



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**“DAÑO GENOTÓXICO EN FUMADORES ACTIVOS Y PASIVOS  
EXPUESTOS A AMBIENTES INTRAMUROS, CONTAMINADOS  
CON HUMO DE TABACO, EN LA CIUDAD DE MÉXICO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

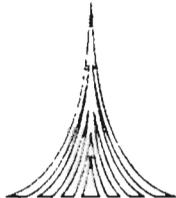
**BIOLOGO**

PRESENTA:

**CÉSAR GUERRERO GUERRA**

DIRECTORA DE TESIS: DR. MARÍA DEL CARMEN LETICIA  
CALDERON EZQUERRO

ASESOR INTERNO: DR. MARÍA AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO



MÉXICO, D.F. 2005.

0350228



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## *Dedicado a:*

*Mi Mamá, Elena Guerra García y mi Papá, Guillermo Guerrero Hernández*

Sin ustedes no estaría en este bello mundo y sin su esfuerzo, dedicación, sacrificios, protección y sobre todo amor, no sería la persona que soy ahora. Gracias por todo lo que han hecho por mí. Estoy orgulloso de ustedes y siempre le daré gracias a Dios por habérmelos dado como padres.

*Mi abuelita Sara García López*

Por haber estado con nosotros durante tantos años cuidándonos, queriéndonos y enseñándonos tantas cosas, la principal, que la familia es una de las cosas más importantes que pueda haber y una de las más grandes bendiciones de Dios. Mil gracias.

*A mis hermanos, Diana, David y Guillermo*

Gracias a ustedes por compartir conmigo tantos años de su vida. Me han enseñado muchas cosas y la principal es que ni un millar de amigos sustituiría nunca a un hermano, y mucho menos a ustedes 3. Los quiero mucho.

*A mis abuelos Luisa Hernández, Guillermo Guerrero y Salvador Guerra*

No estamos juntos ahora, pero sé que desde el cielo nos envían sus bendiciones y que están orgullosos de sus hijos y, espero, de sus nietos. Sé que algún día nos reuniremos de nuevo así que hasta luego.

## *Agradecimientos*

- ◆ A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por todas las herramientas teóricas y técnicas brindadas para mi formación personal.
- ◆ A los Sinodales: Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, a la M en C. María del Carmen García Rodríguez, al M.C. Raúl Zavala Chavero y a la Biol. Cristina Alvarado Domínguez por sus oportunas observaciones, aportaciones y sugerencias en la revisión de este trabajo.
- ◆ A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo y al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por sus enseñanzas y por la invaluable revisión de este trabajo.
- ◆ Al M. en C. Omar Amador Muñoz por su inestimable apoyo en la estandarización de la técnica para la cuantificación de nicotina y cotinina, así como su gran paciencia y dedicación en el análisis de todas las muestras.
- ◆ A la Q.F.B Amalia Pérez Mejía por su ayuda en la extracción de muestras de sangre y por haberme enseñado a hacerlo.
- ◆ A la Lic. Marlene Espinosa y 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.
- ◆ A Edgar Jardines y al personal del bar *La Cuija* por su gran disponibilidad e interés en participar en este estudio.
- ◆ A todos los voluntarios que aceptaron donarnos un poco de su sangre y sobre todo a aquellos que se atrevieron a permitir que yo la extrajera, a sabiendas de que era novato en esos menesteres.
- ◆ Al Centro de Ciencias de la Atmósfera y especialmente a los laboratorios de Citogenética Ambiental y Mutagénesis Ambiental por permitirme realizar esta tesis en sus instalaciones y por haberse convertido en mi segundo hogar durante el tiempo de realización de este trabajo.
- ◆ A la Clínica Anti-Tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por toda la ayuda otorgada.
- ◆ Al Programa de Becas de Tesis de Licenciatura (PROBETEL) por el apoyo económico otorgado durante 6 meses para la realización de esta tesis.

## *Agradecimientos especiales*

- ◆ A Dios, el origen y fin de todo ¿Hay que decir algo más?
  
- ◆ A mi directora de tesis, Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro, por haberme dado la oportunidad de hacer este trabajo. La casualidad fue la culpable de haberla conocido (aunque hay alguien que dice que las casualidades no existen) y fue el principio de muchas cosas buenas. Bajo su guía aprendí que la ciencia no es tan romántica como se ve en la televisión, sino que en su mayor parte es trabajo duro, ingrato y poco apreciado, pero que tiene su recompensa cuando después de todo eso se entiende un poco mejor como trabaja la naturaleza, o no se entiende y en ese caso llega la humildad, lo que también es bueno. Gracias por enseñarme que el mundo es de los aventados y que a pesar de que las cosas no siempre resultan como se planean, no por eso dejan de tener mérito y valor. Gracias por haberme enseñado que las correcciones exhaustivas tienen una razón de ser y... bueno, gracias por todo.
  
- ◆ A todos mis profesores de la carrera por haberme enseñado lo interesante que es la Biología y que no estaba equivocado cuando decidí hacerla parte de mi vida. Gracias a los que me enseñaron la importancia de comprender adecuadamente lo que se trata de explicar, a los que me enseñaron el valor de la ética y honestidad, a los que me enseñaron a esforzarme más allá del mínimo, a los que me enseñaron el valor de la simpatía y la bondad, a los que ampliaron los horizontes de mi curiosidad e imaginación, a los que me enseñaron a darle un enfoque humano a la fría teoría, y finalmente gracias también a aquellos que me enseñaron con su ejemplo lo que no hay que hacer como biólogos, profesores o personas.
  
- ◆ A mis amigos de la carrera: Ayerim, Yolanda, Gustavo, David, José, Roberto, Oswaldo, Miriam, Antonia, Nadia, María Elena y a aquellos que ahora no recuerdo por alguna razón. Les agradezco haber compartido tan buenos momentos conmigo, por haberme ayudado cuando lo hicieron y por haber sido pacientes y tolerantes en mis malos ratos. Especialmente agradezco a Edna el haber sido parte fundamental de algunos de los mejores momentos de mi vida y por brindarme su amistad a pesar de mis numerosos defectos.
  
- ◆ Finalmente agradezco de todo corazón a la comunidad del anillo del laboratorio de Citogenética Ambiental, gracias a Antonio, Selene, Emmanuel, Erika, Carolina, Rodrigo, Martha, Roció, Concepción (Conni, pues), Lilia, Ivonne, Ivon, Adriana, Eréndira, Julia, Isabel, Ana, Zaira, Sofía y Alex. Gracias también a los buenos amigos del laboratorio de Mutagénesis Ambiental: Alejandro, Leonel, Roberto, Ricardo, Alejandra y Hugo. No hay que olvidar a la señora Ema, a la señora Victoria, a la M. en C. Ana Rosa Flores, a la Dra. Josefina Cortes y a la Dra. María Elena Calderón. Cuando llegué no esperaba encontrar tan buenas personas, y ya por ese solo hecho todo ha valido la pena.

*Es mejor encender una vela que maldecir la  
oscuridad*  
Refrán.

*No es posible que los problemas del mundo sean  
resueltos por escépticos o pesimistas, cuyos  
horizontes están limitados por las oboias  
realidades. Necesitamos hombres que puedan  
soñar cosas que nunca hayan sucedido y que se  
pregunten... ¿Por qué no?*

Spencer W. Kimball

# ÍNDICE

DEDICADO A .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
AGRADECIMIENTOS ESPECIALES .....	4
RESUMEN .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
Problemática .....	11
Biomarcadores de exposición .....	15
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	18
Daño genotóxico .....	22
Tipos de daño genotóxico .....	23
Aberraciones cromosómicas .....	24
Determinación de micronúcleos (MN) .....	26
Determinación de MN por bloqueo de citocinesis .....	29
ANTECEDENTES .....	36
Micronúcleos en fumadores .....	36
Micronúcleos en fumadores pasivos .....	38
Índices de división nuclear y de bloqueo de la proliferación de la citocinesis .....	38
Nicotina y cotinina .....	39
JUSTIFICACIÓN .....	40
HIPÓTESIS .....	41
OBJETIVOS .....	41
Objetivo general .....	41
Objetivos particulares .....	41
MÉTODO .....	43
1.0 Grupos de estudio .....	43
1.1 Fumadores activos .....	43
1.2 Fumadores pasivos .....	43
1.3 Grupo testigo .....	44
2.0 Toma de muestras .....	44
3.0 Determinación de MN en linfocitos de sangre periférica mediante bloqueo de la citocinesis ....	44
3.1 Cultivo de linfocitos .....	44
3.2 Prefijación .....	45
3.3 Fijación .....	45
3.4 Preparación de laminillas .....	45
3.5 Tinción con reactivo de Schiff .....	46
3.6 Examen microscópico .....	46
4.0 Determinación y cuantificación de nicotina y cotinina en muestras de orina .....	50
4.1 Extracción de nicotina y cotinina .....	50
4.2 Curvas de calibración .....	50
4.3 Análisis cromatográfico .....	51
5.0 Análisis estadístico .....	51

RESULTADOS.....	52
Variaciones intergrupales en la frecuencia de MN y afectación del ciclo celular .....	52
Variaciones intragrupalas en la frecuencia de MN y afectación del ciclo celular .....	57
Cuantificación de Nicotina y Cotinina.....	60
DISCUSIÓN .....	65
Células binucleadas con micronúcleos y micronúcleos totales .....	65
Índices de División Nuclear y de Bloqueo de Proliferación de la Citocinesis .....	72
Nicotina y Cotinina .....	74
CONCLUSIONES .....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	79
APÉNDICE.....	90

## RESUMEN

En este estudio se evaluó el daño genotóxico del humo de tabaco, en fumadores activos y pasivos, a través de la determinación de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis, analizándose también su efecto sobre el ciclo celular mediante el empleo de los índices de división nuclear y de bloqueo de proliferación de la citocinesis.

Los resultados mostraron una frecuencia significativamente menor de micronúcleos en el grupo de fumadores activos, con respecto al grupo testigo. Los fumadores pasivos no presentaron diferencias con respecto a sus testigos, excepto por el subgrupo de menores de 23 años, el cual mostró un promedio mayor de ellos que los testigos.

Los valores de los índices de división nuclear y de bloqueo de la proliferación de la citocinesis mostraron que probablemente hubo retraso en el ciclo celular de los fumadores activos, pasivos y testigos, aunque fue mayor en estos últimos.

También se midieron los contenidos de nicotina y cotinina en la orina de los integrantes de los 3 grupos mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, encontrándose cantidades significativamente mayores en el grupo de los fumadores. Los valores de los grupos pasivo y testigo no pudieron establecerse con exactitud debido a que cayeron por debajo de los límites de resolución aceptados por el espectrómetro de masas. Se aplicó la prueba de correlación de Pearson a los datos de nicotina y cotinina obtenidos en los fumadores activos, y solo se encontró asociación entre el nivel de nicotina con la frecuencia de micronúcleos en los fumadores ligeros.

## INTRODUCCIÓN

El ser humano requiere para su buen desarrollo de ambientes limpios que prevengan en la medida de lo posible la aparición de enfermedades. Sin embargo, de algunas décadas a la fecha, el ambiente en el que se desenvuelven las personas ha sido invadido por gran cantidad de sustancias nocivas para la salud y los hogares no son la excepción. Dióxido y monóxido de carbono, hidrocarburos aromáticos, alcoholes, gases inorgánicos, compuestos orgánicos volátiles, partículas metálicas, plaguicidas, asbestos y contaminantes biológicos; todos ellos y muchos otros han ido colmando de manera lenta, pero constante, los ambientes de las viviendas. Su procedencia es muy variada ya que mientras algunos se originan de manera accidental y escapan al control de las personas, como el formaldehído y el benceno que se desprenden de muebles y paredes recubiertos con materiales que los contienen, o los disolventes liberados por la ropa lavada en tintorerías, e incluso el radón proveniente de suelos y ladrillos que lo contienen, otros son generados de manera intencional como el humo de tabaco (Bardana, 1997).

Es bien conocido por la mayor parte de la sociedad que el tabaco es causante de múltiples males y es uno de los principales responsables de numerosas muertes en todo el mundo. Diversos tipos de cáncer han sido asociados con el hábito de fumar y se ha comprobado que incluso, las personas expuestas de manera involuntaria (fumadores pasivos), son más susceptibles para contraer enfermedades que aquellas que no lo están (ASH, 2002).

Los efectos perjudiciales del tabaco han sido evaluados durante largo tiempo, sin embargo existen aspectos que requieren de mayor análisis como son los mecanismos mediante los cuales el humo de tabaco ocasiona daños al ADN, ya que cuando el material genético es lesionado pueden ponerse en marcha eventos que culminen con el desarrollo de algún tipo de cáncer (Salamanca, 1995).

Debido a que no es posible observar directamente una molécula de ADN para verificar si ha sido dañada o no, es necesario recurrir a pruebas que indiquen cuando el material genético ha sido alterado. Existen diversos ensayos para este fin como: electroforesis unicelular alcalina, el intercambio de

cromátidas hermanas, determinación de aductos, detección de aberraciones cromosómicas y la cuantificación de micronúcleos, entre otros (Albertini *et al.*, 2000).

La prueba de micronúcleos es usada para evaluar posibles daños en los cromosomas de una célula en interfase. Su determinación consiste en la búsqueda de una pequeña porción de material genético, separada del resto, y que visto al microscopio adopta una forma idéntica a la del núcleo de una célula normal, solo que de un tamaño mucho menor y de ahí el nombre. Este micronúcleo (MN) es el resultado de un evento dañino a la integridad del material genético, del huso mitótico o del centrómero, y se ha establecido que daños de este tipo pueden ser causa de muerte celular o de inicio de procesos cancerígenos (Fenech *et al.*, 1999).

Se han utilizado linfocitos de sangre periférica para la búsqueda de micronúcleos (MN), ya que estas células están en contacto con los elementos constitutivos del humo de tabaco que ingresan al cuerpo, así como con aquellos productos metabólicos derivados de ellos, por lo que son buenos modelos para estudiar el efecto genotóxico del humo de tabaco. Por ello, la cuantificación de MN en linfocitos es una prueba adecuada para establecer la existencia de daño al ADN y es una alternativa más fácil y rápida que la prueba convencional de aberraciones cromosómicas y también proporciona información acerca de la afectación del ciclo celular (Pardell, 1996; Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000).

Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto genotóxico causado por el humo de tabaco en fumadores activos, y en aquellos expuestos en ambientes contaminados, mediante el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica. Asimismo, los niveles de nicotina y cotinina fueron medidos en la orina de los sujetos de estudio.

## ***Problemática***

El tabaquismo es una grave adicción que causa estragos alrededor de todo el mundo. Millones de personas fuman voluntariamente sin saber, o sin que les importe, el enorme daño que esto provoca a su salud.

Mundialmente fuman cigarrillos, u otros productos derivados de tabaco, aproximadamente 1300 millones de personas (casi 1000 millones de hombres y 300 millones de mujeres). Con la disminución del uso de tabaco en muchos países industrializados, el hábito del tabaquismo ha ido desplazándose hacia las naciones en desarrollo. Cerca del 35 % de los hombres fuman en países desarrollados, comparados con casi el 50 % en naciones subdesarrolladas (American Cancer Society, 2003).

