Simultáneamente, se agregó 1 mL de una mezcla de disolventes (diclorometano, hexano y butanol [1:1:1]) a cada tubo Toxi-Lab A®, con el fin de aumentar el porcentaje de recobro de los compuestos. Se centrifugó nuevamente a 3100 xg durante 10 min y se decantó la fase orgánica al matraz volumétrico de 2 mL usado anteriormente. Este paso se repitió una vez más.

Por último, se adicionó a los matraces volumétricos una solución de 2 estándares internos y se redujo el volumen final a 2 mL por medio de la corriente de nitrógeno, con el fin de obtener una concentración final de nicotina deuterada (nic-d3) de 980 ng/ mL y cotinina deuterada (cot-d3) de 990 ng/ mL. De esta mezcla se tomó un volumen de 2 µL para inyectarlo directamente en el cromatógrafo de gases, acoplado a un espectrómetro de masas, para su análisis.

Análisis cromatográfico

Se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM) modelo Agilent Technologies 6890/5973 N, con auto mostrador cuádruplo 7683 y una estación de trabajo HP Kayak XM 600.

La columna capilar fue HP-5ms de 12 m x 0.2 mm de diámetro interno x 0.33 µm de grosor de película. La operación del CG-EM fue en el modo de impacto electrónico a 70 eV, con el monitoreo del ión selectivo. Siendo los iones de interés 84 y 162 m/z para nicotina-d₃. Los primeros iones de cada compuesto fueron utilizados para la cuantificación por el método de estándar interno. El gas acarreado empleado fue helio de ultra pureza, a un flujo de 1 mL/min. Las temperaturas del puerto de inyección y de la línea de transferencia fueron 235 y 280 °C, respectivamente, con un tiempo de corrida de 8.33 min. Las muestras fueron inyectadas con un vaporizador de temperatura programable, en el modo sin división, durante 30 s y con un pulso de 150 Kpa (Modificado de Hutchinson *et al.*, 1998).

El porcentaje de recobro obtenido con esta técnica fue de 90 % para la nicotina y 88 % para la cotinina y los límites inferiores de cuantificación fueron de 10 ng/mL para nicotina y 100 ng/mL para cotinina.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de MN y otras AN de fumadores y no fumadores no se ajustaron a una distribución normal, por lo que se aplicó una prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney para determinar la existencia de diferencias significativas entre ellos. Dado que los valores de los testigos fueron de cero se realizó, con la misma prueba, el análisis de dos muestras independientes. Asimismo, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para corroborar si existía relación entre la frecuencia de MN y AN, con los niveles de nicotina y cotinina. Los datos se analizaron con los programas estadísticos MINITAB versión 13.2 y el Statistica.

RESULTADOS

Variaciones intergrupales en la frecuencia de MN y otras AN.

Fumadores

El grupo de fumadores estuvo constituido por 30 personas, 15 hombres y 15 mujeres. Su promedio de edad fue de 36.53 años con una desviación estándar de 9.78 años. El grupo de testigos con el que fue comparado también consistió de 30 personas, 15 hombres y 15 mujeres con un promedio de edad de 36.7 años y una desviación estándar de 9.47 años.

El efecto genotóxico encontrado en los sujetos evaluados, expresado mediante el número de MN presentes, así como de las otras AN se encuentra resumido en el cuadro 1.

Cuadro 1. Diferencias encontradas entre los fumadores respecto a sus testigos, para cada uno de los parámetros evaluados^{a,b}.

Hombres y Mujeres	fumadores	testigos
n	30	30
Micronúcleos	0.75 ± 0.14*	0.00 ± 0.00
Binucleadas	3.70 ± 0.68	1.14 ± 0.21
Picnosis	3.17 ± 6.60**	0.10 ± 0.30
Cariorrexis	0.96 ± 0.17	0.00 ± 0.00
Condensaciones	0.43 ± 0.08	0.00 ± 0.00
Rompimientos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Cariolisis	0.40 ± 0.07	0.18 ± 0.03

^aEn todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar.

^bPor cada 3000 células contabilizadas.

Se encontraron diferencias significativas usando la prueba U Mann-Whitney.

*p<0.005

**p< 0.0142

Como se observa en el cuadro 1, el grupo de fumadores presentó un promedio significativamente más alto de MN y picnosis, cuando se le comparó con el grupo testigo.

Además de realizar el análisis al grupo completo, se realizó una evaluación por subgrupos de sexo y edad, con el fin de observar si las respuestas de esos subgrupos eran las mismas o diferían. Los resultados se muestran en los cuadros 2, 3 y 4.

Como se indica en los cuadros 2 y 3, tanto mujeres como hombres presentaron frecuencias muy parecidas, encontrándose sólo un aumento en el promedio de cariorrexis y cariolisis en los hombres. Al ser analizados por separados, sólo el subgrupo de mujeres mostró diferencias significativas para los MN y las picnosis observadas cuando se les comparó con sus testigos.

Cuadro 2. Diferencias encontradas entre las mujeres fumadoras con respecto a sus testigos, para cada uno de los parámetros evaluados en el subgrupo de sexo^{a,b}.

Mujeres	fumadores	testigos
n	15	15
Micronúcleos	0.62 ± 0.15*	0.00 ± 0.00
Binucleadas	3.83 ± 0.99	0.77 ± 0.20
Picnosis	5.59 ± 1.40**	0.00 ± 0.00
Cariorrexis	0.50 ± 0.12	0.00 ± 0.00
Condensaciones	0.34 ± 0.08	0.00 ± 0.00
Rompimientos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Cariolisis	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.06

^aEn todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar.

^bPor cada 3000 células contabilizadas.

Se encontraron diferencias significativas usando la prueba U Mann-Whitney.

*p<0.016

**p< 0.0075

Cuadro 3. Diferencias encontradas entre los hombres fumadores con respecto a sus testigos, para cada uno de los parámetros evaluados en el subgrupo de sexo^{a,b}.

Hombres	fumadores	testigos
n	15	15
Micronúcleos	0.90 ± 0.23*	0.00 ± 0.00
Binucleadas	3.70 ± 0.95	1.44 ± 0.40
Picnosis	7.57 ± 1.95	0.41 ± 0.11
Cariorrexis	1.29 ± 0.33	0.00 ± 0.00
Condensaciones	0.52 ± 0.13	0.00 ± 0.00
Rompimientos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Cariolisis	0.52 ± 0.13	0.00 ± 0.00

^aEn todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar.

^bPor cada 3000 células contabilizadas.

Se encontró diferencia significativa usando la prueba U Mann-Whitney.

*p<0.016

Dado que el intervalo de edad de los integrantes del grupo de fumadores fue amplio (23-57 años) se decidió separarlos en dos subgrupos de edad (cuadro 4). Los resultados indicaron que las personas menores de 23 a 37 años de edad (fumadores y testigos) difirieron significativamente entre sí en los MN y las picnosis de los parámetros evaluados. Por otro lado, el subgrupo de 43 a 57 años no mostró diferencias significativas cuando se les comparó con sus respectivos testigos.

Cuadro 4. Diferencias encontradas entre los subgrupos de fumadores de (23-38 años) y (43-57 años) respecto a sus testigos, para cada uno de los parámetros evaluados

Hombres y Mujeres	Fumadores (23-38)	Testigos (24-37)	Fumadores (43-57)	Testigos (43-57)
n	17	17	13	13
Micronúcleos	0.70 ± 0.16*	0.00 ± 0.00	0.85 ± 0.24	0.00 ± 0.00
Binucleadas	1.00 ± 2.3	1.15 ± 0.30	5.00 ± 1.40	1.14 ± 0.32
Picnosis	6.62 ± 1.60**	0.00 ± 0.00	6.62 ± 1.84	0.44 ± 0.12
Cariorrexis	0.50 ± 0.11	0.00 ± 0.00	1.40 ± 0.40	0.00 ± 0.00
Condensaciones	0.23 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.17	0.00 ± 0.00
Rompimientos	NO	NO	NO	NO
Cariolisis	0.50 ± 0.11	0.23 ± 0.05	0.30 ± 0.08	0.00 ± 0.00

^aEn todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar.

^bPor cada 3000 células contabilizadas.

Se encontraron diferencias significativas usando la prueba U Mann-Whitney.

*p<0.017

**p< 0.0175

NO = No observados.

El cuadro 5, muestra un análisis de los fumadores por subgrupos de edades para observar si había diferencia entre los fumadores menores de 38 años y los mayores de 43 años.

Al analizar los resultados se observó que no hubo diferencia significativa para ninguno de los parámetros evaluados.

Cuadro 5. Diferencias encontradas entre los subgrupos de fumadores de (24-38) y (43-57), para cada uno de los parámetros evaluados^{a,b}.

fumadores subdivisión		
n	13	13
Edad	24-38	43-57
Micronúcleos	0.54 ± 0.80	0.31 ± 0.85
Binucleadas	5.15 ± 11.55	3.70 ± 5.00
Picnosis	4.54 ± 7.50	3.23 ± 6.62
Cariorrexisis	0.15 ± 0.55	0.40 ± 1.40
Condensaciones	0.08 ± 0.03	0.23 ± 0.60
Rompimientos	NO	NO
Cariolisis	0.15 ± 0.55	0.08 ± 0.30

^aEn todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar.

^bPor cada 3000 células contabilizadas.

NO = No observados.

El análisis se realizó con la prueba U Mann-Whitney.

CUANTIFICACIÓN DE NICOTINA Y COTININA

La cuantificación de nicotina y cotinina se efectuó en 30 fumadores y 5 testigos. En el cuadro 6 se presentan los resultados obtenidos para las correlaciones de nicotina y cotinina con los parámetros evaluados, observándose correlación positiva y significativa para la cariorrexis. No así con la nicotina, en cuyo caso no se obtuvieron correlaciones significativas.

Cuadro 6. Coeficiente de correlación de Spearman y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores, respecto a otros parámetros evaluados.

	nicotina	nivel de significancia	cotinina	nivel de significancia
n	30	30	30	30
Micronúcleos	0.112	0.553	0.182	0.335
Binucleadas	-0.239	0.203	0.007	0.967
Picnosis	-0.032	0.866	0.196	0.297
Cariorrexis	0.096	0.611	0.431*	0.017
Condensaciones	-0.003	0.985	0.308	0.097
Rompimientos	NO	NO	NO	NO
Cariorrexis	-0.025	0.894	0.036	0.848

*Correlación positiva y significativa
NO = No observados.

En el cuadro 7, se muestran los resultados del coeficiente de correlación de Spearman y los niveles de significancia entre la cantidad de nicotina y cotinina y los diversos parámetros analizados en el sub-grupo de mujeres fumadoras.

En este sub-grupo, no se obtuvieron correlaciones significativas entre la nicotina y cotinina y ninguno de los parámetros evaluados.

Cuadro 7. Coeficiente de correlación de Spearman y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en el subgrupo de fumadoras, respecto a otros parámetros evaluados.

mujeres	nicotina	nivel de significancia	cotinina	nivel de significancia
n	15	15	15	15
Micronúcleos	0.359	0.188	-0.043	0.878
Binucleadas	-0.167	0.548	-0.175	0.531
Picnosis	0.209	0.453	0.302	0.273
Cariorexix	0.433	0.107	0.433	0.107
Condensaciones	0.226	0.416	0.363	0.183
Rompimientos	NO	NO	NO	NO
Cariolisis	-0.123	0.66	0.061	0.826

NO = No observados.

Al analizar el sub-grupo de hombres fumadores (cuadro 8) se encontró que éstos sólo mostraron correlación significativa entre la cotinina y los MN de los diversos parámetros evaluados.

Cuadro 8. Coeficiente de correlación de Spearman y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, observados en el subgrupo de fumadores, respecto a otros parámetros evaluados.

hombres	nicotina	nivel de significancia	cotinina	nivel de significancia
n	15	15	15	15
Micronúcleos	0.012	0.966	0.549*	0.034
Binucleadas	-0.219	0.433	0.317	0.248
Picnosis	-0.215	0.44	0.201	0.471
Cariorrexis	-0.309	0.262	0.433	0.107
Condensaciones	-0.309	0.262	0.433	0.107
Rompimientos	NO	NO	NO	NO
Cariolisis	0	1	0.123	0.66

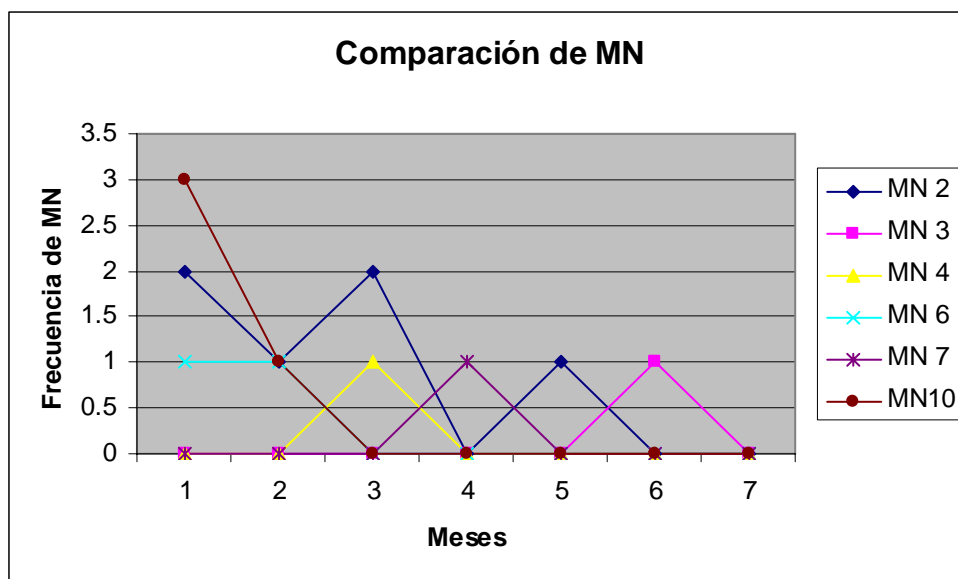
*Correlación positiva y significativa.