Un estimado de 4.9 millones de muertes prematuras ocasionadas por el tabaco ocurrieron en el año 2000, casi equitativamente divididas entre países industrializados y subdesarrollados. Más de 600 000 de estas muertes ocurrieron en China solamente, y si las tendencias actuales continúan, se espera que en el 2020 excedan 9 millones, con 7 millones de éstas ocurriendo en países en desarrollo. De todas las personas vivas actualmente, aproximadamente 500 millones morirán a causa del consumo de tabaco, la mitad de ellas durante la madurez económicamente activa y con una pérdida individual de 28 años de vida, en promedio (American Cancer Society, 2003).

El consumo total de tabaco va en aumento. Se pronostica que si la prevalencia mundial del tabaquismo se mantiene sin cambios, la cantidad mundial de fumadores habrá aumentado en 2025 de 1300 a 1700 millones, y uno de cada dos fumadores morirá a consecuencia de alguna enfermedad causada por el tabaco (OMS, 2003).

El tabaquismo es causante de la disminución de la calidad de vida de las personas. Se ha comprobado que los fumadores presentan una reducción en el rendimiento para el ejercicio máximo y un sistema inmunológico menos eficaz que el de la población no fumadora. Asimismo, la aparición de arrugas faciales se adelanta y el acné intenso en los adolescentes es más frecuente. Los fumadores también encaran un riesgo mayor que los no fumadores de contraer gran variedad de enfermedades, muchas de

las cuales pueden ser fatales como la cardiopatía isquémica, enfermedades vasculares, enfisema pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, entre otras. Por otro lado, muchas condiciones médicas asociadas con fumar pueden no ser mortales, pero sí causar años de incapacidad y/o deterioro de la calidad de vida (American Council on Science and Health, 1997).

Diversas investigaciones han determinado que fumar más de 25 cigarrillos diarios duplica el riesgo de contraer diabetes *mellitus*, que la mitad de todos los fumadores crónicos morirán prematuramente e impondrán un importante costo social y económico a sus familias y a los sistemas médicos gubernamentales, que en las mujeres gestantes se pone en riesgo el bienestar del producto y se incrementa considerablemente el riesgo de bajo peso al nacer, la muerte infantil y se disminuyen las posibilidades de un desarrollo infantil pleno (Lazcano *et al.*, 2002; Sepúlveda *et al.*, 2002).

Fumar ha sido considerado como un hábito causante de diversos tipos de cáncer, siendo el más común el de pulmón. Se ha descrito que fumar provoca el 80 % de las muertes por cáncer de pulmón y de todos los decesos atribuidos al tabaco, el 25 % son consecuencia de este tipo de cáncer. Otro cáncer relacionado con el tabaco es el de boca y se ha comprobado que el 90 % de las personas con este tipo de cáncer fuman o mastican algún derivado de tabaco. Además, se ha encontrado una fuerte correlación entre fumar y el riesgo de contraer cáncer de boca, nariz, faringe, esófago, estomago, páncreas, hígado, riñón, uretra, vejiga, útero, seno y leucemia (ASH, 2002; DeMarini, 2004).

En México, 144 personas mueren diariamente por causas asociadas al tabaco. La Encuesta Nacional de Adicciones, realizada en 2002, mostró que en nuestro país el 26.4 % de la población urbana entre 12 y 65 años fuma (casi 14 millones de consumidores de tabaco), 55.4 % no fuma (29 millones) y el 18.2 % refirieron ser ex-fumadores (9 millones y medio). En cambio, los resultados de la población rural denotaron un patrón diferente, con 14.3 % fumadores (2 millones y medio), 15 % exfumadores (2 millones y medio) y no fumadores el 70.7 % (casi 12 millones). La prevalencia de fumadores en la población urbana masculina de 12 a 65 años fue de 39.1 %, lo que equivale a más de 9 millones de individuos con este hábito. Entre las mujeres, la prevalencia fue de 16.1 %, que representa más de 4 millones de fumadoras. Mientras que la prevalencia de varones de la población rural fue del 27.1 % (2 millones), y la frecuencia de uso en mujeres fue de tan sólo el 3.5 % (300 000 personas) (Secretaría de Salud, 2002).

En el grupo de exfumadores de la población urbana, la prevalencia entre los hombres sobrepasa la de las mujeres: en los varones fue de 23 %, lo que equivale a más de cinco millones que han abandonado este hábito, mientras que en las mujeres fue de 14.3 %, lo que corresponde a 4 millones. En la población rural, las diferencias por sexo son más evidentes, pues el 24.8 % son exfumadores, lo que equivale a casi 2 millones, mientras que en las mujeres solamente 6.9 % pertenecen a esta categoría (600 000 personas). Con respecto a los no fumadores, en la población urbana femenina se presentó una prevalencia del 69.7 %, equivalente a 20 millones de mujeres no fumadoras, mucho mayor que la del grupo masculino, de 37.9 %, que corresponde a casi 9 millones de fumadores. En la población rural el 89.6% de las mujeres señaló ser no fumadoras (más de 8 millones), así como el 48% de los hombres, es decir 3 millones y medio (Secretaría de Salud, 2002).

El tabaco puede ser consumido de diversas maneras (masticado, cataplasmas, infusiones, etc.), pero la más común es aspirando el humo que se forma en los cigarrillos por su combustión. La fuente principal de humo es la boquilla del cigarrillo durante las absorciones, y las fuentes secundarias, entre las absorciones, son el extremo encendido y la boquilla. En cada inhalación las mucosas de boca, nariz, faringe y árbol traqueobronquial resultan expuestas (EPA, 1997).

El humo del tabaco se divide en dos tipos de acuerdo con su origen. El principal que es el que ha sido inhalado y exhalado, y el lateral o secundario que proviene de la punta en ignición del cigarrillo (cerca del 85 % del humo en una habitación con fumadores, proviene de ese tipo de humo). Juntos conforman lo que se conoce como humo de tabaco ambiental ó ETS (Environmental Tobacco Smoke) (Güerin *et al.*, 1992; ASH, 2002).

A las personas que respiran el humo producido por los fumadores se les conoce como fumadores pasivos o involuntarios. En México, según la Encuesta Nacional de Adicciones, hay 14 millones de fumadores involuntarios dentro de la población urbana, pero no refiere datos para la población rural (Secretaría de Salud, 2002).

Durante muchos años se pensó que el tabaquismo pasivo tenía nula o poca importancia, atribuyéndole sólo efectos irritantes sobre la conjuntiva ocular o el tracto respiratorio superior. Las primeras

referencias suficientemente documentadas de los efectos del tabaquismo pasivo se realizaron en la década de los setenta, donde se estableció que es un riesgo innecesario que repercute negativamente sobre la salud del organismo del no fumador (EPA, 1997; Secretaría de Salud, 2001).

A partir de los 80's se empezó a acumular evidencia con respecto a la magnitud del daño al que están expuestos los fumadores pasivos. Se determinó que algunos de los efectos inmediatos en los fumadores involuntarios incluían irritación ocular, dolor de cabeza, tos, dolor de garganta, mareos y náuseas. Después se supo que los adultos con asma podían experimentar una declinación significativa de la función pulmonar cuando se veían expuestos al humo de tabaco, mientras que nuevos casos podían ser inducidos en niños con padres fumadores. Incluso periodos cortos de exposición, podían producir consecuencias medibles en la función cardíaca. Sólo 30 minutos eran suficientes para reducir el flujo de sangre a las arterias coronarias y periodos más largos aumentaban el riesgo de contraer padecimientos relacionados al tabaquismo como enfermedades cardíacas, apoplejía, cáncer de nariz y pulmón (de éste último, hasta 20 % en mujeres y 30 % en hombres) (WHO, 1999; ASH, 2002; Husgafvel-Pursiainen, 2004).

Más recientemente, se ha encontrado una relación aparentemente causal entre la exposición al humo de tabaco con el aborto espontáneo, exacerbación de la fibrosis quística y del cáncer cervical. En los niños, el estar expuestos al humo del cigarrillo aumenta el riesgo de contraer infecciones en el tracto respiratorio, como bronquitis y neumonía, y también se ha asociado con infecciones del oído medio, deterioro cardiovascular y problemas en la conducta infantil (Hackshaw *et al.*, 1997; EPA, 1997; WHO, 1999; Otsuka, 2001).

No obstante lo anterior, a últimas fechas se ha puesto en entredicho el efecto real que pueda tener la exposición al humo de tabaco ambiental. Enstrom y Kabat (2003) publicaron las conclusiones de un estudio prospectivo de 39 años y en el que participaron 110 000 personas, afirmando no haber encontrado una relación causal entre la exposición al humo de tabaco ambiental y la mortalidad derivada del cáncer pulmonar y afecciones coronarias. Este estudio fue muy criticado por que uno de los autores, supuestamente, recibió financiamiento de una compañía tabacalera (entre otras razones que pueden ser consultadas en <http://bmj.bmjournals.com/cgi/eletters/326/7398/1057>), pero hasta el momento nadie ha podido demostrar alguna falla en él y su tamaño muestral le da un poder estadístico

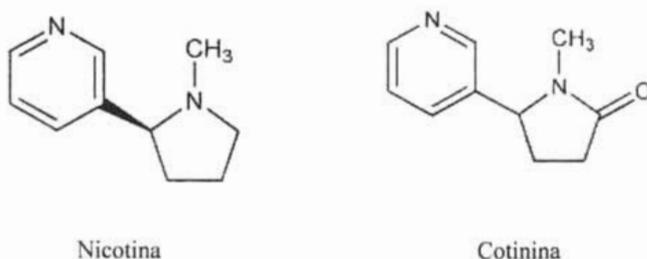
muy bueno. Como puede notarse, la controversia en torno al humo de tabaco y sus posibles efectos dañinos aún se mantiene.

El humo del tabaco está constituido por más de 4000 compuestos en formas particulada y gaseosa. De los cuales 81 son de probado efecto carcinogénico según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés). La fase particulada está compuesta por alquitrán, nicotina, benceno y benzopireno, entre otros, mientras que la fase gaseosa incluye monóxido de carbono, amoniaco, dimetilnitrosamina, formaldehído, ácido cianhídrico, óxidos de nitrógeno, fenol, dióxido de azufre y acroleína. Aunque las sustancias presentes en ambos tipos de humo son las mismas, las concentraciones varían en cada uno de ellos siendo en el humo lateral o secundario donde adquieren los valores más altos. Por ejemplo, se ha cuantificado 7 veces más nicotina, 16 veces más benzopireno, 36 veces más formaldehído y 455 veces más amoniaco en el humo lateral que en el principal y se ha determinado que el humo de tabaco ambiental consiste principalmente de 85 % de humo lateral y 15 % de humo principal (Güerin *et al.*, 1992; Seifert *et al.*, 1993; EPA, 1997; DeMarini, 2004).

### ***Biomarcadores de exposición***

La exposición al humo del tabaco puede ser medible. La forma tradicional de hacerlo es por medio de cuestionarios en los que se les pregunta a los fumadores datos generales junto con su percepción personal del grado de exposición. Esta forma aún se emplea, pero se ha comprobado, en varias ocasiones, que la autopercepción es errónea o que los sujetos mienten, lo cual repercute negativamente al momento de analizar los resultados obtenidos. Es en estos casos, cuando los marcadores bioquímicos de exposición demuestran su utilidad, revelando en que grado un sujeto ha estado expuesto (Montes *et al.*, 1998).

Para el caso específico del tabaco se han empleado biomarcadores como: carboxihemoglobina, tiocianato (metabolito del ácido cianhídrico), nitrosoprolina (metabolito de los óxidos de nitrógeno), etc. Todos ellos derivados de compuestos presentes en el humo del tabaco, pero que también pueden provenir de otras fuentes (alimentos, fuentes de combustión incompleta, trastornos metabólicos, etc.). Por eso, en la actualidad se recomienda la detección de la nicotina y cotinina (Fig. 1) como biomarcadores de exposición (EPA, 1997; Montes *et al.*, 1998).



**Figura 1. Representación grafica de las moléculas de nicotina y cotinina.**

La nicotina es un alcaloide natural obtenido principalmente de las hojas de la planta de tabaco *Nicotiana tabacum*. Es una amina terciaria compuesta de un anillo de piridina y un anillo de pirrolidina, la cual existe en dos formas isoméricas, D y L. La L-nicotina es el principal alcaloide del tabaco y la forma farmacológica más activa (Hutchinson *et al.*, 1998).

La nicotina es destilada de la combustión del tabaco y es transportada en las gotas de alquitrán que son inhaladas. La absorción a través de las membranas biológicas depende del pH, ya que ésta es una base débil. En estado ionizado, al encontrarse en ambientes ácidos, la nicotina no cruza rápidamente las membranas. Debido a que el pH del humo de la mayoría de los cigarrillos es ácido (pH 5.5), existe poca absorción bucal, caso contrario ocurre para el humo de los puros, habanos y cigarrillos europeos, por tener pH mayor a 6.5. La nicotina es metabolizada primeramente en el hígado, pero también en pequeña proporción por otros tejidos como pulmones, riñones y cerebro (SGR, 1988; Pardell, 1996).

Cuantitativamente, el metabolito más importante de la nicotina, en la mayoría de las especies mamíferas, es la cotinina. En los humanos, del 70 al 80 % de la nicotina es transformada en cotinina mediante una ruta metabólica que involucra al citocromo P<sub>450</sub> y una aldehído-oxidasa citoplasmática. Otros metabolitos primarios son: nicotina N' óxido, normicotina, nicotina glucorónido, ion nicotina iminium y ion nicotina isometonium (Arneric, 1998).

Aunque cerca del 80 % de la nicotina es metabolizada vía cotinina en los humanos, solo del 10 al 20 % de la nicotina absorbida por los fumadores aparece en la orina como cotinina inalterada. El resto se divide en casi una docena de metabolitos, y entre los más importantes se encuentran: cotinina glucoronido, cotinina-N-óxido, norcotinina, trans-3'-hidroxicotinina y trans-3'- hidroxicotinina glucoronido. De estos últimos metabolitos se conoce muy poco y como estructuralmente son muy similares a la cotinina, es de esperarse un comportamiento bioquímico similar (Arneric, 1998).

Se ha determinado que los fumadores crónicos metabolizan la nicotina más eficientemente que los no fumadores, lo cual se refleja en una mayor excreción urinaria de este compuesto y de sus metabolitos. En las primeras 24 horas se elimina el 77 % de la nicotina absorbida y al tercer día se ha llegado a eliminar hasta el 90 %, por lo tanto, se tiene un espacio de tiempo relativamente reducido para determinar la magnitud de la exposición de una persona al humo de tabaco, con base en el contenido de nicotina encontrado en la orina (Pardell, 1996).

Debido a las deficiencias de la nicotina como biomarcador de exposición, se aconseja usar su metabolito primario, la cotinina, para el mismo fin. Este compuesto tiene una vida media más larga (19 h contra 2 h) en el organismo humano y su concentración en sangre, orina o saliva es mayor, por lo que la cuantificación de este metabolito se recomienda como indicador de consumo de tabaco y de abstinencia, así como de exposición a humo de tabaco ambiental (EPA, 1997; Montes *et al.*, 1998).

Métodos muy sensibles y altamente específicos han sido desarrollados para la determinación de nicotina y cotinina en orina, sangre, semen, suero, saliva y fluidos cervicales. Éstos incluyen ensayos espectrofotométricos con ácido dietiltiobarbitúrico, cromatografía de gases con columnas capilares específicas para nitrógeno, trampas de iones, detección por espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta, radioinmunoanálisis y pruebas de ELISA con anticuerpos monoclonales (Bazylack *et al.*, 2000; Tyrpie *et al.*, 2000).