NO = No observados.

DIFERENCIAS DE LAS FRECUENCIAS DE MN Y OTRAS AN ENCONTRADAS ENTRE LOS FUMADORES Y EX-FUMADORES EN UN INTERVALO DE TIEMPO DE SIETE MESES.

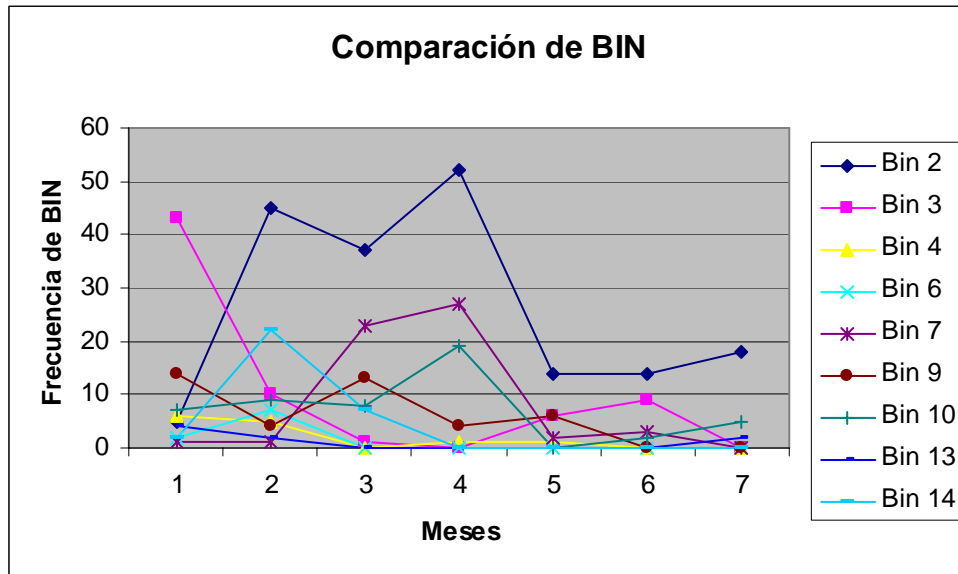
Para evaluar el daño citogénético se realizó un seguimiento de siete meses a un grupo de personas fumadoras. La primera muestra de orina se colectó en personas que aún fumaban, las siguientes 6 tomas se obtuvieron cuando dichas personas dejaron el hábito de fumar. Para el análisis se evaluaron las frecuencias de MN y otras anomalías nucleares en células del epitelio urinario. Los resultados se presentan en las gráficas 1 a 3.

En la gráfica 1 se observa que la frecuencia de MN va disminuyendo a lo largo de los meses, a pesar de que se notó un incremento en el mes 3, la tendencia es hacia abajo.



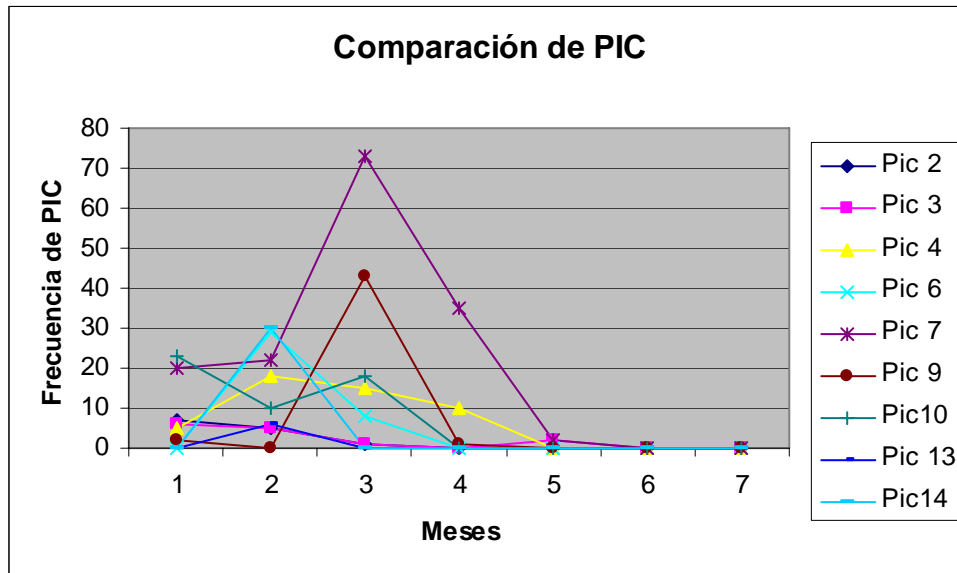
Gráfica 1. Comportamiento de las frecuencias de Micronúcleos (MN) en los ex-fumadores a lo largo de un intervalo de tiempo (1 a 7 meses).

En la gráfica 2 se observa un comportamiento similar al de los MN. Se indica una disminución en la frecuencia de células binucleadas a través del tiempo con un incremento en su frecuencia entre los meses 2 y 4.



Gráfica 2. Comportamiento de las frecuencias de binucleadas (BIN) en los fumadores a través de un intervalo de tiempo (1 a 7 meses).

La gráfica 3 muestra que la frecuencia de picnosis al igual que para los MN y las células binucleadas disminuye a través de los meses, teniendo un incremento en los meses 2 y 4.



Gráfica 3. Comportamiento de las frecuencias de picnosis (PIC) encontradas en los ex-fumadores a través de un intervalo de tiempo (1 a 7 meses).

FOTOGRAFÍAS DE MN Y OTRAS AN OBSERVADAS

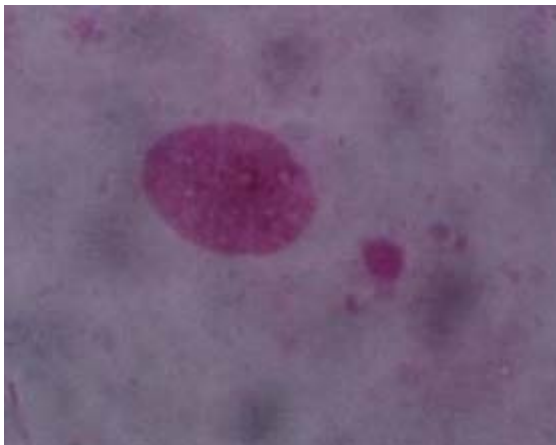


Imagen 1. Célula con micronúcleo 1000 (aumentos).



Imagen 2. Célula binucleada 400 (aumentos).

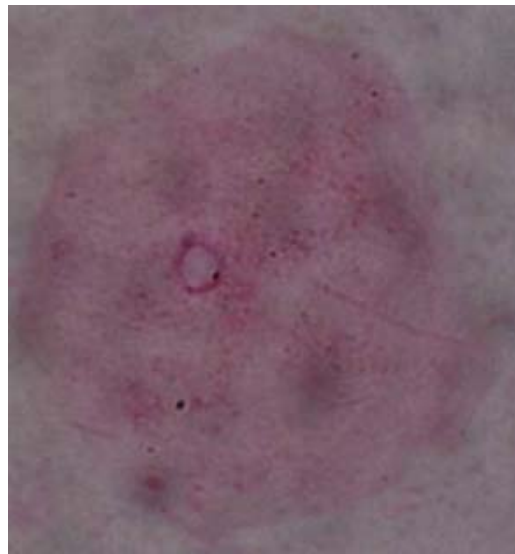


Imagen 3. Célula con cariólisis 1000 (aumentos).



Imagen 4. Célula con Picnosis
400 (aumentos).



Imagen 5. Célula normal
400 (aumentos).



Imagen 6. Célula con condensación de
cromatina 400 (aumentos).

DISCUSIÓN

Entre los diferentes riesgos a la salud, el consumo de tabaco en sus diferentes formas, se ha ligado a una incidencia elevada de distintos tipos de cáncer, así como de otras enfermedades. También se han realizado estudios que han detectado el daño genotóxico ocasionado por el consumo de tabaco (Majer *et al.*, 2001) mediante diversas pruebas moleculares (Shen *et al.*, 2003; Affatato *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005; Raveendran *et al.*, 2005) como corrimiento en geles para caracterización de proteínas, aductos y detección de variantes de enzimas y citogenéticas (Stich *et al.*, 1985; Rosin, 1992; Lehucher-Michel *et al.*, 1997; Gonsebatt *et al.*, 2000; Mohamadi *et al.*, 2003) como las de aberraciones cromosómicas, micronúcleos, otras anomalías nucleares, intercambio de cromátidas hermanas y electroforesis unicelular. Dado que los tejidos epiteliales cubren la superficie externa del cuerpo humano y la parte interna de los órganos cavernosos tales como la nariz, boca, estómago, vejiga, túbulos renales, vagina, etc., es en estas células en las que es posible determinar el daño causado por los productos químicos del cigarro (Stich *et al.*, 1985; Rosin, 1992; Lehucher-Michel *et al.*, 1997; Gonsebatt *et al.*, 2000; Mohamadi *et al.*, 2003).

Los estudios sobre el daño genotóxico causado por el tabaco se pueden agrupar en tres categorías, dependiendo de la forma de consumo (mascado, inhalado y fumado). Los efectos del mascado e inhalado sólo han sido estudiados en células provenientes de la cavidad bucal y en linfocitos, mientras que los efectos ocasionados por fumar, además de ser evaluados en linfocitos, también han sido determinados en células de la vejiga urinaria como en el caso de este estudio (Reali *et al.*, 1987; Burgaz *et al.*, 1995; Lehucher-Michel *et al.*, 1995; Lehucher-Michel *et al.*, 1997; Cerqueira *et al.*, 1998; Jen *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación en diversas partes del mundo sobre los efectos del tabaco son contradictorios. La determinación de MN y AC de epitelio urinario, así como de linfocitos han

señalado que mientras que algunos autores describen un incremento significativo en las frecuencias de estas anormalidades (Reali *et al.*, 1987; Burgaz *et al.*, 1995; Lehucher-Michel *et al.*, 1995), otros no las encuentran (Lehucher-Michel *et al.*, 1997; Cerqueira *et al.*, 1998; Jen *et al.*, 2002; Neri *et al.*, 2003).

En el presente estudio se observó incremento significativo de MN y de células en picnosis en los fumadores con respecto a sus testigos. Los resultados de MN obtenidos concuerdan con lo reportado por Lehucher-Michel *et al.* (1995) quienes encontraron incremento significativo en la frecuencia de MN de los 27 fumadores que constituyó el estudio, analizándose 1000 células por persona en la primera muestra de la mañana (Lehucher-Michel *et al.*, 1995). Asimismo, la cantidad de MN observados en este estudio concuerda con los datos publicados por Reali *et al.* (1987) quienes encontraron incremento significativo de MN en 3000 células exfoliadas de la vejiga urinaria aunque las células analizadas provenían de la orina colectada durante un periodo de 24 horas (Reali *et al.*, 1987).

De igual manera que Reali *et al.* (1987), en otro estudio similar realizado por Burgaz *et al.* (1995) en 23 fumadores, también reportaron incremento significativo en la frecuencia de MN al analizar solamente 500 células de muestras que fueron colectadas de la mañana a la tarde. Mientras que por el contrario Jen y colaboradores en el 2002 no obtuvieron incremento significativo (Jen *et al.*, 2002).

Asimismo, también en linfocitos se ha reportado un aumento significativo de MN en fumadores intensos (más de 30 cigarrillos diarios) y que no se encontraban expuestos ocupacionalmente (Bonassi *et al.*, 2003).

De la misma forma, el efecto causado por el hábito de fumar ha sido determinado mediante la evaluación del daño al ADN, la alteración en la cinética de proliferación celular y el incremento en la frecuencia de ICH con respecto a poblaciones testigo (Reali *et al.*, 1987; Burgaz *et al.*, 1995; Lehucher-Michel *et al.*, 1995; Lehucher-Michel *et al.*, 1997; Cerqueira *et al.*, 1998; Jen *et al.*, 2002; Neri *et*

al., 2003). Asimismo, se han realizado estudios con diversos ensayos, como la prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*) para evaluar la mutagenicidad del humo del tabaco, determinando que los productos químicos inducen mutaciones en las bacterias expuestas, siendo las aminas aromáticas y la aminas heterocíclicas las principales causantes de dichas mutaciones (Bukvic *et al.*, 2001; Neri *et al.*, 2003).

Los trabajos realizados de MN reportados con variaciones en el método señalan resultados diferentes, los cuales se deben a la diversidad de criterios en los parámetros a evaluar como por ejemplo, la cantidad de células analizadas, el nivel de intensidad de los fumadores, el tiempo durante el cual han fumado, el número de fumadores considerado en cada estudio, la dieta, etc., lo que hace difícil realizar comparaciones entre las diversas poblaciones del mundo evaluadas. Sin embargo, en todos los estudios se ha observado una relación entre el daño genético y el consumo de cigarrillos, lo cual es el resultado de una modificación al ADN o una alteración celular (Tolbert *et al.*, 1992; Wogan *et al.*, 2004), aunque no en todos ha sido posible determinar diferencias significativas (González *et al.*, 1991; Jen *et al.*, 2002).