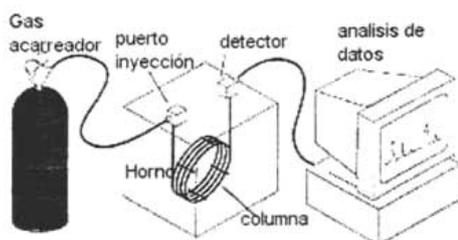
De todas estas técnicas, una de las más empleadas es la de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Ésta presenta límites de resolución muy bajos, del orden de pg/ml, lo cual es necesario para el análisis de nicotina y cotinina en fumadores pasivos, ya que las concentraciones encontradas en ellos no alcanzan la decena de ng/ml, lo que hace muy difícil su detección con otros

procedimientos, además de que los análisis cromatográficos son más específicos y capaces de discernir entre compuestos químicos muy semejantes. La desventaja es que este tipo de pruebas requiere tiempo y emplea equipo y sustancias costosas, aunque si se dispone de ellos, es de las mejores para análisis de la nicotina y sus derivados (Hansen *et al.*, 2001).

### ***Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas***

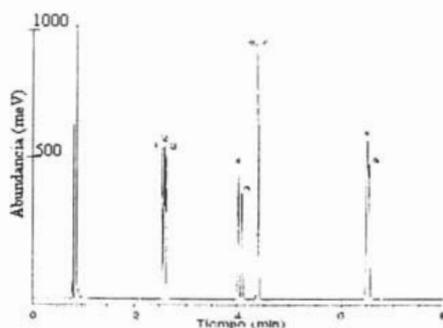
La cromatografía es la separación de una mezcla de compuestos en componentes individuales para identificar y medir, más fácilmente, la cantidad de cada uno de ellos. Existen numerosas técnicas cromatográficas, siendo la de gases una de las más sensibles. Para que un compuesto sea candidato al análisis por cromatografía de gases debe ser suficientemente volátil y estable a temperaturas altas (400-450 °C) (Agilent, 2004).

En la cromatografía de gases el proceso de análisis es el siguiente: la muestra a determinar se coloca en el puerto de inyección (Fig.2) y mediante el empuje de un gas inerte (generalmente helio) se introduce en la columna capilar. La temperatura se eleva gradualmente mediante un programa preestablecido y los componentes de la mezcla se volatilizan. La columna está rellena de un polímero especial, tipo silicón o arcilla, que obstaculiza el paso de los compuestos. De éstos, los más ligeros atraviesan la columna en menor tiempo y llegan en primer lugar al detector que emite una señal electrónica de intensidad proporcional a la abundancia del compuesto, que luego es analizada con ayuda de una computadora.



**Figura 2. Componentes principales de un cromatógrafo de gases (modificado de Agilent, 2004).**

Después de que todos los compuestos han emergido, se obtiene una gráfica como la que se muestra en la figura 3, en donde se encuentran representadas las abundancias (relativas o absolutas) de los compuestos separados y el tiempo que tardaron en emerger de la columna capilar (Agilent, 2004; ASMS, 2004; Warangkana *et al.*, 2004).



**Figura 3. Cromatograma de una mezcla de varios compuestos (modificado de Warangkana *et al.*, 2004).**

Bajo las mismas condiciones cromatográficas, cada componente emerge de la columna capilar en un intervalo de tiempo específico invariable, que es lo que se llama tiempo de retención, y conociendo el tiempo de retención de algún compuesto químico en particular, es posible separarlo del resto (Morrison y Boyd, 1998; ASMS, 2004).

La cromatografía de gases ayuda a separar los diferentes compuestos de una mezcla, pero no permite identificarlos por lo que se requiere emplear otra técnica, la de espectrometría de masas.

En la figura 4 se muestran los componentes de un espectrómetro de masas. El proceso de análisis comienza con la inyección del compuesto puro en forma gaseosa en el puerto de entrada, en este caso se utiliza el obtenido con la cromatografía de gases en el paso anterior. El compuesto es bombardeado por un haz de electrones que ioniza y rompe la molécula en muchos fragmentos, algunos de los cuales son iones positivos. Cada tipo de ion tiene una razón particular de masa a carga, o valor  $m/e$  ( $m/z$  en

ingles). La carga es 1 para la mayoría de estos iones, de manera que  $m/e$  es simplemente la masa del ion. El conjunto de iones se determina en el analizador de masas, que es un electroimán de intensidad variable que solo permite el paso, al detector, de los iones de un valor  $m/e$  específico cada vez (los demás simplemente escapan por un lado), de modo que se obtiene una señal para cada valor de  $m/e$  representado.

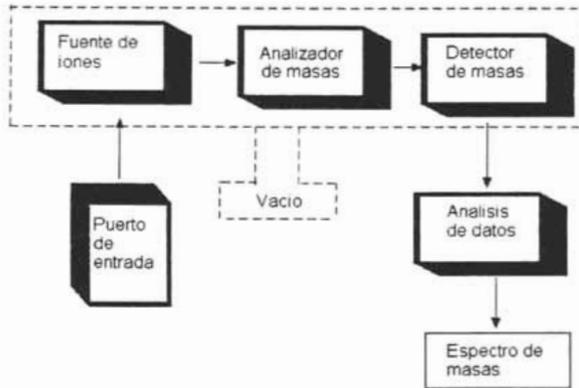


Figura 4. Componentes de un espectrómetro de masas (modificado de ASMS, 2004)

La intensidad de cada señal refleja la abundancia del ion que produce la señal y puede expresarse en términos absolutos indicando el valor encontrado para ese ion; o tomarse el valor del ion más abundante, llamado pico base, asignarle un valor de 100 y expresar las magnitudes de los otros iones con relación al pico base, en cuyo caso se habla de intensidad relativa (Settle, 1997; Morrison y Boyd, 1998).

En la figura 5 se muestra un espectro de masas para la molécula de  $\text{CO}_2$ . Se puede observar claramente, la presencia de 4 iones diferentes,  $\text{C}^+$  de masa 12,  $\text{O}^+$  de masa 16,  $\text{CO}^+$  de masa 28 y  $\text{CO}_2^+$  de masa 44. A este último ion, también se le llama *ion molecular* o *ion matriz* ( $\text{M}^+$ ) y no es más que el compuesto con un electrón menos, lo que le da la carga positiva (ASMS, 2004).

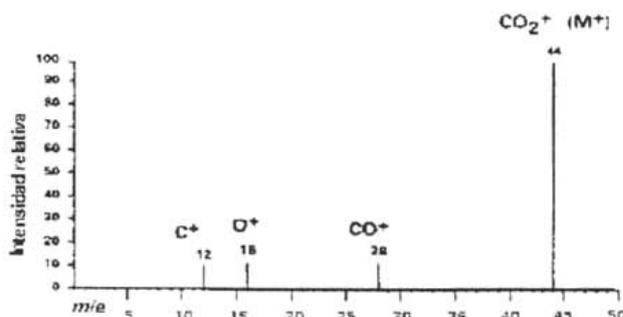


Figura 5. Espectro de masas del dióxido de carbono (modificado de ASMS, 2004).

Además de proporcionar información acerca de la masa atómica de los compuestos, un espectro de masas permite identificarlos. Si se determina el espectro de masas de un compuesto desconocido y se encuentra que es idéntico al de una sustancia de estructura conocida, ya descrita, puede concluirse que ambos son idénticos. Asimismo, un espectro de masas también permite cuantificar la cantidad del compuesto cuando se compara la señal, con la obtenida previamente con una curva de calibración, pero la máxima precisión se obtiene mediante el empleo de una sustancia conocida como *estándar interno*. Éste es un compuesto de estructura química muy similar al que se busca (normalmente es el mismo, solo que con una proporción de isótopos diferente), el cual se agrega a la mezcla antes de la separación, a una concentración conocida. Cualquier pérdida del compuesto a analizar se verá reflejada por una correspondiente disminución del estándar interno y mediante una sencilla corrección matemática se puede cuantificar la concentración real del compuesto de interés. Con este método es posible alcanzar límites de detección de picogramos (Settle, 1997; Morrison y Boyd, 1998).

## ***Daño genotóxico***

Los agentes químicos genotóxicos son compuestos capaces de modificar el material hereditario de las células vivas. La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varios pasos. Durante ellos, el agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares. Una vez dentro de la célula puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa), o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta y se llama promutágeno. Se da entonces la interacción con el ADN produciéndose un daño, que puede ser reparado eficiente o ineficientemente (Ames, 1989).

Los productos reactivos generados a través del metabolismo interactúan con el ácido desoxirribonucleico, produciéndose lesiones premutagénicas o aductos, que en muchos casos se fijan y producen mutaciones puntuales en el ADN, tales como sustituciones de bases (transiciones y transversiones) o bien mutaciones de corrimiento de marco de lectura (Hemmink *et al.*, 1994).

La replicación errónea de “microlesiones”, como aductos, lugares abásicos o roturas de una sola hebra, puede acabar produciendo sustituciones de pares de bases de nucleótidos, o la inserción o supresión de fragmentos de polinucleótidos cortos en el ADN cromosómico. En cambio, las “macrolesiones”, como masas de aductos, entrecruzamientos o roturas de las dos hebras, llegan a desencadenar la adición, pérdida o reorganización de fragmentos cromosómicos relativamente grandes. En cualquier caso, las consecuencias podrían ser devastadoras para el organismo, ya que esos hechos probablemente ocasionen muerte celular, pérdida de función o transformación maligna de las células (Cole y Skopek, 1994; OIT, 2001).

La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende inevitablemente de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de ésta una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o desintoxicación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas críticas de las células. La probabilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende de la naturaleza del mismo, la capacidad que posee la célula de

repararlo o amplificarlo, la oportunidad de expresar cualquier alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes (OIT, 2001).

### ***Tipos de daño genotóxico***

El daño genotóxico es un paso crítico en la inducción del cáncer y también puede intervenir en la aparición de defectos de nacimiento y muerte fetal, por ello es importante detectar a tiempo los posibles perjuicios ocasionados por algún agente tóxico, y para lograrlo se han ideado pruebas que permiten revelarlos. En términos generales, los sistemas biológicos de prueba para la detección de daño genotóxico se agrupan dependiendo del tipo de mutación que detectan y son:

1) Mutaciones génicas, entendidas como sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Estas modificaciones pueden llegar a inactivar a un gen, aunque normalmente permiten al individuo sobrevivir y reproducirse, con lo cual las mutaciones génicas se establecen y se heredan a las siguientes generaciones. Se detectan mediante procesos de secuenciación de muestras de ADN (Cole y Skopek, 1994).

2) Alteraciones en la integridad del ADN. Éstas son medibles a través de la formación de aductos (lesiones premutagénicas), ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. Estas alteraciones pueden ser reparadas enzimáticamente y si esto ocurre no constituyen mutaciones heredables. Algunas de las pruebas que las detectan son la determinación de aductos en ADN y la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa (Hemmink *et al.*, 1994).

3) Aberraciones cromosómicas, que se subdividen a su vez en estructurales y numéricas.

a) Aberraciones estructurales. Consisten en deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Estas modificaciones en los cromosomas son deletéreas y provocan desde el desarrollo de enfermedades genéticas en los individuos afectados, hasta letalidad.

b) Aberraciones numéricas: Incluyen aneuploidias y poliploidias. Estos cambios numéricos comúnmente ocasionan una falta de equilibrio genético drástico, y letalidad en las etapas tempranas del desarrollo, aunque también pueden haber alteraciones numéricas viables.

En ambos casos, un análisis de cariotipo permite detectar este tipo de daños. (Bender, 1980).

## **Aberraciones cromosómicas**

Como norma general, la constitución cromosómica de los individuos de una especie, o de las células de un individuo, es constante en cuanto a la morfología y al número de cromosomas. Sin embargo, pueden producirse variaciones cromosómicas, espontánea o artificialmente.

Los cromosomas están expuestos a la acción de numerosos agentes ambientales mutagénicos que los dañan y les ocasionan fracturas o rompimientos. Estos agentes pueden ser de naturaleza física, como las radiaciones, química, como las drogas y agentes alquilantes, o biológicos, como los virus. Existen mecanismos de reparación celular que tratan de subsanar el daño, pero éste puede ser tan grave, o los mecanismos de reparación no ser tan eficientes, que se producen las alteraciones estructurales (Salamanca, 1990).

Una anomalía cromosómica puede ser *constitucional* cuando todos los tejidos la portan, *adquirida* cuando solo un órgano es el afectado, *homogénea* cuando todas las células estudiadas llevan la anomalía, en *mosaico* cuando solo algunas de las células presentan la anomalía, *numéricas* si existen cromosomas de más o de menos y *estructurales* cuando hay cambios en la conformación normal de los cromosomas (Huret, 2000).

En un sentido amplio, la variación o aberración cromosómica estructural consiste en un reordenamiento de la disposición lineal de los genes sobre los cromosomas, unas veces con pérdida, otras con ganancia, y otras sin variación en el contenido total de información genética (Lacadena, 1996).

Una aberración cromosómica estructural puede afectar a un solo cromosoma, como ocurre en las deleciones, duplicaciones e inversiones, o simultáneamente a dos o más cromosomas como sucede en las translocaciones. Todos los cambios estructurales de los cromosomas están conectados de una forma u otra con daño a su estructura e involucran secuencias de ruptura-reunión (Schulz, 1980).

Los cambios estructurales corresponden a tres tipos principales:  *cromosómicos*,  *cromatídicos* y  *subcromatídicos*, según tengan lugar antes o después de la duplicación durante la fase de síntesis. En el primer caso la unidad de ruptura es el cromosoma y ocurren antes de la fase de síntesis puesto que la posterior duplicación de la única cromátida alterada afectará al cromosoma como conjunto. Las aberraciones cromatídicas se producen después del periodo de síntesis y antes de la mitosis, dando como resultado final un daño limitado a una de las cromátidas. Las aberraciones subcromatídicas ocurren cuando el daño se produce durante la mitosis e implican daños a una sola hebra de ADN (Dutrix y Wambersie, 1990; Lacadena, 1996).

Las alteraciones en el número cromosómico de las células pueden originarse como resultado del fenómeno denominado no-disyunción o no-separación cromosómica, de un rezago anafásico en la migración de los cromosomas hacia los polos celulares, o por cambios en el número de cromosomas de los gametos que implican la repetición de varios conjuntos o juegos haploides de cromosomas. Las fallas pueden originarse en la meiosis, tanto en la primera como en la segunda división, o en ambas; o presentarse durante la división mitótica (Salamanca, 1990).

Estas alteraciones o rearrreglos cromosómicos también pueden dividirse en dos categorías generales: balanceadas y no-balanceadas. Las balanceadas no contienen ganancia o pérdida neta de material genético, lo que no sucede en las no-balanceadas o desequilibradas, en las que pueden existir pérdidas o ganancias importantes, hecho que en la mayoría de las ocasiones es incompatible con la vida de las células (Lacadena, 1996).

En el interior de los cromosomas se agrupa todo el material genético y se ha determinado que los seres vivos poseen ciertos genes que son responsables del correcto progreso del ciclo celular. Cuando estos genes se alteran y comienzan a actuar de manera incontrolada, se dice que se han convertido en oncogenes y la célula comienza a dividirse sin control alguno; éste es el principio del desarrollo del cáncer (Salamanca, 1995).