Se sabe que la exposición *in vivo* a mutágenos exógenos y carcinógenos produce incremento en las mutaciones de genes y de aberraciones cromosómicas en la población humana (Fenech y Ferguson, 2001; Fenech, 2002). Recientemente, se ha aceptado que una dieta no balanceada puede tener efectos similares. La dieta puede ser un factor clave en determinar la estabilidad genómica y se ha observado su importancia en todas las rutas relevantes, como: la exposición de carcinógenos en la dieta, la activación y desintoxicación de carcinógenos, la apoptosis, la reparación y la síntesis del ADN. Muchos de los micronutrientes como las vitaminas y los minerales actúan como sustrato y/o co-factores en reacciones de mantenimiento del ADN. Niveles sub-óptimos de los micronutrientes requeridos para el mantenimiento del ADN pueden dar como resultado una actividad deficiente en las enzimas requeridas para la estabilidad

genómica, produciéndose efectos similares a la exposición de carcinógenos (Fenech y Ferguson, 2001; Fenech, 2002, 2003).

Por lo anterior, el consumo de vitaminas y/o de minerales o de frutas y/o de vegetales que los contengan, puede contribuir a disminuir el daño al ADN, lo que podría reducir la incidencia de MN en los fumadores (Fenech y Ferguson, 2001; Fenech, 2002, 2003). Sin embargo, también se ha encontrado que en la dieta hay alimentos (carne asada, tortilla quemada, embutidos, etc.) que incluyen nitrosaminas, aminos heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y productos carcinogénicos naturales (Guengerich y Shimada, 1998). Por lo que, los diversos alimentos que conforman la alimentación pueden contener tanto compuestos antimutagénicos como mutagénicos.

Otro factor importante de asociación entre el efecto del humo del tabaco y el daño al ADN es la susceptibilidad génica que presenta cada fumador, así como a los genes involucrados en la 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 del citocromo P450 de la familia 1A1 (CYP1A1) y la glutatión S transferasa de la familia M1 (GSTM1) (Rojas *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2005).

Entre las principales anomalías nucleares que se registraron en el presente estudio, se encontraron células del epitelio urinario en picnosis, que mostraron aumento significativo en su frecuencia con respecto al grupo testigo. Lo anterior, concuerda, en parte, con lo descrito por Tolbert *et al.* (1992) y Gonsebatt *et al.* (2000) quienes también obtuvieron un incremento de las células en picnosis de fumadores, pero de la mucosa bucal. Las células exfoliadas del epitelio bucal se encuentran en interacción directa con los compuestos químicos del humo del tabaco (Tolbert *et al.*, 1992; Gonsebatt *et al.*, 2000), a diferencia de las células del epitelio urinario que principalmente están en contacto con los productos

metabolizados de muchos de esos compuestos. Tolbert *et al.* (1992) reportaron que las células de diferentes tipos celulares presentan respuestas al daño del ADN por exposición a diversos contaminantes ambientales, como el humo del tabaco (Reali *et al.*, 1987; Tolbert *et al.*, 1992; Burgaz *et al.*, 1995; Gonsebatt *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2004).

Asimismo, Tolbert *et al.* (1992) señalaron que tanto la picnosis como la condensación de cromatina se presentan normalmente en la diferenciación y en la maduración de las células epiteliales. Sin embargo, estas AN se evidencian en niveles elevados como respuesta del daño celular causado por los productos químicos del humo del tabaco (Tolbert *et al.*, 1992). Lo anterior concuerda con la frecuencia elevada de picnosis que se reportó en este estudio. Además de las células en picnosis, la condensación de cromatina, la cariorrexis y la cariólisis se encuentran cuando la célula está pasando por un proceso de necrosis, que ocurre después de una lesión provocada por agentes que causan perturbaciones del ambiente celular.

La picnosis, la condensación de cromatina y la cariorrexis (pero no la cariólisis) pueden presentarse en estadios tempranos de otro tipo de muerte celular, la apoptosis, que es la principal forma de muerte en tejidos vivos, la cual está bajo control fisiológico y efectúa órdenes de muerte celular tales como las que ocurren en la embriogénesis y en la muerte normal de la célula. Debido a que la célula es estimulada tanto por la radiación ionizante como por agentes químicos que se unen al ADN; para llevar a cabo la apoptosis, ésta puede ser utilizada por el organismo para su supervivencia, ya que elimina las células con daño genético evitando la posible formación de tumores malignos. Un exceso en los niveles de AN relacionadas con la apoptosis puede ser un indicador de daño genotóxico en células del epitelio urinario (Tolbert *et al.*, 1992; Jen *et al.*, 2002; DeMarini 2004; Wogan *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005).

Las diversas anomalías nucleares determinadas en este estudio como picnosis y MN, podrían asociarse a cambios degenerativos relacionados con citotoxicidad (Tolbert *et al.*, 1992; Jen *et al.*, 2002). El incremento en la frecuencia de células binucleadas registrado puede ser ocasionado por una interferencia en los mecanismos de citocinesis (Tolbert *et al.*, 1992). Asimismo, dicho incremento puede deberse a que los compuestos químicos del humo del tabaco afectan al citoesqueleto o a las proteínas que forman las uniones con los microtúbulos.

De las muestras de orina obtenidas de los fumadores participantes en este estudio, también se evaluaron los niveles de nicotina y cotinina registrándose mayores concentraciones de cotinina. Esto coincide con lo reportado por diversos autores (Hecht, 2002; Yildiz, 2004; Singh *et al.*, 2005; Wang, *et al.*, 2005) quienes mencionan que en el humo del tabaco, la mayoría de los compuestos requieren de activación metabólica (Hoffmann *et al.*, 2001; Hecht, 2002; Singh *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005), al igual que la nicotina que pasa por los mecanismos del metabolismo para producir diversos metabolitos, siendo el principal, la cotinina (Byrd *et al.*, 1992; Yildiz, 2004).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, determinaron una correlación positiva y significativa entre la cotinina y la formación de micronúcleos en el subgrupo de fumadores. Lo cual concuerda con lo reportado por Tricker (2003) y Yildiz (2004) quienes señalaron que la cotinina es el metabolito que permanece durante más tiempo en el organismo, después de ser metabolizada por las enzimas P450 (Tricker, 2003; Yildiz, 2004). Cabe mencionar que también se obtuvo correlación significativa para cariorrexis y cotinina, pero no se registraron diferencias significativas entre los fumadores y sus testigos, por lo cual no se pueden asociar con la citotoxicidad causada por humo del tabaco como en el caso de los MN.

Las correlaciones obtenidas entre la presencia de MN con los niveles de cotinina registrados en el subgrupo de los fumadores analizados sugieren que, probablemente, los compuestos del humo del tabaco ya metabolizados son los responsables de las alteraciones nucleares observadas, lo que concuerda con lo reportado por Reali *et al.* (1987), Lehucher-Michel *et al.* (1995), Burgaz *et al.* (1995) y Cerqueira *et al.* (1998) quienes encontraron que los compuestos ya metabolizados interactúan con las células del epitelio urinario. Asimismo, coincide con lo reportado por Byrd *et al.* (1992) y DeMarini, 2004 quienes determinaron que los compuestos de los cigarrillos incluyendo la nicotina y sus metabolitos son los que inducen apoptosis, así como necrosis en los diferentes tipos celulares (Tolbert *et al.*, 1992; Jacobson y McCarthy, 2002; Carnevali *et al.*, 2003; De Flora *et al.*, 2003; Crowley-Weber *et al.*, 2003; Wogan *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005; Raveendran *et al.*, 2005). Sin embargo, Wickenden *et al.* (2003) reportaron que los compuestos del cigarro disminuyeron las células en apoptosis y aumentaron las células en necrosis, que es otra vía de muerte celular.