La mayoría de los tumores cancerosos presentan alteraciones cromosómicas particulares, situación que los ha hecho especialmente útiles para el diagnóstico, pero la ventaja va más allá, debido a que también se ha encontrado que las aberraciones cromosómicas aparecen antes que los síntomas. Por lo

tanto, un aumento de este tipo de alteraciones indica un riesgo mayor de contraer cáncer. Adviértase el hecho de que un riesgo mayor no implica necesariamente el desarrollo de la enfermedad y esto es por que en la mayoría de las ocasiones, las células con estas alteraciones mueren (apoptosis causada por la pérdida de genes indispensables para la vida), en lugar de tornarse cancerosas. Sin embargo, varios estudios han dado seguimiento a grupos con gran cantidad de aberraciones cromosómicas y han encontrado que, efectivamente, un porcentaje significativamente alto de ellos terminan desarrollando cáncer (Nordenson et al., 1984; Liou et al., 1999; Bonassi et al., 2000).

De lo anterior se deduce que el estudio de las aberraciones cromosómicas es una herramienta muy valiosa para determinar la presencia de daño genético en los seres humanos. No obstante, los avances en la citogenética prosiguen y han aparecido nuevas técnicas que, aplicadas de manera conjunta con la anterior, ofrecen un entendimiento mayor del daño causado a los cromosomas por los diversos agentes tóxicos. Una de ellas es la determinación de micronúcleos.

### ***Determinación de micronúcleos (MN)***

En 1997 Evans publicó un artículo donde hacía una reseña acerca de los eventos históricos involucrados en el desarrollo de esta técnica, y a continuación se incluirá un breve resumen de ellos:

*Los MN fueron descritos en el citoplasma de eritrocitos hace más de un siglo y llamados fragmentos de material nuclear por Howell o corpúsculos intraglobulares en la terminología de Jolly a finales de 1800 y principios de 1900. Estas estructuras son conocidas por los hematólogos como cuerpos de "Howell-Jolly".*

*Durante los 30's y 40's se realizaron observaciones de la presencia de estos cuerpos en diversos tejidos luego de ser expuestos a rayos x. Entre estos tejidos se encontraban neuroblastos de saltamontes, meristemos radiculares de cebolla y granos de polen de *Tradescantia*.*

*Estructuras similares fueron descritas en raíces de *Vicia faba* (1951) por Thoday, luego de exposición a rayos X y partículas alfa, llegándose a la conclusión de que eran fragmentos nucleicos (se evitó llamarlos micronúcleos para no confundirlos con el segundo núcleo de los paramecios).*

*Estos fragmentos nucleicos, fueron consistentemente encontrados después de exposición a radiación en células, y se asumió que eran originados de fragmentos acéntricos que fueron excluidos de los núcleos hijos durante los estadios finales de la mitosis. Evans descubrió en 1959, la utilidad de estos cuerpos como marcadores de daño citogenético cuando comparó la eficiencia de neutrones y de rayos gamma en raíces de *Vicia faba*.*

*El avance decisivo de los MN, como sistema de prueba para el efecto genotóxico potencial de agentes químicos o físicos, llegó con el trabajo de Boller y Schmid (también sugirieron por primera vez el nombre de prueba de MN) usando eritrocitos de médula ósea. Poco después, Countryman y Heddle introdujeron linfocitos como otro sistema celular útil, para la detección de daño cromosómico, mediante la determinación de producción de MN y recomendaron usarlos como biomarcadores en diseños experimentales ya que encontraron que, efectivamente, podían servir para detectar daño cromosómico.*

Los MN se originan de fragmentos cromosómicos o de cromosomas completos que no son incorporados en las células hijas al momento de completarse la división celular. Debido a esto, los MN proporcionan una medida del rompimiento y de la pérdida de cromosomas, causadas por la exposición a algún agente genotóxico.

Los MN tienen su origen en alguno de los siguientes eventos:

- Aberraciones cromosómicas que conlleven formación de fragmentos acéntricos.
- Daño a nivel de las proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centrómero inactivado, etc.
- Más recientemente se ha sugerido que también pueden provenir de procesos de amplificación génica (Fenech y Crott, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Los fragmentos acéntricos, o cromosomas completos, forman sus propias membranas nucleares y aparecen como cuerpos capaces de teñirse al igual que el núcleo verdadero. Al microscopio, las células con esta característica se observan como portadoras de un segundo núcleo, mucho más pequeño, situado junto al núcleo principal (Rosin, 1992). Existe un solo tipo de MN, pero muchos tipos diferentes de aberraciones cromosómicas estructurales que pueden dar origen a fragmentos acéntricos capaces de formar MN. En la figura 6 se muestran los principales.

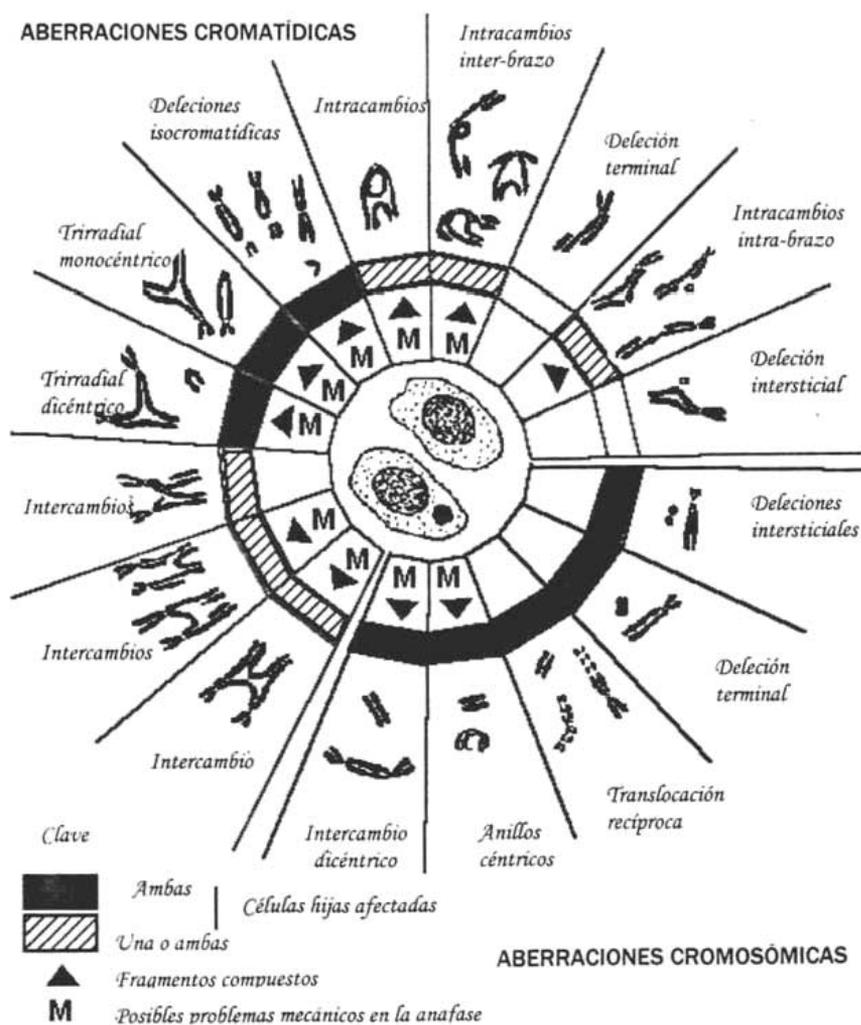


Figura 6. Aberraciones cromosómicas estructurales formadoras de fragmentos acéntricos (modificado de Savage, 2000)

En sus orígenes, la determinación de MN en linfocitos, a pesar de ser relativamente simple y rápida, no fue inmediatamente adoptada por la comunidad científica ya que esta prueba enfrentaba los problemas de multiplicidad de protocolos, y variaciones en sus resultados que impedían la comparación de ellos, más allá del laboratorio que hizo el estudio. Con el tiempo, los protocolos de investigación fueron homogeneizándose, pero la variación en los resultados persistía y no había forma de probar si esas variaciones eran respuesta a la exposición de agentes genotóxicos/citostáticos o a deficiencias metodológicas. Afortunadamente, este problema se resolvió en 1985 con la introducción de la técnica de la determinación de MN por bloqueo de citocinesis (Fenech y Morley, 1985; Savage, 2000).

### **Determinación de MN por bloqueo de citocinesis**

Solo fragmentos cromosómicos acéntricos, o cromosomas completos que por alguna razón se mantienen inmóviles durante la telofase, pueden producir MN. Esto quiere decir que es absolutamente necesario que la célula pase, por lo menos, por un periodo de división celular para que se puedan observar los MN. En aquellas células que no se dividen normalmente, como los linfocitos, es necesario agregar un mitógeno (ej. fitohemaglutinina) y si el agente genotóxico a estudiar provoca inhibición del ciclo celular no se observarán MN (Savage, 2000).

Los fragmentos acéntricos o los cromosomas con centrómero inactivado, se duplicarán durante la fase de síntesis al igual que el resto del genoma, así, si la célula pasa por un segundo periodo de división celular es posible que los MN se dupliquen, lo cual aumentaría la frecuencia observada. No obstante, los MN incluyen información genética que puede ser vital para la supervivencia de la célula y que no esta disponible, así que también es posible que la célula muera. Normalmente, la célula puede dividirse 2 ó 3 veces más antes de que eso ocurra, lo que disminuirá la frecuencia observada de MN, es decir, se *diluyen* con el tiempo (Savage, 2000).

La combinación de ambos fenómenos hace evidente que el momento óptimo, para realizar una cuantificación de la frecuencia de MN, es justo después de que las células hayan concluido su primera división celular. Hacerlo antes mostraría una frecuencia de cero, y hacerlo después podría llevar a

resultados contradictorios, por lo tanto, es necesario contar con un sistema que permita distinguir aquellas células que se han dividido solo una vez (Fenech *et al.*, 1999; Savage, 2000).

Este problema se ha resuelto de varias formas, ya sea utilizando timidina tritiada (que es radiactiva), bromodesoxiuridina (análogo de la timina) y la más frecuente, usando una droga llamada citocalasina-B (Cit-B). Este compuesto es una toxina extraída de un hongo del género *Helminthosporium* y es un potente inhibidor de la polimerización de actina. La actina es necesaria al final de la telofase, durante la citocinesis, para formar el anillo contráctil de actina y miosina que terminará por dividir a la célula en dos células hijas. Así es que, en presencia de citocalasina-B, las células que se han dividido una vez adquieren una apariencia binucleada (Fig. 7). Esta técnica fue ideada por Fenech y Morley en 1985 y desde entonces se ha extendido ampliamente (Fenech y Morley, 1985; Evans, 1997).

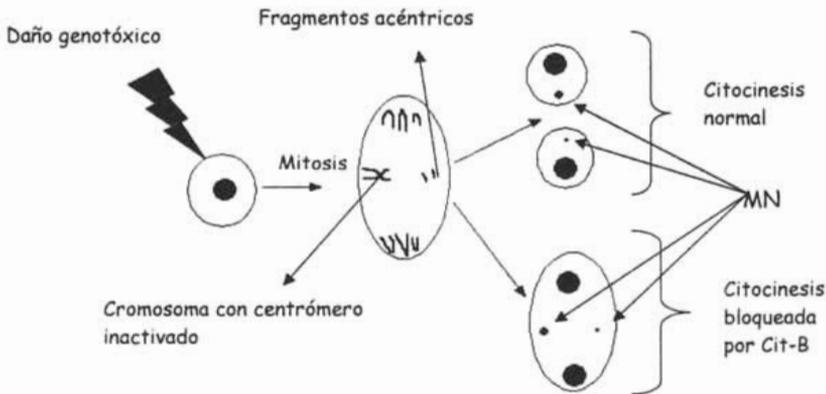


Figura 7. MN provenientes de cromosomas con centrómero inactivado y de fragmentos acéntricos tal como se observarían en ausencia y presencia de citocalasina-B (Cit-B).

Otra ventaja de la técnica de determinación de MN por bloqueo de citocinesis, es que proporciona una medida adecuada de la extensión y progresión de la división nuclear en una población de células en división.

Los linfocitos son células especializadas del sistema inmunológico que han perdido la capacidad de dividirse por sí solas y permanecen en la fase  $G_0$  del ciclo celular. Para que puedan ser utilizadas en la determinación de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis, es necesario estimularlas para que salgan de su estado de reposo. Esto se logra con el uso de mitógenos, que son sustancias capaces de inducir la división celular. El más utilizado de ellos es la fitohemaglutinina (PHA) y está constituida por una proteína y una mucoproteína. Este agente activa receptores de la membrana celular de los linfocitos e induce su transformación a linfoblastos, los cuales sí tienen la capacidad de dividirse. Una hora después de la adición de PHA al medio de cultivo la célula comienza a sintetizar ARN, y 24 horas después ADN. Este proceso puede ser influenciado por numerosos factores externos, pero se ha estimado que los linfocitos tienen un ciclo celular de 24 horas, así que a las 48 horas de haber sido expuestos los linfocitos a la PHA habrán concluido su primera división, y a las 72 habrán completado la segunda. Este proceso ocurre en un escenario ideal donde todas las células comienzan a dividirse al mismo tiempo, pero en la realidad los linfocitos se dividen en tiempos distintos debido a diferencias de tamaño, edad y exposición a agentes tóxicos (Salamanca, 1990; Gersen, 1999).

Así, luego de un cultivo celular de 72 horas se tendrá una colección variada de células que se han dividido una o hasta 2 veces, y algunas que no lo hayan hecho. Bajo la influencia de la citocalasina-B el número de núcleos presentes muestra cuantas veces se ha dividido una célula. Un núcleo indica que la célula no se dividió, dos que se dividió una vez y 4 núcleos que se dividió en 2 ocasiones (a veces se pueden observar 3 núcleos, señal de que uno de ellos se dividió 2 veces y el otro solo una, pero para efectos de contabilización se considera que estas células también se han dividido en 2 ocasiones). Esta información permite analizar si el ciclo celular ha sido alterado de alguna forma y esto se logra midiendo la frecuencia de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas en un tiempo dado (regularmente a las 72 h en el caso de linfocitos, aunque varía dependiendo de la línea celular de que se trate). Así, una proporción elevada de células mononucleadas con respecto a un testigo indicaría un efecto citostático del agente estudiado, o una frecuencia elevada de células multinucleadas indicaría un ciclo celular acelerado (Suralles *et al.*, 1995; Fenech, 2000).

Para conocer la progresión del ciclo celular, se han diseñado un par de índices que permiten conocer, con base en las frecuencias de los distintos tipos celulares, si éste ha sido afectado de alguna manera.

- **Índice de división nuclear**: que proporciona el promedio de núcleos por célula.

$$\text{IDN} = (\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})) / \text{número total de células}$$

- **Índice de bloqueo de la proliferación de la citocinesis**: que suministra el promedio de divisiones celulares completas por célula.

$$\text{IBPC} = (\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3} + \text{M4})) / \text{número total de células}$$

Donde M1 indica la cantidad de células mononucleadas, M2 binucleadas, M3 trinucleadas y M4 tetranucleadas (Kirsh-Volders *et al.*, 2003).

El cálculo de estos índices proporciona información importante acerca de la influencia en el ciclo celular de algún agente en particular, ya sea que lo acelere, retrase, detenga o no le haga nada; con la ventaja de que puede hacerse al mismo tiempo que la determinación de la frecuencia de MN. Se ha comprobado experimentalmente que en personas sanas, no expuestas a sustancias tóxicas, los valores obtenidos con estos índices son muy cercanos a 2 o incluso un poco mayores. Valores inferiores indican retraso y superiores aceleración del ciclo celular (Surrallés *et al.*, 1995; Albertini *et al.*, 2000).

Más recientemente, la técnica de determinación de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis, se ha visto complementada con marcaje inmunoquímico de los cinetocoros e hibridación con sondas centroméricas/teloméricas específicas, que han permitido determinar si los MN provienen de fragmentos acéntricos o de cromosomas completos, es decir, permite distinguir entre efectos clastogénicos y aneugénicos (Marshall *et al.*, 1996).

Por las facilidades implicadas, y por la información obtenida, se ha ido extendiendo la determinación de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis y cada vez más laboratorios la implementan como

rutinaria para determinar las propiedades mutagénicas de diversos agentes químicos; tanto que se ha formado el proyecto HUMN (HUMAN MicroNucleus Project), que es un esfuerzo internacional para coleccionar datos de frecuencias de micronúcleos en diferentes poblaciones humanas y de distintos tipos de células, además de la cooperación para el diseño y la utilización de protocolos comunes y homogéneos (Fenech *et al.*, 1999; Kish-Volders *et al.*, 2003).

Aunque es indudable el valor de esta prueba para obtener información acerca de las propiedades genotóxicas o aneugénicas de un compuesto en particular, su utilidad como predictor de un posible desarrollo carcinogénico permanece en duda. Se ha determinado que las aberraciones cromosómicas juegan un papel importante en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, y parecería claro que los MN, al provenir de este tipo de daño a los cromosomas, deberían mostrar un comportamiento similar, pero las investigaciones no han sido concluyentes debido a la escasez de estudios prospectivos a largo plazo que pudieran mostrar una asociación entre una frecuencia elevada de MN y la aparición del cáncer (Albertini *et al.*, 2000).

Hasta el momento y gracias al esfuerzo del grupo HUMN, que ha recolectado datos de numerosos laboratorios en todo el mundo y analizado de entre ellos a aquellos pacientes que presentaron cáncer en algún momento de su vida, se ha determinado la incidencia y la mortalidad relativas debidas a cáncer asociadas con la frecuencia de MN.

El cuadro 1 muestra la asociación que existe entre las personas que desarrollaron cáncer a lo largo de diversos estudios prospectivos (total de 5359 personas de 15 laboratorios diferentes de 6 países), con la frecuencia de MN agrupados en tertiles (bajo, medio y alto). En cuanto a incidencia, se observa que aquellas personas con frecuencias media y alta de MN presentaron una proporción ligeramente mayor de casos de cáncer, cuando se compararon con las personas que tuvieron una frecuencia baja. Mientras que para el caso de mortalidad la situación se invierte, y se observó un número mayor de muertes, debidas a cáncer, entre las personas con frecuencia baja de MN que entre aquellas que tenían una frecuencia mayor. Estos resultados muestran que se requieren más estudios para determinar con seguridad, si la frecuencia elevada de MN es un indicativo confiable de una aparición futura de cáncer (Bonassi, 2003).

**Cuadro 1. Incidencia y mortalidad relativas debido a cáncer asociadas con la frecuencia de MN (Tomado de Bonassi, 2003b).**

<b>Frecuencia de MN</b>	<b>Incidencia relativa (IC 95%)</b>		<b>Mortalidad relativa (IC 95%)</b>	
	<b>#</b>		<b>#</b>	
<b>Baja</b>	63	1.00	52	1.00
<b>Media</b>	62	1.20 (0.93-1.85)	37	0.98 (0.60-1.55)
<b>Alta</b>	65	1.31 (0.94-1.78)	40	0.86 (0.61-1.20)

Es evidente que la información obtenida por la prueba de micronúcleos es menor que la lograda a través del método tradicional de aberraciones cromosómicas (AC). La presencia de micronúcleos indica que hubo daño cromosómico, pero no de que tipo, ni que cromosomas estuvieron involucrados. Sin embargo, posee otras ventajas que no deben ser pasadas por alto:

- Las características del micronúcleo están bien definidas, lo cual reduce el tiempo de observación y el efecto de la subjetividad inherente al observador, que es causa de errores en la técnica de AC.
- Se puede contabilizar mayor cantidad de células en el mismo intervalo de tiempo lo cual aumenta el poder estadístico de la prueba.
- La prueba esta sujeta a menor posibilidad de errores en la manipulación que la técnica de AC, donde la pérdida de unos pocos cromosomas imposibilita la contabilización de células.
- Permite observar de manera paralela y simultánea rompimientos/pérdidas de cromosomas, posibles retrasos mitóticos, anormalidades nucleares como puentes nucleoplásmicos y apoptosis y aunado a pruebas de FISH permite detectar fenómenos de no-disyunción.
- Existe correlación del 88 %, entre los resultados obtenidos con ambas pruebas, cuando se usan para analizar los mismos agentes genotóxicos.
- La prueba es aceptada por organismos de regulación, tales como el Comité Inglés de Mutagenicidad de Químicos en Alimentos, Productos de Consumo y Ambiente; la Sociedad de Toxicología Genética Francesa; y la Organización Mundial de la Salud a través de su Programa

Internacional de Seguridad Química (Albertini y Kirsch-Volders, 1997; Albertini *et al.*, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

En conclusión, la determinación de MN es una prueba idónea cuando se quiere conocer la medida en la que un posible agente inductor de efectos genotóxicos ocasiona rompimientos o pérdidas cromosómicas. Si se requiere información más detallada, como la identidad de los cromosomas involucrados o la existencia de otro tipo de rearrreglos, el análisis tradicional de aberraciones cromosómicas es el indicado.

## ANTECEDENTES

### Micronúcleos (MN) en fumadores

La relación entre la aparición de MN y el consumo de tabaco ha sido estudiada desde mediados de los años 80 hasta la fecha, ya sea con la intención de medir su efecto directo en la frecuencia de MN o con el objetivo de descartar algún efecto de confusión en estudios de otros posibles agentes genotóxicos, pero hasta el momento, los resultados encontrados han sido bastante contradictorios y controvertidos.

Entre los estudios publicados que evaluaron directamente el efecto del humo de tabaco sobre la inducción de MN en personas sanas, utilizando la técnica de bloqueo de proliferación de la citocinesis, están los de Tomanin *et al.* (1991), Au *et al.* (1991) y Holmen *et al.* (1995). En los 3 casos se encontró un incremento significativo, sólo que en el último estudio el aumento estuvo restringido a la subpoblación celular T8 de linfocitos.

Las investigaciones que determinaron el posible efecto confusor del humo de tabaco y encontraron un efecto positivo, son las de Cheng *et al.* (1996) y Duffaud *et al.* (1999). Ambos trabajos se enfocaron en personas que padecían cáncer (pulmonar y de cuello, respectivamente) y detectaron el incremento significativo en los pacientes enfermos que fumaban (primer caso) y en los testigo sanos *que fumaban* (segundo caso). Zhao *et al.* (1998) describieron el efecto de la contaminación atmosférica y Lohani *et al.* (2002) el efecto del asbesto, y en ambos grupos se observó que las personas fumadoras presentaron una frecuencia mayor de MN sin importar si habían estado expuestas o no a la contaminación o al asbesto.

Por el contrario, los estudios publicados que no reportaron una diferencia entre la frecuencia de micronúcleos de fumadores y no-fumadores son aun más numerosos. Entre las investigaciones que evaluaron el posible efecto genotóxico del humo de tabaco se tienen a Surralles *et al.* (1997) y Barale *et al.* (1998). Los primeros no encontraron diferencias significativas y los segundos reportaron un *decremento* significativo.

Los siguientes estudios analizaron el posible efecto confusor del humo de tabaco y no encontraron diferencias entre los que fumaban y los que no lo hacían: Buckvic *et al.* (1998) evaluando el daño genotóxico en empleados de estaciones de gasolina; Calvert *et al.* (1998) investigando las consecuencias provocadas por el bromuro de metilo; Burgaz *et al.* (1999) determinaron el impacto negativo de la ciclofosfamida; Pitarque *et al.* (1999) estudiando el efecto nocivo de trabajar en el aeropuerto de Barcelona; Lucero *et al.* (2000) evaluando las propiedades tóxicas de algunos pesticidas; Maluf *et al.* (2000) reportando el deterioro en la salud de médicos y enfermeras expuestos a drogas antineoplásicas y Palus *et al.* (2003) cuantificando el efecto genotóxico del cadmio y del plomo. Todos estos autores concluyeron que los sujetos estudiados, cuando fueron expuestos al humo de tabaco, no presentaron diferencias en las frecuencias de MN al compararlas con sus correspondientes testigos. Por último, Falck *et al.* (1999) al trabajar con pesticidas, encontraron en su grupo de testigos *que fumaban* un decremento en la frecuencia de MN, cuando los comparaban con sus testigos *que no fumaban*, a pesar de que también reportaron aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas que dan origen a MN.

Una posible explicación para los resultados contradictorios obtenidos en estos estudios, provino de Bonassi *et al.* (2003). Ellos publicaron un estudio en el que evaluaron y reanalizaron (meta-análisis) los resultados relacionados con la frecuencia de MN en linfocitos y tabaquismo reportados por diversos investigadores. La suma de todos esos estudios dio un total de 5710 personas evaluadas, de las cuales 1409 eran fumadores activos y 800 antiguos fumadores; encontrando que los fumadores ligeros (de hasta 19 cigarrillos diarios) mostraron una disminución en la frecuencia de MN, los moderados (de 20 a 29) un incremento no significativo y la única subpoblación que sí expresó un aumento significativo fue la de fumadores intensos, quienes fumaron 30 cigarrillos diarios o más. *sólo cuando no habían sido expuestos previamente a agentes genotóxicos*, de lo contrario no se observó ese incremento.

En cuanto a modelos animales, los resultados reportados han sido más consistentes y se ha demostrado en ratones que el humo de tabaco induce MN en médula ósea, eritrocitos de sangre periférica y en macrófagos alveolares (DeMarini, 2004).

### Micronúcleos (MN) en fumadores pasivos

Existe poca información con respecto a la posible inducción de MN en fumadores pasivos. Solo se tiene conocimiento de un estudio que haya medido su frecuencia en linfocitos de personas expuestas a humo de tabaco ambiental (ETS) y fue realizado por Baier *et al.* (2002). La investigación se enfocó en niños entre 2 y 15 años con padres fumadores y encontraron un incremento significativo en ellos, comparado con sus correspondientes testigos. También se han analizado en otros tejidos y no se ha encontrado un incremento de MN en células de epitelio urinario de fumadores pasivos (Burgaz *et al.*, 1995), y por el contrario, en vellosidades coriónicas de mujeres embarazadas, con esposos fumadores, sí se reportó un promedio mayor de MN (Cui *et al.*, 1990).

Con respecto a modelos animales, no se ha probado la relación del humo de tabaco con la frecuencia de MN en linfocitos; pero en eritrocitos de médula ósea de ratón, en condiciones de exposición similares a las de un fumador involuntario, se reportó un aumento significativo de MN (Mohtashamipur *et al.*, 1987; Stoichev *et al.*, 1993), así como en ratas expuestas durante 28 días a una mezcla de humo lateral (85 %) y principal (15 %), observándose una clara inducción de MN en células de la médula ósea (Husgafvel-Pursiainen, 2004).

### Índices de división nuclear y de bloqueo de la proliferación de la citocinesis

Han sido pocos los estudios que han incluido estas variables. Palus *et al.* (2003) utilizaron el índice de división nuclear (IDN) y no encontraron diferencia entre el grupo de fumadores y sus testigos. Pitarque *et al.* (1999) emplearon el índice de bloqueo de proliferación de la citocinesis (IBPC) y reportaron un ligero decremento no significativo en el grupo de fumadores. Estos autores también evaluaron el efecto de fumar en conjunción con la exposición a otros agentes tóxicos (cadmio, plomo y contaminación producida en aeropuertos) y en general no encontraron diferencias entre los grupos

considerados con sus testigos, mientras que Pastor y colaboradores (2002) sí reportaron un decremento del índice de bloqueo de proliferación de la citocinesis causado por el tabaco.

### Nicotina y cotinina

La conjunción del análisis de MN en linfocitos de sangre periférica y la determinación de nicotina no se ha realizado aún, sin embargo, intentos parecidos se han llevado a cabo. Lee et al. (1990) estudiaron el efecto genotóxico de humo de tabaco en ratas, expuestas durante 90 días, y midieron el contenido de nicotina en plasma para verificar la ingesta de humo. No encontraron efecto genotóxico en células de médula ósea (micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas o aberraciones cromosómicas) y no intentaron correlacionar ambos valores.

Nersessian et al. (1994) llevaron a cabo un estudio similar donde analizaron los efectos genotóxicos de 10 tipos diferentes de cigarrillos, de países de Europa oriental, y encontraron que producían un fuerte incremento en la presencia de MN en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratones. Además de concluir que los cigarrillos americanos son menos clastogénicos, también reportaron una fuerte correlación entre los contenidos de nicotina y alquitrán en plasma con la frecuencia de MN.

En cuanto a si esta correlación se debe a un efecto genotóxico de la nicotina per se o es un reflejo de la cantidad de humo de tabaco a la que se ha sido expuesto, se ha determinado lo siguiente:

Badr et al. (1997) encontraron que valores de 80 mg y 500 mg de nicotina (por kg de peso), administrados oralmente, aumentaban la frecuencia de MN en células de médula ósea, tanto en ratones infectados con *Schistosoma mansoni*, como en ratones sin infectar. Dosis más bajas de nicotina (1-2 mg/kg de peso) no mostraron ser clastogénicas mediante la prueba de MN en linfocitos (Adler et al., 2003). Doolittle et al. (1995) evaluaron la actividad genotóxica de la nicotina y de la cotinina mediante los ensayos de Ames y de ICH en células de criceto chino y no encontraron efectos genotóxicos.

En concentraciones altas, en células de ovario de criceto chino (similares a las encontradas cuando se mastica goma de mascar con nicotina), la nicotina indujo un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (Trivedi et al., 1990, 1993).

En México, los estudios que se han realizado en torno al fenómeno del tabaquismo son principalmente de tipo epidemiológico y han dado evidencia de que los daños a la salud por uso de tabaco tienen una clara relación con el aumento de morbilidad y mortalidad (Secretaría de Salud, 2001). En cuanto a estudios que evalúen daño al ADN en fumadores, existen pocas referencias y el método aplicado es el de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa (Rojas et al., 1996). Esto quiere decir que no existen estudios hechos en México que evalúen el efecto genotóxico causado por el humo de tabaco usando la técnica de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.

En el apéndice se muestran los cuadros 16, 17 y 18 con algunos de los valores publicados por diversos autores para micronúcleos totales (MN tot), células binucleadas con micronúcleos (BN con MN), índices de división nuclear (IDN) e índices de bloqueo de proliferación de la citocinesis (ICBP); reportados tanto para fumadores como para personas expuestas a otros agentes genotóxicos.