En este estudio también se realizó un seguimiento de siete meses a un subgrupo de la población evaluada, los cuales estaban en un programa del INER para dejar de fumar. Estas personas eran fumadoras intensas cuando donaron su primera muestra de orina y posteriormente se convirtieron en ex-fumadoras. Los resultados reflejaron que tanto las frecuencias de MN como las de las otras AN disminuyeron conforme fue pasando el tiempo. Lo que concuerda con lo reportado por Rosin (1992) quien encontró que la cinética de formación de los MN en la mucosa bucal de pacientes irradiados presentó incremento en la frecuencia de MN durante el tratamiento y ésta declinó posteriormente, hasta valores observados en tejidos sin exposición, después de un mes de que ésta finalizó (Rosin, 1992). El autor atribuyó dicho decremento a que todas las células dañadas fueron exfoliadas, debido a un proceso de reemplazo por división celular en la capa basal del tejido, esto es que las células dañadas poco a poco fueron madurando hasta ser exfoliadas y al no tener más exposición a los compuestos del humo del tabaco las células hijas que se están formando en la capa basal ya no muestran una

frecuencia elevada de MN y otras AN, lo cual también está de acuerdo con lo descrito por Weinberg (1989) y Franceschi (1990) y que coincide con lo reportado en este estudio.

Lo anterior, no concuerda con lo reportado por Lehucher-Michel *et al.* (1996), ya que ellos encontraron que las frecuencias de MN en tres mujeres ex-fumadoras, la primera de 1 año, la segunda de 7 años y la tercera de 8 años de no fumar, permanecieron elevadas aun después de haber dejado de fumar, especialmente en la persona que tenía un año de haber dejado dicho hábito (Lehucher-Michel *et al.*, 1996).

El seguimiento realizado en este estudio también mostró, que entre el tercero y el cuarto mes se presentó un ligero incremento en el número de MN y otras AN, lo que podría deberse a que el periodo de vida de las células de la vejiga es de alrededor de 60 días y es en ese periodo de tiempo, cuando el mayor número de células dañadas se están exfoliando, lo que concuerda con lo postulado por Rosin (1992) y Gonsebatt *et al.* (2000) que mencionan la presencia de picos en las frecuencias cuando se tiene un consumo constante de cigarrillos, pero varía dependiendo de la cantidad fumada (Rosin, 1992; Gonsebatt *et al.*, 2000) (ver figura 4).

CONCLUSIONES

- Los resultados de las frecuencias de MN manifiestan que los fumadores intensos, muestran diferencia significativa en el número de dichas estructuras nucleares al compararlos con la población testigo. Además, la correlación entre el número de MN observados y las concentraciones de cotinina determinadas en los fumadores fue significativa.
- El incremento en las frecuencias de células en picnosis sugiere un posible daño genotóxico en las células de epitelio urinario de los fumadores, que podrían deberse a mutaciones en el ADN ó a interferencia de proteínas.
- Los niveles de nicotina y cotinina cuantificados en la orina fueron mayores en los fumadores que en los testigos, observándose una correlación significativa entre los niveles de cotinina y los MN y otra AN: cariorrexis, aunque en esta última no presentó incremento significativo al realizar el análisis citogenético.
- La evaluación de los ex-fumadores durante siete meses indicó que hubo disminución del daño genotóxico conforme transcurrió el tiempo, lo cual sugiere que las células dañadas fueron exfoliadas y al no continuar en contacto con los compuestos químicos del tabaco no se producen más alteraciones.

- Se sugiere realizar un seguimiento de ex-fumadores por un periodo de tiempo mayor (2 a 3 años), además de contar con una muestra más grande.
- Debido al escaso número de estudios realizados en México y aun en el mundo, sobre MN y otras AN en células de epitelio urinario de fumadores, ha sido difícil comparar e interpretar los resultados obtenidos en este estudio con respecto a otros similares.
- Los resultados de este estudio podrían contribuir al trabajo efectuado por el llamado proyecto HUMN (Human MicroNucleus Project), el cual trata de unificar el método de detección de MN para hacer comparaciones de la información generada a nivel mundial.

REFERENCIAS

Adler I.-D, y Attia S. M. 2003. Nicotine is not clastogenic at doses of 1 or 2 mg/kg body weight given orally to male mice. *Mutat. Res.* 542: 139-142.

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

Affatato A. A., Wolfe K. J., López M. S., Hallberg C., Ammenheuser M. M. y Andel-Rahman S. Z. 2004. Effect of XPD/ERCC2 Polymorphisms on chromosome aberration frequencies in smokers and on sensitivity to the mutagenic tobacco-specific nitrosamine NNK. *Environ. Mol. Mutagen.* 44: 65-73.

Arif J., Gairola G., Kelloff G., Lubet R. y Gupta R. 2000. Inhibition of cigarette smoke-related DNA adducts in rat tissues by indole-3-carbinol. *Mutat. Res.* 452: 11-18.

Belsasso G. 2001. El tabaquismo en México. CONADIC informa. *Boletín especial de tabaquismo.* 6 p.

Belsasso G. 2002. Acciones institucionales en materia de tabaquismo. CONADIC informa. 6 p.

BM/OPS 2000. La epidemia de tabaquismo: los gobiernos y los aspectos económicos del control del Tabaco. Banco Mundial y Organización Panamericana de la Salud. (Publicación Científica No. 577).

Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U., Montagud A., Tinnerberg H., Forni A., Heikkila P., Wanders S., Wilhardt P., Hansteen I., Knudsen L. y Norppa H. 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res.* 60: 1619-1625.

Bonassi S., Neri M., Lando C., Ceppi M., Lin Y., Chang W., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E. y Fenech M. 2003. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat. Res.* 543: 155-166.

Brögger A., Hagmar L., Hansteen I.-L., Heim S., Högstedt B., Knudsen L., Lambert B., Linnainmaa K., Mitelman F., Nordenson I., Reuterwall C., Salomaa S., Skerfving S. y Sorsa M. 1990. An inter-nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. *Cancer Genet. Cytogenet.* 45: 85-92.

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.

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.

Burgaz S., Işcan, A., Büyükbingöl, Z., Bozkurt, A. y Karakaya, A. 1995. Evaluation of micronucleal in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. *Mutat. Res.* 335: 163-169.

Byrd G., Chang K., Greene J., y deBethizy J. 1992. Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotinine and trans-3'-Hydroxycotinine in smokers. *Drug Metab. Dispos.* 20: 192-7.