## **JUSTIFICACIÓN**

El tabaquismo es un hábito nocivo practicado por gran parte de la población mundial y a pesar de ello existen en México pocos estudios enfocados a evaluar el daño al ADN provocado por el humo de tabaco. La técnica de determinación de micronúcleos por bloqueo de la proliferación de la citocinesis es una herramienta diseñada para la detección de daño genotóxico y que no ha sido implementada todavía en estudios de tabaquismo en México. además, dentro de los amplios conocimientos que se tienen respecto a este fenómeno, existen aspectos poco estudiados todavía, como la inducción de micronúcleos provocada por la exposición al humo de tabaco ambiental y su posible correlación con los contenidos de nicotina y cotinina, en humanos. Por lo anterior, el presente estudio contribuirá a ampliar el conocimiento existente sobre los efectos del tabaquismo en México.

## HIPÓTESIS

El humo de tabaco es una mezcla compleja de más de 4000 compuestos químicos, y casi un centenar de ellos tienen conocidas propiedades genotóxicas capaces de inducir la formación de MN y reducir la proliferación celular, por ello se espera que al evaluar la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica de fumadores se presente una frecuencia mayor de MN, principalmente en aquellos que fuman más de 30 cigarrillos diarios (fumadores intensos), comparados con sus correspondientes testigos. Para los fumadores pasivos se espera una frecuencia de MN significativamente mayor que la que presentan sus correspondientes testigos, aunque menor a la encontrada en los fumadores activos. Asimismo, se espera un retraso en el ciclo celular de los fumadores activos y pasivos, respecto a sus testigos y una correlación evidente entre estos efectos (retraso del ciclo celular y frecuencia de MN) y el contenido de nicotina y cotinina encontrado en la orina.

## OBJETIVOS

### ***Objetivo general:***

Evaluar el efecto genotóxico en fumadores activos y pasivos que habitan en la Ciudad de México, mediante la determinación de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica y su correlación con los biomarcadores de exposición: nicotina y cotinina.

### ***Objetivos particulares:***

1. Determinar la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de fumadores activos y pasivos.
2. Determinar la afectación del ciclo celular en los fumadores activos y pasivos mediante los índices de división nuclear y de bloqueo de la proliferación de la citocinesis.

3. Determinar la presencia y la concentración de nicotina y cotinina en orina de los sujetos de estudio y evaluar posibles diferencias entre ellos.
4. Correlacionar la cantidad de micronúcleos e índices de afectación del ciclo celular con los niveles de nicotina y cotinina registradas para cada uno de los grupos evaluados.
5. Comparar estos resultados con los de otros estudios e indicar si los valores encontrados en los sujetos de la Ciudad de México son significativamente mayores, menores o similares.

## MÉTODO

### 1.0 Grupos de estudio

Para la realización del análisis experimental, se contó con la colaboración voluntaria de 84 personas divididas en las siguientes categorías:

#### 1.1 Fumadores activos

Este grupo estuvo constituido por 32 fumadores, la mayoría provenientes de la Clínica Antitabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) que deseaban comenzar un tratamiento para dejar de fumar, aunque cabe aclarar que aún fumaban al momento de tomar las muestras. De estas personas 18 fueron mujeres y 14 hombres. Su promedio de edad ( $\pm$  desviación estándar) fue de  $47.38 \pm 12.97$  años con un intervalo de edades de 23 a 74 años. Su consumo de cigarrillos diarios fue de  $21.97 \pm 10.73$  con un intervalo de 5 a 60 y en promedio llevaban  $27.91 \pm 13.10$  años fumando con un intervalo de 4 a 60 años.

Para participar en el estudio se buscó un consumo mínimo de 5 cigarrillos diarios por más de 1 año.

#### 1.2 Fumadores pasivos

Este grupo quedó constituido por 20 personas: 10 hombres y 10 mujeres. 8 integrantes de este grupo fueron trabajadores del bar *La Cuija* y el resto amigos y conocidos de diversos lugares. Su edad promedio fue de  $24.55 \pm 6.99$  años con un intervalo de 17 a 44 años. Estuvieron expuestos al humo de tabaco  $4.8 \pm 2.5$  días de la semana en promedio, con un intervalo de 2 a 7; y de esos días estuvieron en contacto con humo de tabaco  $7.55 \pm 2.32$  horas diarias, con un intervalo de 4 a 12. Finalmente, estuvieron expuestos durante  $9.12 \pm 10.4$  años en promedio, con un intervalo de 1 a 35 años.

Para seleccionar a los fumadores pasivos que participaron en el estudio, se siguieron los criterios propuestos por Hansen *et al.* (2001), quienes sugirieron que el tiempo de exposición al humo de tabaco fuera como mínimo de 4 horas diarias.

### 1.3 Grupo testigo

Quedó integrado por 32 personas: 18 mujeres y 14 hombres, entre familiares, amigos y conocidos diversos, con un promedio de edad de  $47.68 \pm 13.19$  años dentro de un intervalo de 17 a 75.

Para seleccionar a los integrantes de este grupo se consideraron las siguientes características: personas no fumadoras y no expuestas al humo de tabaco en el hogar y el trabajo; de edades y sexos similares a los de los grupos a evaluar para evitar influencia desigual en los resultados (Albertini *et al.*, 2000).

Se verificó que todos los participantes de los 3 grupos no estuvieran consumiendo medicamentos al momento de tomar las muestras, que no fueran alcohólicos y que no trabajaran de manera habitual con agentes genotóxicos conocidos. Se les explicó en que consistiría el estudio y se les solicitó su autorización para participar en él.

## 2.0 Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre periférica y de orina de cada participante seleccionado de la siguiente manera:

- 3 ml de sangre periférica, colectada directamente en tubos Vacutainer® heparinizados de 7 ml. para el estudio de MN.
- 9 alícuotas de 1.5 ml de la primera orina de la mañana, almacenada en tubos Eppendorf®, los cuales se mantuvieron a  $-70$  °C hasta el momento de hacer el análisis de nicotina y cotinina.

## 3.0 Determinación de MN en linfocitos de sangre periférica mediante bloqueo de la citocinesis

### 3.1 Cultivo de linfocitos

Una vez tomada la muestra de sangre, ésta se transportó inmediatamente al laboratorio. Bajo condiciones estériles se agregaron 400  $\mu$ l de sangre en un tubo de cultivo conteniendo 4.5 ml de medio

de cultivo (RPMI 1640) adicionado con fitohemaglutinina al 4 %, previamente esterilizado a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ . Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los sujetos de estudio.

Posteriormente, los tubos se colocaron en una incubadora a 37 °C. A las 44 h de cultivo se les agregó citocalasina-B estéril hasta obtener una concentración final de 6  $\mu\text{g/ml}$ . Los tubos se incubaron de nuevo por 28 h más para hacer un total de 72 h.

Una vez pasado ese tiempo, se retiraron los tubos de la incubadora, se resuspendió el botón y se procedió a centrifugarlos a 1500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron en un agitador rotatorio, a velocidad moderada, mientras se les adicionaban 8 ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M a 4 °C. Los tubos se mantuvieron en reposo 3 minutos.

### *3.2 Prefijación*

Después de los 3 minutos con el KCl, se adicionaron lentamente a cada tubo 4 gotas de fijador frío (metanol-ácido acético 3:1). Se agitaron levemente y se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron de nuevo a 1500 rpm durante 10 minutos.

### *3.3 Fijación*

Se eliminó el sobrenadante y nuevamente se colocaron los tubos en el agitador rotatorio, al mismo tiempo que se les adicionaban 10 ml de fijador frío. Se centrifugaron una vez más a 1500 rpm durante 10 minutos y se repitió el procedimiento hasta que el botón celular estuvo limpio.

### *3.4 Preparación de laminillas*

Se resuspendió el botón celular en 1.5 ml del sobrenadante conservado y se dejó caer mediante goteo sobre varios portaobjetos libres de grasa, desde una altura aproximada de 10 cm y se dejaron secar al aire.

### 3.5 Tinción con reactivo de Schiff

Se colocaron las laminillas en cajas de Koplín con agua destilada a temperatura ambiente durante 10 min. después se introdujeron en otra caja de Koplín con ácido clorhídrico 1N a temperatura ambiente durante 10 min más. Posteriormente, las laminillas fueron transferidas a otra solución de HCl 1N a 60 °C por 10 min y luego fueron enjuagadas en agua destilada y se dejaron secar al aire.

Una vez secas, se acomodaron las laminillas dentro de una caja de Koplín conteniendo el reactivo de Schiff (fucsina leucobásica) durante 1.5 h. Este colorante reacciona con los grupos aldehído de la desoxirribosa tiñéndolos de color rosa, por lo que el ADN del núcleo y los MN toman ese color. Por último, éstas se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire.

A continuación, las laminillas se sumergieron en una solución de verde rápido (fast-green) al 1 % durante 30 segundos (éste es un colorante de contraste que tiñe la membrana celular y el citoplasma de color verde). Por último se hicieron 4 lavados consecutivos con etanol para eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar al aire.

Las laminillas fueron reetiquetadas por otra persona utilizando claves desconocidas para el observador con el fin de evitar la influencia de posibles prejuicios al momento del registro.

### 3.6 Examen microscópico

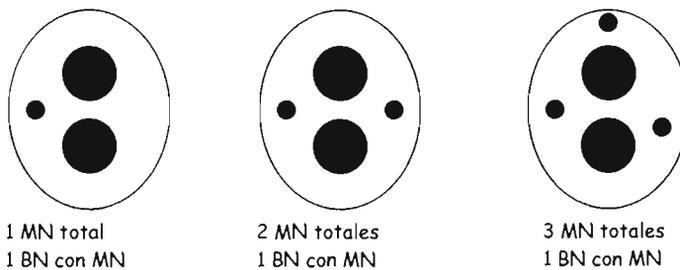
- Se observaron 1 000 células binucleadas por paciente, a 600 aumentos (ocular 15X y objetivo 40X) y se contabilizaron los micronúcleos de acuerdo con los siguientes criterios de identificación.

#### Criterios para MN

- Morfológicamente idénticos al núcleo principal.
- El diámetro debe encontrarse entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal.
- Son no-refráciles y pueden ser distinguidos fácilmente de contaminantes presentes (como residuos de colorante).
- No están enlazados o conectados al núcleo principal.

- Pueden tocar, pero no sobrelaparse con el núcleo principal, y tanto las membranas nucleares del MN como del núcleo deben ser claramente diferenciables.
- Usualmente presentan la misma intensidad de tinción que el núcleo principal, pero ocasionalmente la tinción puede ser más intensa (Fenech *et al.*, 2000; HUMN 2001).

Los micronúcleos (MN) se reportaron de 2 maneras diferentes: micronúcleos totales (MN tot.) y células binucleadas con micronúcleos (BN con MN). Para el primer caso (MN tot.) se contabilizaron todos los MN observados y se dividieron entre el número de células contabilizadas (1000). Para las células binucleadas con micronúcleos (BN con MN) se buscaron las células binucleadas y sin importar cuantos MN tuvieran se contabilizaban como una unidad. Lo anterior se muestra en la figura 8



**Figura 8. Diferencia entre MN totales y BN con MN**

Se realizó la cuantificación (MN tot. y BN con MN) de ambas maneras, con el fin de comparar los resultados obtenidos con los reportados en otros estudios, ya que no todos los trabajos de investigación emplean la misma forma de contar micronúcleos.

- Adicionalmente, se observaron 500 células más por individuo, en las que se contabilizaron la cantidad de células con un núcleo, dos núcleos, tres núcleos y cuatros núcleos. Esto con objeto de calcular los índices de división nuclear y de bloqueo de la proliferación de la citocinesis de acuerdo con las siguientes fórmulas:

- **Índice de división nuclear:** que proporciona el promedio de núcleos por célula.

$$IDN = (M1+2(M2) + 3(M3) +4 (M4))/\text{número total de células}$$

- **Índice de bloqueo de la proliferación de la citocinesis :** que suministra el promedio de divisiones celulares completas por célula.

$$IBPC = (M1+2(M2)+3(M3+M4))/\text{número total de células}$$

Donde M1 indica la cantidad de células mononucleadas, M2 binucleadas, M3 trinucleadas y M4 tetranucleadas (Kirsh-Volders *et al.*, 2003).

En la figura 9, se pueden observar microfotografías de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas y micronúcleos.

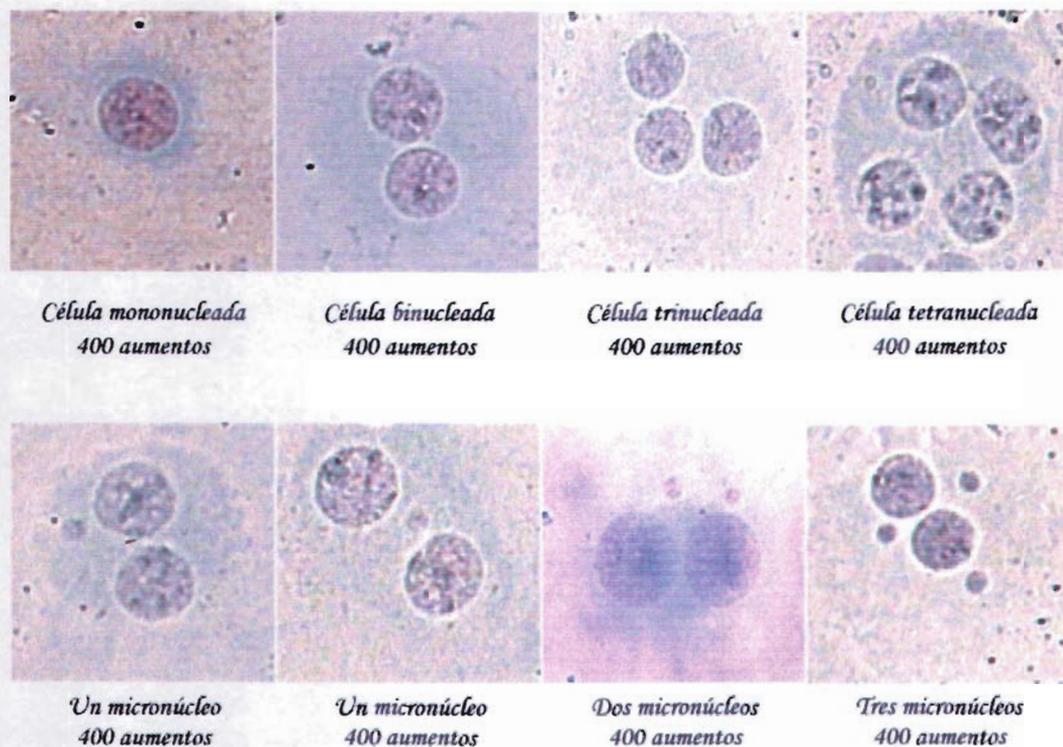


Figura 9. Microfotografías de células multinucleadas y células binucleadas con micronúcleos

## **4.0 Determinación y cuantificación de nicotina y cotinina en muestras de orina**

### **4.1 Extracción de nicotina y cotinina**

Dos mililitros de cada muestra de orina fueron transferidos a un tubo Toxi-Lab A® (que contiene una mezcla de disolventes y sales amortiguadoras que aseguran una extracción óptima) y mezclados por 5 min utilizando un agitador en rotación. Posteriormente, se centrifugaron a 3100 g (3955 rpm) por 10 min. La fase orgánica fue transferida a un matraz volumétrico clase A de 2 ml, se le adicionaron 50 µL de metanol acidificado (0.1 % HCl en metanol) para prevenir la evaporación excesiva de los compuestos y se sometió a una corriente de nitrógeno para reducir su volumen a la mitad. Simultáneamente se agregó 1 ml de una mezcla de disolventes (diclorometano, hexano, butanol 1:1:1) al tubo Toxi-Lab A®, con el fin de aumentar el porcentaje de recobro de los compuestos. Se centrifugó nuevamente a 3100 g 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 dos estándares internos y se redujo el volumen final a 2 ml por medio de la corriente de nitrógeno, esto para 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.