Carnevali S., Petruzzelli S., Longoni B., Vanacore R., Barale R., Cipollini M., Scatena F., Paggiaro P., Celi A. y Giuntini C. 2003. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284: L955-L963.

Cerqueira E., Santoro C., Donozo N., Freitas B., Pereira C., Bevilacqua R. y Machado-Santelli G. 1998. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix. *Acta Cytol.* 42: 639-649.

Consejo Nacional contra las Adicciones, 2003 página web: conadic.gob.mx.

Crowley-Weber C. L., Dvorakova K., Crowley C., Bernstein H., Bernstein C., Garewal H. y Payne C M. 2003. Nicotine increases oxidative stress, activates NF- κ B and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cell to genotóxico/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chemico-Biological Interac.* 145: 53-66.

Dhar P. 2004. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotina/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35: 155-168.

De Flora S., D'Agostini F., Balansky R., Camoirano A., Bannicelli C., Bagnasco M., Cartiglia C., Tampa E., Longobardi M., Lubet R. e Izzotti A. 2003. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 523: 237-252.

DeMarini D. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.* 567: 447-474.

De Robertis E. D. P. y De Robertis E. M. F. (1981) *Biología Celular y Molecular*. El Ateneo, México, pp. 53.

Denton T., Zhang X. y Cashman J. 2004. Nicotina-related alkaloids and metabolitos as inhibitors of human cytochrome P-450 2A6. *Biochem. Pharmacol.* 67: 751-756.

De Serres F.(1983). The bone marrow micronucleus assay: Rationale for a revised protocol. En: *Chemical mutagens: Principles and methods for their detection* (A. Hollaender, Ed.). Plenum Press. Nueva York, Vol. 8, pp.111-127.

Doctor P., Gokani V., Kulkarni P., Parikh J. y Saiyed H. 2004. Determination of nicotine and cotinine in tobacco harvesters' urine by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 802: 323-328.

Estrada E, Peralta L y Rivas P. 1982. *Manual de técnicas Histológicas*. AGT editor. México, pp. 140.

Fenech M., Holland N., Chang W., Zeiger E. y Bonassi S. 1999. The HUMAN MicroNucleus Project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428: 271-283.

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.

Fenech M. y Ferguson L. 2001. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat. Res.* 475: 1-6.

Fenech M. 2002. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Food Chem. Toxicol.* 40: 1113-1117.

Fenech M. 2003. Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. *Nutrition Res. Rev.* 16: 109-122.

Fenech M., Bonassi S., Turner J., Lando C., Ceppi M., Chang W., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Bigatti M., Bolognesi C., Cao J., De Luca G., Di Giorgio M., Ferguson L., Ficic A., Garcia O., Hadjidekova V., Hrelia P., Jaworska A., Joksic G., Krishnaja A., Lee T., Martelli A., McKay M., Migliore L., Mirkova E., Müller W., Odagiri Y., Orsiere T., Scarfi M., Silva M., Sofuni T., Suralles J., Trenta G., Vorobtsova I., Vral A. y Zijno A. 2003a. Intra-and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat. Res.* 534: 45-64.

Fenech M., Chang W., Kirsch-Volders M., Holland N. y Zeiger E. 2003b. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534: 65-75.

Franceschi C. 1990. Cell proliferation, cell death and aging. *Aging* 1: 1-13.

Georgiadis P., Demopoulos N., Topinka J., Stephanou G., Stoikidou M., Bekyrou M., Katsouyianni K., Sram R., Autrup H. y Kyrtopoulos S. 2004. Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. *Toxicol. Lett.* 149: 269-280.

Guengerich F. P., y Shimada T. 1998. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat. Res.* 400: 201-213.

Gonsebatt, M., Guzmán P. y Blas J. (2000). Cytogenetic and cytotoxic damage in exfoliated cells as indicators of effects in humans. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change 2*. (F. M. Butterworth, A. Gunatilaka y M. E. Gonsebatt Eds.). Kluwer Academic/ Plenum Publishers, Nueva York. pp. 317-331.

González, M. (1996). *Técnicas en biología celular*. Primera edición. AGT editor. México, 208 p.

González M., Loria D., Vilensky M., Miotti J. y Matos E. 1991. Leather tanning workers: chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes and micronuclei in exfoliated cells in urine. *Mutat. Res.* 259: 197-201.

Hecht S. 1999a. DNA adduct formation tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat. Res.* 424: 127-142.

Hecht S. 1999b. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst* 91: 1194-1210.

Hecht S. 2002. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* 39: 119-126.

Hemmink K., Dipple A., Shuker D., Fadlubar F., Segerbäck D. y Bartsch H. 1994. Adducts, identification and biological significance. International Agency for Research on cancer. Lyons. IARC Scientific publications 125. 478 p.

Hill C., Affatato A., Wolfe K., López M., Hallberg C., Canistro D. y Andel-Rahman S. 2005. Gender differences in genetic damage induced by the tabaco-specific nitrosamine NNK and the influence of the Thr241Met polymorphism in the XRCC3 gene. *Environ. Mol. Mutagen.* 46: 1-8.

Hoffmann D., Hoffmann I., y El Bayoumy K. 2001. The less harmful cigarette: a controversial issue. *Chem. Res. Toxicol.* 24: 767-90.

Hofseth L., Dunn B. y Rosin M.1996. Micronucleus frequencies in urothelial cells of catheterized patients with chronic bladder inflammation. *Mutat. Res.* 352: 65-72.

Huret J. 2000. Mitosis-Meiosis. [En línea].

<http://www.infobiogen.fr/services/chromocancer/Introltems/PolyMecaEng.html>

[Consultado octubre 2005](#)

Husgafvel- Pursiainen K. 2004. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat. Res.* 567: 427-445.

Hutchinson J., Tazabi Y. y Taylor R. 1998. Rapad method for the simultaneous measurment of nicotine and cotinine in urine and serum by gas chromatography-mass espectometry. *J. Chromatogr.* 708: 87-93.

Jacobson M. D. y McCarthy N. 2002. Apoptosis the molecular biology of programmed cell death. Oxford University Press Inc. Nueva York, 321 p.

Jen M., Hwang J., Yang J., Nabyvanets Y., Hsieh W., Tsai M., Guo S. y Chang W. 2002. Micronuclei and nuclear anomalies in urinary exfoliated cells of subjects in radionuclide-contaminated regions. *Mutat. Res.* 520: 39-46.

Kadlubar F. F., Millar J. A. y Millar E. C., 1977. Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogénesis. *Cancer Res.* 37: 805-814.

Kadlubar F. F., Butler M. A., Kaderlik K. R., Chou H. C. y Lang N. P.1992. Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevante for human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 98: 69-74.

Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surrallés J., Vanhauwaert A. y Wakata A. 2003. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540: 153-163.

Klug W. y Cummings M. 1999. *Conceptos de Genética*. Quinta edición. Prentice Hall. España. 233-274.

Kuri, P., Alegre, J., Mata, M. y Hernández, M. 2002. Mortalidad atribuible al consumo de tabaco en México. *Salud Pública de México* 44: 30.

Lehucher-Michel M., Giorgio C., Amara Y., Laget M. y Botta A. 1995. The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: effect of smoking. *Mutagenesis* 10: 329-332.

Lehucher-Michel M., Ait Amara-Mokrane Y., Devictor B., Catilina P. y Botta A. 1996. Micronucleic kinetics of exfoliated urothelial cells. *Mutat. Res.* 354: 1-7.

Lehucher-Michel M., Favre-Eloff G., Devictor B., Duffaud F. y Botta A. 1997. Effect of smoking on micronucleated epithelial cells in smears from the uterine cervix. *Carcinogenesis* 18: 749-753.

Majer B. J., Laky B., Knasmüller S. y Kassie F. 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individual at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.* 489: 147-172.

Martelli A., Robbiano L., Cosso M., Perrone C., Tagliazucchi A., Giuliano L., Aresca G. y Brambilia 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.

Mohamadi S., Unyime N. y Bao-Zhen Z. 2003. Effect of pH on mutagenicity of urine from smokers and nonsmokers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 21-27.

Montes A., Valencia E., Terán L. y Martínez L. 1998. Cotinina urinaria como indicador de la cesación del hábito tabáquico. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11: 89-92.

Murray E. y Edwards J. 1999. Micronuclei in peripheral lymphocytes and exfoliated urotelial cells of workers exposed to 4, 4'-methylenebis-(2-chloroaniline) (MOCA). *Mutat. Res.* 446: 175-180.

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

Neri M., Fucic A., Knudsen L., Lando C., Merlo F. y Bonassi S. 2003. Micronucleic frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutat. Res.* 544: 243-254.

Norppa H. 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.* 149: 309-334.

Obe G. 1994 *Advances in mutagenesis research 5* Berlin, Heidelberg New York Singer-Verleg pp. 193.

OPS. 1992. *Tabaco o Salud: Situación en las Américas: Un informe de la Organización Panamericana de la Salud.* Organización Panamericana de la Salud. OPS (Publicación Científica No. 536).

Pavanello S., Simioli P., Carrieri M., Gregorio P. y Clonfero E. 2002. Tobacco-smoke exposure indicators and urinary mutagenicity. *Mutat. Res.* 521: 1-9.

Raveendran M., Wang J., Senthil D., Wang J., Utama B., Shen Y., Dudley D., Zhang Y. y Wang X. 2005. Endogenous nitric oxide activation protects against cigarette smoking induced apoptosis in endothelial cells. *FEBS Lett.* 579: 733-740.

Reali D., Di Marino F., Bahramandpour S., Carducci A., Barale R. y Loprieno N. 1987. Micronucleic in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. *Mutat. Res.* 192: 145-149.

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 diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 21: 35-41.

Rosin M. 1992. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 267: 265-276.

Salazar E., Sánchez L., Estrada A., Lazcano E. y Hernández M. 2002. El tabaquismo y su fracción atribuible en la enfermedad isquémica cardíaca. *Salud Pública de México* 44: 8.

Salud Pública de México. 2000. Prevención y control de la epidemia mundial del tabaquismo: una estrategia integral. *Salud Pública de México* 42: 6.

Satarug S., Ujjin P., Vanavanitkun Y., Nishijo M., Baker J. R. y Moore M. R. 2004. Effects of cigarette smoking and exposure to cadmium and lead on phenotypic variability of hepatic CYP2A6 and renal function biomarkers in men. *Toxicology*. 204: 161-173.

Savage J. 2000. Micronuclei: Pitfalls and problems. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* July 2000. [En línea]

<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/MicronucleiID20016.html>.
consultado octubre 2005.

Sesma S., Campusano J., Carreón V., Knaul F., López F. y Hernández M. 2002. El comportamiento de la demanda de tabaco en México: 1992-1998. *Salud Pública de México* 44:1.

Shen M., Hung R., Brennan P., Malaveille C., Donato F., Placidi D., Carta A., Hautefeuille A., Boffetta P. y Porru S. 2003. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in Northern Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 1234-1240.

Shi Q., Wang Li-E., L. Bondy M., Brewster A., Singletary S. E. y Wei Q. 2004. Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients. *Carcinogenesis* 25: 1695-1700.

Singh R., Kaur B. y Farmer P. B. 2005. Detection of DNA damage derived from a direct actino ethylating agent present in cigarette smoke by use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 249-256.

SSA/CONADIC 2000. Programa Nacional Contra las Adicciones. Programa Contra el Tabaquismo. Secretaria de Salud-Consejo Nacional Contra las Adicciones 110p.

Stich H. F., Curtis J. R. y Parida B. B. 1982. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer* 30: 553-559.

Stich H., Stich W. y Rosin M. 1985 The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic Life Sci.* 34: 337-342.

Tapia C., Morales Kuri R y Hoy Gutiérrez, M. 2001. Panorama epidemiológico del tabaquismo en México. *Salud Pública de México* 43: 478.

Titenko-Holland N., Moore L. y Smith M. 1994. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* 312: 39-50.

Tricker A. 2003. Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphism, and smoking behaviour. *Toxicology* 183: 151-173.

Tolbert P., Shy C. y Allen J. 1992. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 271: 69-77.

Tutka P., Mosiewicz J. y Wielosz M. 2005. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacol. Reports* 57: 143-153.

Villalba-Caloca J., Ramírez-Venegas A. y Sansores R. 2001. Costos de la atención médica. CONADIC Informa. *Boletín Especial de Tabaquismo*. 3 p.

Villatoro J., Medina M., Berenzon S., Juárez F., Rojas E. y Carreño S. 1998. Drug use pathways among high school students of México. *Addiction* 93: 1577-1588.

Wang S.L., He X.Y. y Hong J.Y. 2005. Human cytochrome P450 2S1: lack of activity in the metabolic activation of several cigarette smoke carcinogens and in the metabolism of nicotine. *Drug Metab. Dispos.* 33: 336-340.

Weinberg K. 1989. Oncogenes, anti-oncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3: 583-590.

Wickenden J., Clarke M., Rossi A., Rahman I., Faux S., Donaldson K. y MacNee W. 2003. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am. J. Respir. Cell Biol.* 29: 562-570.

Wogan G., Hecht S., Felton J., Conney A. y Loeb L. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biol.* 14; 473-486.

Wolf A., Kutz A., Plöttner S., Behm C., Bolt H., Föllmann W. y Kuhlmann J. 2005. The effect of benzo(a)pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints. *Toxicology* 207: 255-269.

World Health Organization (WHO). The smoking epidemic-A fire in the global village. 25th August, Ginebra: 1997, Press Release WHO/61.

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

Yildiz D. 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon* 43: 619-632.

Zavos P. y Zarmakoupis-Zavos P. 1999. Impact of cigarette smoking on human reproduction: its effects on male and female fecundity. *Technology* 6: 9-16.