### **4.2 Curvas de calibración**

Se prepararon curvas de calibración para nicotina y para cotinina con un intervalo de concentración de 1 a 5000 ng/ml para la primera y de 1 a 10000 ng/ml para la segunda, manteniendo las concentraciones de nicotina-d3 en 980 ng/ml y de cotinina-d3 en 990 ng/ml. El coeficiente de correlación para ambas curvas fue de 0.998 ( $p < 0.01$ ).

### 4.3 Análisis cromatográfico

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

La columna capilar fue una 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, 87 y 165 m/z para nicotina-d<sub>3</sub>, 98 y 176 m/z para cotinina y 101 y 179 m/z para cotinina-d<sub>3</sub>. Los primeros iones de cada compuesto fueron utilizados para la cuantificación por el método de estándar interno. El gas acarreador empleado fue helio de ultra alta 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 30s 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 nicotina y 88% para cotinina y los límites inferiores de cuantificación fueron de 10 ng/ml para nicotina y 100 ng/ml para cotinina.

En el apéndice se muestran ejemplos de cromatogramas (figura 11) y espectros de masas obtenidos mediante esta técnica (figuras 12 y 13).

### 5.0 Análisis estadístico

Dado que los resultados obtenidos no se ajustaron a una distribución de tipo normal, se requirió usar de las prueba no-paramétricas U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas entre ellos. Asimismo, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para corroborar si existía relación entre la frecuencia de MN tot, células BN con MN, IDN e IBPC, con los niveles de nicotina y cotinina. Los datos se analizaron con el programa estadístico MINITAB ver. 13.2.

## RESULTADOS

### *Variaciones intergrupales en la frecuencia de MN y afectación del ciclo celular*

#### *Fumadores activos*

El grupo de fumadores activos estuvo constituido por 32 personas, 14 hombres y 18 mujeres. Su promedio de edad fue de 47.3 años con una desviación estándar de 12.9 años. El grupo de testigos con el que fue comparado también consistió de 32 personas, 14 hombres y 18 mujeres con un promedio de edad de 47.7 años y una desviación estándar de 13.2 años.

El efecto genotóxico encontrado en los sujetos evaluados, expresado mediante el número de MN totales presentes, células binucleadas con micronúcleos (BN con MN), así como la afectación del ciclo celular mediante el empleo de los índices de división nuclear (IDN) e índice de bloqueo de proliferación de la citocinesis (IBPC) se encuentra resumido en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Diferencias encontradas entre los fumadores activos respecto a sus testigos, para cada uno de los parámetros evaluados<sup>a</sup>**

	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Activos</b>	32	8.81 ± 6.59 ***	9.94 ± 7.44 ***	1.69 ± 0.27 ***	1.63 ± 0.22 **
<b>Testigos</b>	32	16.25 ± 7.85	17.31 ± 8.76	1.48 ± 0.25	1.44 ± 0.21

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando la prueba U de Mann-Whitney

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.001

Como se observa en el cuadro 2, el grupo de fumadores activos presentó un promedio significativamente menor de MN totales y de células BN con MN, cuando se comparó con el grupo testigo, así como un ciclo celular más rápido expresado en forma de valores más altos del IDN e IBPC, que los testigos.

Con objeto de profundizar más en el análisis, 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 el cuadro 3.

**Cuadro 3. Diferencias encontradas entre los fumadores activos y testigos de acuerdo a subgrupos de sexo y edad<sup>a</sup>**

	Grupo	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Mujeres</b>	Activos	18	10.44 ± 7.92 *	12.17 ± 8.72 *	1.66 ± 0.23 ***	1.61 ± 0.19 ***
	Testigos	18	16.50 ± 8.56	18.06 ± 9.73	1.41 ± 0.20	1.37 ± 0.17
<b>Hombres</b>	Activos	14	6.71 ± 3.60 ***	7.07 ± 4.10 ***	1.73 ± 0.32	1.65 ± 0.25
	Testigos	14	15.93 ± 7.13	16.36 ± 7.59	1.58 ± 0.27	1.53 ± 0.23
<b>23-40 años</b>	Activos	10	7.70 ± 5.06	8.70 ± 5.77	1.66 ± 0.33	1.60 ± 0.27
	Testigos	10	14.90 ± 10.65	16.60 ± 12.27	1.55 ± 0.27	1.50 ± 0.22
<b>41-57 años</b>	Activos	16	8.75 ± 5.79***	10.13 ± 6.74**	1.71 ± 0.24*	1.65 ± 0.20*
	Testigos	16	18.25 ± 6.80	19.19 ± 7.40	1.52 ± 0.21	1.48 ± 0.18
<b>58-73 años</b>	Activos	6	10.83 ± 10.72	11.50 ± 11.86	1.68 ± 0.24*	1.62 ± 0.19*
	Testigos	6	10.83 ± 3.92	11.33 ± 4.37	1.37 ± 0.27	1.34 ± 0.23

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando la prueba U de Mann-Whitney

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.001

Como se indica en el cuadro 3, tanto mujeres como hombres fumadores presentaron frecuencias menores de células BN con MN y de MN totales que sus testigos. En cuanto al ciclo celular, se detectó que las mujeres fumadoras exhibieron un promedio mayor en los valores de ambos índices (IDN e IBPC) que sus testigos, señal de un menor retraso en el ciclo celular de las fumadoras. Los hombres fumadores activos no mostraron diferencias significativas en estos índices (IDN e IBPC) cuando fueron comparados con sus testigos.

Dado que el intervalo de edad de los integrantes del grupo de los fumadores activos es amplio (23 a 74 años) se decidió separarlos en tres subgrupos de edad. Los resultados indicaron que las personas menores de 23 a 40 años de edad (fumadores y testigos) no difirieron significativamente entre sí en ninguno de los parámetros evaluados. El subgrupo de personas fumadoras de 41 a 57 años sí mostró disminuciones significativas en MN tot y BN con MN y aumentos significativos en IDN e IBPC, cuando se compararon con sus correspondientes testigos; y el subgrupo de 58 a 73 solo mostró diferencias en los índices (IDN e IBPC), siendo estos significativamente mayores en los fumadores.

Finalmente, el análisis del grupo de fumadores activos concluyó con la evaluación del subgrupo de fumadores de más de 30 cigarrillos diarios, y los resultados se muestran en el cuadro 4. Este subgrupo presentó la misma tendencia general del grupo fumador, es decir, con diferencias significativamente menores en la cantidad de células BN con MN y MN totales, y promedios significativamente mayores en el IDN e IBPC, respecto a los testigos.

**Cuadro 4. Diferencias encontradas entre el subgrupo de fumadores intensos (>30 cigarrillos diarios) con sus testigos<sup>a</sup>**

	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Activos</b>	12	9.92 ± 8.59**	11.75 ± 9.96*	1.75 ± 0.22***	1.68 ± 0.18***
<b>Testigos</b>	12	16.25 ± 5.38	17.17 ± 5.78	1.38 ± 0.18	1.35 ± 0.16

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando la prueba U de Mann-Whitney

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.001

### Fumadores Pasivos

El grupo de fumadores pasivos estuvo conformado por 20 personas, 10 hombres y 10 mujeres, con un promedio de edad de 24.5 años y una desviación estándar de 6.9 años y el grupo de testigos con el que fue confrontado estuvo constituido por 10 hombres y 10 mujeres, con un promedio de edad de 24.6 años y una desviación estándar de 7.1 años.

El efecto genotóxico encontrado en los sujetos evaluados, expresado mediante el número de MN totales presentes, células binucleadas con micronúcleos (BN con MN), así como la afectación del ciclo celular mediante el empleo de los índices de división nuclear (IDN) e índice de bloqueo de proliferación de la citocinesis (IBPC) se encuentra resumido en el cuadro 5.

**Cuadro 5. Diferencias encontradas entre los fumadores pasivos respecto a sus testigos, para cada uno de los parámetros evaluados <sup>a</sup>**

Grupo	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Pasivos</b>	20	7.45 ± 4.62	7.8 ± 4.64	1.68 ± 0.29 *	1.60 ± 0.24 *
<b>Testigos</b>	20	8.60 ± 7.93	9.9 ± 8.71	1.44 ± 0.26	1.41 ± 0.22

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando la prueba U de Mann-Whitney

\* p < 0.05

Se aprecia en el cuadro 5 que el grupo de fumadores pasivos no resultó significativamente diferente respecto al grupo testigo, en cuanto a la frecuencia de células BN con MN y micronúcleos, aunque sí lo hizo en los índices de división nuclear y de bloqueo de proliferación de la citocinesis, donde los promedios fueron mayores que los testigos, es decir, que de nuevo el grupo testigo mostró un retraso en el ciclo celular significativamente más elevado, pero ahora con respecto a los fumadores pasivos. También se puede observar que las 20 personas que integraron este grupo testigo, mostraron una

frecuencia promedio de MN tot. y de células BN con MN, menor que el grupo testigo compuesto por 32 personas (ver cuadro 2).

Al igual que para el grupo de fumadores activos, se evaluaron subgrupos de sexo y edad para determinar si estas tendencias se presentaron de manera general o si por el contrario, se concentraron en un subgrupo determinado y los resultados se presentan en el cuadro 6.

**Cuadro 6. Diferencias encontradas entre los fumadores pasivos y sus testigos de acuerdo a subgrupos de sexo y edad <sup>a</sup>**

	Grupo	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Mujeres</b>	Pasivos	10	7.70 ± 3.62	8.20 ± 3.79	1.71 ± 0.30	1.63 ± 0.24
	Testigos	10	9.00 ± 11.05	9.60 ± 12.26	1.35 ± 0.29	1.32 ± 0.24
<b>Hombres</b>	Pasivos	10	7.20 ± 5.63	7.40 ± 5.54	1.66 ± 0.30	1.58 ± 0.25
	Testigos	10	8.20 ± 3.22	10.20 ± 3.08	1.54 ± 0.20	1.50 ± 0.16
<b>&lt; 23 años</b>	Pasivos	11	8.73 ± 4.69 *	8.91 ± 4.61	1.62 ± 0.34	1.54 ± 0.28
	Testigos	11	5.36 ± 1.57	7.18 ± 3.66	1.31 ± 0.15	1.30 ± 0.15
<b>&gt; 23 años</b>	Pasivos	9	5.89 ± 4.26	6.44 ± 4.56	1.77 ± 0.21	1.68 ± 0.17
	Testigos	9	12.56 ± 10.69	13.22 ± 11.86	1.62 ± 0.27	1.55 ± 0.22

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando una prueba de Mann-Whitney

\* p < 0.05

En el cuadro 6 se muestran las diferencias encontradas entre los grupos de fumadores pasivos y sus testigos de acuerdo con subgrupos de sexo y edad. Puede inferirse que el sexo no tuvo influencia en ninguno de los parámetros estudiados.

El subgrupo de fumadores pasivos menores de 23 años, presentó una frecuencia significativamente mayor de células binucleadas con micronúcleos que su grupo testigo (de todos los subgrupos evaluados. éste fue el único donde parece que el humo de tabaco sí aumenta la expresión de MN). Los integrantes del subgrupo de fumadores pasivos mayores de 23 años no presentaron diferencias significativas. con respecto a su subgrupo testigo, en ninguno de los parámetros evaluados.

### Variaciones intragrupales en la frecuencia de MN y afectación del ciclo celular

Además de las diferencias halladas entre los grupos de estudio y sus testigos, se evaluó la posible influencia de aspectos como sexo, edad, tiempo de exposición al humo de tabaco y cantidad de cigarrillos consumidos entre los integrantes del *mismo grupo de estudio* para determinar si éstos son homogéneos en cuanto a resultados o existen subgrupos con un comportamiento distinto.

En el cuadro 7 se muestran diferencias encontradas en subgrupos de sexo, edad, número de cigarrillos diarios y tiempo fumando, en los *fumadores activos*.

**Cuadro 7. Diferencias encontradas en subgrupos de sexo, edad, número de cigarrillos diarios y tiempo fumando, en los fumadores activos<sup>a</sup>**

	Grupo	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Sexo</b>	Mujeres	18	10.44 ± 7.92	12.17 ± 8.72 *	1.66 ± 0.23	1.61 ± 0.19
	Hombres	14	6.71 ± 3.60	7.07 ± 4.10	1.73 ± 0.31	1.65 ± 0.25
<b>Edad<sup>c</sup></b>	23-40 años	10	7.70 ± 5.06	8.70 ± 5.77	1.66 ± 0.33	1.60 ± 0.27
	41-57 años	16	8.75 ± 5.79	10.13 ± 6.74	1.71 ± 0.24	1.65 ± 0.20
	58-73 años	6	10.83 ± 10.72	11.50 ± 11.86	1.68 ± 0.24	1.62 ± 0.19
<b>Cigarrillos diarios</b>	< 30	20	8.15 ± 5.18	8.85 ± 5.44	1.66 ± 0.29	1.60 ± 0.24
	> 30	12	9.92 ± 8.59	11.75 ± 9.96	1.75 ± 0.22	1.68 ± 0.18
<b>Tiempo fumando</b>	< 25 años	15	8.67 ± 5.56	9.47 ± 5.94	1.64 ± 0.30	1.58 ± 0.24
	> 25 años	17	8.94 ± 7.55	10.35 ± 8.72	1.74 ± 0.24	1.67 ± 0.20

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando la prueba U de Mann-Whitney

<sup>c</sup> Usando la prueba de Kruskal-Wallis

\* p < 0.05

Se puede observar que la única diferencia encontrada en el grupo de fumadores activos se localizó en el subgrupo de sexo con respecto a MN totales, consistiendo en que las mujeres presentaron una frecuencia mayor de éstos que los hombres.

En el cuadro 8 se muestran las diferencias encontradas en subgrupos de sexo, edad y tiempo de exposición en los *fumadores pasivos*.

**Cuadro 8. Diferencias encontradas en subgrupos de sexo, edad y tiempo de exposición en los fumadores pasivos <sup>a</sup>**

	Grupo	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Sexo</b>	Mujeres	10	7.70 ± 3.62	8.20 ± 3.79	1.71 ± 0.29	1.63 ± 0.23
	Hombres	10	7.20 ± 5.63	7.40 ± 5.54	1.66 ± 0.30	1.58 ± 0.25
<b>Edad</b>	< 23 años	11	8.73 ± 4.69	8.91 ± 4.61	1.62 ± 0.33	1.54 ± 0.28
	> 23 años	9	5.89 ± 4.26	6.44 ± 4.56	1.77 ± 0.21	1.68 ± 0.17
<b>Años de exposición</b>	< 7 años	12	8.75 ± 4.94	9.08 ± 4.96	1.53 ± 0.22 **	1.72 ± 0.17 **
	> 7 años	8	5.50 ± 3.51	5.88 ± 3.56	1.47 ± 0.26	1.43 ± 0.22
<b>Días semanales expuestos</b>	≤3días	9	6.22 ± 3.56	6.44 ± 3.50	1.83 ± 0.22*	1.72 ± 0.17*
	7 días	11	8.45 ± 5.28	8.91 ± 5.30	1.56 ± 0.29	1.50 ± 0.24
<b>Horas diarias exposición</b>	< 7 h	11	6.82 ± 3.54	7.36 ± 3.75	1.84 ± 0.22 *	1.73 ± 0.17 *
	> 7 h	9	8.22 ± 5.80	8.33 ± 5.74	1.49 ± 0.25	1.44 ± 0.22

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando la prueba U de Mann-Whitney

\* p< 0.05

\*\* p< 0.01

En este grupo se observó que el sexo y la edad no parecen influir en ninguno de los parámetros evaluados. no así el tiempo de exposición que se refleja en los índices. Mientras mayor es el tiempo al que los sujetos estuvieron expuestos al humo de tabaco (ya sea medido en años, días u horas), mayor fue el retraso en el ciclo celular. que se manifestó en valores más bajos de los índices de división nuclear y de bloqueo de proliferación de la citocinesis.

Finalmente, en el cuadro 9 se muestran las diferencias encontradas en los subgrupos de sexo y edad en los *testigos*.

**Cuadro 9. Diferencias encontradas, en los subgrupos de sexo y edad, en los testigos <sup>a</sup>**

	Grupo	n	BN con MN <sup>b</sup>	MN totales <sup>b</sup>	IDN	IBPC
<b>Sexo</b>	Mujeres	18	16.50 ± 8.56	18.06 ± 9.73	1.40 ± 0.20	1.37 ± 0.16
	Hombres	14	15.93 ± 7.13	16.36 ± 7.59	1.58 ± 0.27	1.52 ± 0.23
<b>Edad <sup>c</sup></b>	23-40 años	10	14.90 ± 10.65	16.60 ± 12.27	1.55 ± 0.27	1.50 ± 0.22
	41-57 años	16	18.25 ± 6.80	19.19 ± 7.40	1.52 ± 0.21	1.48 ± 0.18
	58-73 años	6	10.83 ± 3.92	11.33 ± 4.37	1.38 ± 0.27	1.34 ± 0.23

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Por cada 1000 células contabilizadas.

Usando la prueba U de Mann-Whitney

<sup>c</sup> Usando la prueba de Kruskal-Wallis

Ni el sexo ni la edad parecieron influir en ninguno de los parámetros evaluados.

## Cuantificación de Nicotina y Cotinina

La cuantificación de nicotina y cotinina se efectuó en 24 fumadores activos, 9 fumadores pasivos y 5 testigos. Los resultados se muestran en el cuadro 10.

**Cuadro 10. Contenido de nicotina y cotinina determinado en los sujetos de estudio<sup>a</sup>**

Grupo	n	Nicotina (ng/ml)	Cotinina (ng/ml)
<b>Activos</b>	24	983.00 ± 873.00***	1442.00 ± 905.00***
<b>Pasivos</b>	9	3.33 ± 2.50	16.67 ± 25.00***
<b>Testigos</b>	5	2.00 ± 2.74	0.00 ± 0.00

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar

Usando la prueba U de Mann-Whitney

\*\*\* p < 0.001. La comparación se hizo con respecto al grupo testigo.

Los valores de nicotina y cotinina registrados para los fumadores pasivos y los testigos cayeron por debajo de los límites de resolución del espectrómetro de masas, que fueron 10 ng/ml para nicotina y 100 ng/ml para cotinina, por lo que no fue posible determinar el valor mínimo exacto para cada uno de ellos.

Debido a lo anterior, para realizar comparaciones de los niveles de nicotina y cotinina entre los sujetos de estudio, se decidió asignar arbitrariamente el valor medio de 5 ng/ml de nicotina y 50 ng/ml de cotinina para aquellos individuos en los que se detectaron las concentraciones más bajas. Los fumadores activos presentaron elevadas concentraciones de ambos biomarcadores de exposición, como era de esperarse.

Las diferencias en los niveles de nicotina y cotinina registrados en los fumadores activos según sexo, edad, tiempo fumando y número de cigarrillos diarios consumidos se muestra en el cuadro 11.

**Cuadro 11. Diferencias en los niveles de nicotina y cotinina según sexo, edad, tiempo fumando y cigarrillos diarios consumidos, encontradas en la orina de los fumadores activos<sup>a</sup>**

	Grupo	n	Nicotina (ng/ml)	Cotinina (ng/ml)
Sexo	Mujeres	13	1088 ± 1084	1269 ± 581
	Hombres	11	1103 ± 581	1728 ± 1215
Edad	< 45 años	9	1229 ± 1219	1120 ± 774
	> 45 años	15	1014 ± 722	1696 ± 979
Tiempo fumando	< 25 años	17	1405 ± 1406	1338 ± 605
	> 25 años	7	832 ± 739	1600 ± 1155
Cigarrillos diarios	<30	11	1110 ± 1015	1514 ± 1100
	>30	13	1058 ± 700	1396 ± 334

<sup>a</sup> En todos los casos se muestra el promedio ± desviación estándar Usando la prueba U de Mann-Whitney

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los subgrupos evaluados. lo que indica que ni el sexo, la edad, el tiempo fumando y la cantidad de cigarrillos diarios consumidos tuvieron influencia en los niveles de nicotina y cotinina encontrados.

Debido al escaso tamaño muestral, no fue posible hacer este análisis en el grupo de fumadores pasivos y los testigos.

La correlación entre los niveles de nicotina y cotinina de los fumadores activos con los parámetros citogenéticos evaluados (células BN con MN, MN totales, IDN e IBPC) se muestran en el cuadro 12.

**Cuadro 12. Coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores activos, respecto a otros parámetros evaluados**

	n	BN con MN	MN totales	IDN	IBPC	Edad	Años fumando	Cigarrillos diarios
Nicotina	24	0.289	0.243	-0.122	-0.146	-0.358	-0.312	0.090
Nivel de significancia		0.170	0.252	0.569	0.497	0.086	0.138	0.677
Cotinina	24	-0.199	-0.216	0.178	0.174	-0.029	0.041	-0.044
Nivel de significancia		0.351	0.311	0.406	0.416	0.893	0.838	0.850

El cuadro 12 muestra los coeficientes de correlación obtenidos, entre los niveles de nicotina y cotinina, con las variables citogenéticas evaluadas y algunos datos generales: así como los niveles de significancia de dichos coeficientes. El nivel de significancia indica la probabilidad de que el coeficiente de correlación sea igual a 0 (lo que indicaría que no existe correlación). Dicho valor debe exceder el valor de  $\alpha$  asignado previamente (0.05 en este caso) para que pueda concluirse con un 95% de confiabilidad que existe una asociación entre variables. lo que no es el caso para ninguno de los parámetros evaluados.

Ahora bien, se repitió el análisis con la diferencia de que esta vez se agrupó a los sujetos de acuerdo con la cantidad diaria de cigarrillos fumados. En el cuadro 13 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores activos, respecto a otros parámetros evaluados en el subgrupo de fumadores ligeros (hasta 15 cigarrillos diarios).

**Cuadro 13. Coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores activos, respecto a otros parámetros evaluados en el subgrupo de fumadores ligeros (hasta 15 cigarrillos diarios)**

	n	BN con MN	MN totales	IDN	IBPC	Edad	Años fumando	Cigarrillos diarios
<b>Nicotina</b>	7	0.769*	0.711	-0.594	-0.574	-0.525	-0.582	0.396
Nivel de significancia		0.043	0.073	0.160	0.178	0.226	0.170	0.379
<b>Cotinina</b>	7	0.380	0.230	-0.125	-0.111	-0.099	-0.148	0.007
Nivel de significancia		0.400	0.619	0.789	0.812	0.832	0.752	0.989

Este grupo de 7 personas tuvo una edad promedio de  $46.57 \pm 17.62$  años y llevaban fumando  $28.28 \pm 16.70$  años. Se puede apreciar una correlación positiva, significativa y elevada, entre la frecuencia de células BN con MN con el nivel de nicotina.

En el cuadro 14 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores activos, respecto a otros parámetros evaluados, en el subgrupo de fumadores moderados (16 a 29 cigarrillos diarios).

**Cuadro 14. Coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores activos, respecto a otros parámetros evaluados en el subgrupo de fumadores moderados (16 a 29 cigarrillos diarios)**

	<b>n</b>	<b>BN con MN</b>	<b>MN totales</b>	<b>IDN</b>	<b>IBPC</b>	<b>Edad</b>	<b>Años fumando</b>	<b>Cigarros diarios</b>
<b>Nicotina</b>	10	-0.180	-0.095	0.339	0.313	0.157	0.470	-0.012
Nivel de significancia		0.619	0.793	0.337	0.379	0.666	0.170	0.973
<b>Cotinina</b>	10	-0.418	-0.388	0.287	0.263	0.048	0.171	-0.156
Nivel de significancia		0.230	0.268	0.421	0.464	0.895	0.636	0.668

La edad promedio de este conjunto de 10 personas fue de  $47.60 \pm 10.47$  años, y habían fumado durante  $25.3 \pm 10.78$  años. No parece existir asociación entre ninguna de las variables evaluadas.

En el cuadro 15 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores activos, respecto a otros parámetros evaluados, en el subgrupo de fumadores intensos (más de 30 cigarrillos diarios).

**Cuadro 15. Coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significancia para los contenidos de nicotina y cotinina, encontrados en fumadores activos, respecto a otros parámetros evaluados en el subgrupo de fumadores intensos (más de 30 cigarrillos diarios)**

	<b>n</b>	<b>BN con MN</b>	<b>MN totales</b>	<b>IDN</b>	<b>IBPC</b>	<b>Edad</b>	<b>Años fumando</b>	<b>Cigarros diarios</b>
<b>Nicotina</b>	7	0.004	0.003	0.398	0.392	-0.484	-0.365	0.378
Nivel de significancia		0.994	0.996	0.377	0.384	0.272	0.421	0.408
<b>Cotinina</b>	7	-0.214	-0.264	0.695	0.708	-0.337	-0.411	0.060
Nivel de significancia		0.645	0.567	0.083	0.075	0.460	0.359	0.899

Este grupo de 7 personas tuvo una edad promedio de  $49.28 \pm 13.56$  años y llevaban fumando  $29.57 \pm 13.51$  años. De nueva cuenta no se encontró asociación entre ninguna de las variables evaluadas.

Por último, la figura 10 muestra la dispersión del número de células BN con MN y MN totales graficados contra el nivel de nicotina.

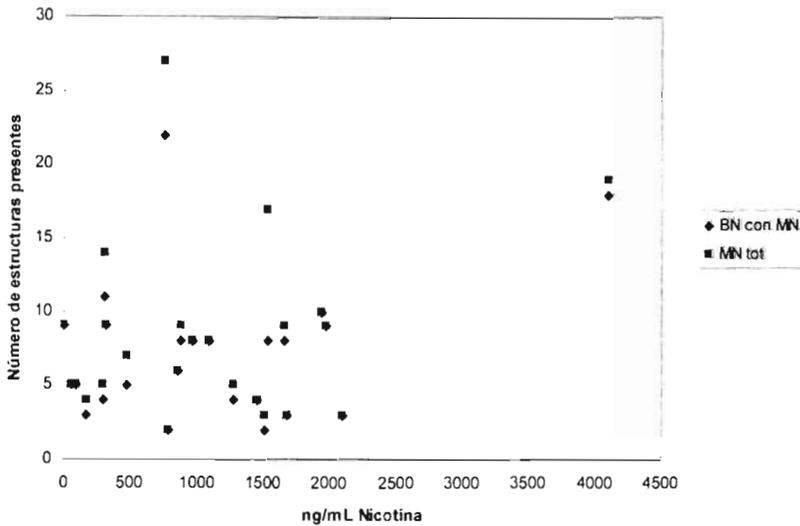


Figura 10. Células BN con MN y MN totales contra nivel de nicotina en orina de fumadores activos

Como puede observarse, no se encontró ningún patrón reconocible que indique un tipo de correlación no lineal, lo que confirma que el contenido de nicotina encontrado en la orina, no estuvo correlacionado con las variables citogenéticas evaluadas, en la mayoría de los casos.

Las gráficas para el resto de las variables con nicotina, así como para cotinina, se encuentran en el apéndice (figuras 14 a 18), observándose en todas la misma tendencia.

## DISCUSIÓN

### Células binucleadas con micronúcleos y micronúcleos totales

Al revisar los resultados del cuadro 2 se observa claramente una frecuencia, significativamente menor, en el número de células binucleadas con micronúcleos ( $8.81 \pm 6.59$ ) y de micronúcleos totales ( $9.94 \pm 7.44$ ) en los fumadores activos, cuando se compararon con el grupo testigo ( $16.25 \pm 7.85$  y  $17.31 \pm 8.76$ , respectivamente) y más específicamente la diferencia se localiza en las personas de edad comprendida entre 41 y 57 años (cuadro 3). Este resultado concuerda con lo planteado por Barale *et al.* (1998) y Bonassi *et al.* (2003); que reportan que el tabaquismo tiene un efecto reductor sobre la frecuencia de micronúcleos, y el resultado obtenido es cercano al valor promedio histórico de células binucleadas con micronúcleos de  $7.8 \pm 5.2$  (por cada 1000 células) (Surrallés *et al.*, 1997). Sin embargo, el hecho de que la disminución sea tan considerable (casi el 50 %) no ha sido publicado con anterioridad. Bonassi *et al.* (2003) reportan disminuciones que van del 3 al 10 % y Barale *et al.* (1998) de un 16%.

De acuerdo con Bonassi *et al.* (2003), fumadores de hasta 19 cigarrillos diarios presentan una disminución en la frecuencia de MN, de 20 a 29 expresan un incremento no significativo y solo fumadores de más de 30 cigarrillos diarios llegan a expresar una frecuencia significativamente mayor de células BN con MN y MN totales, *siempre y cuando no hayan sido expuestos previamente a agentes mutagénicos o carcinogénicos*. de lo contrario el incremento no se presenta, y si se observan los resultados del cuadro 7 para este subgrupo en particular, se aprccia que no hay diferencias significativas entre aquellas personas que fuman menos de 30 y aquellos de más de 30. Más aún, los resultados del cuadro 4, que evalúan a fumadores intensos respecto a sus testigos, sigue presentando la tendencia general de mostrar una frecuencia menor de células BN con MN y MN totales en los fumadores, respecto a los testigos. Esto sugiere (de acuerdo con Bonassi *et al.*, 2003) que los integrantes del subgrupo de fumadores intensos probablemente estuvieron expuestos a uno o varios agentes genotóxicos, adicionales al humo de tabaco, que les impidieron expresar una frecuencia mayor de MN que sus correspondientes testigos. Sin embargo, si ese fuera el caso, y de acuerdo a ese mismo estudio, los valores encontrados tanto en fumadores activos como en los testigos deberían ser

similares. Como esto no sucedió parece razonable pensar que existan otros factores involucrados en la gran diferencia que existe entre la frecuencia de MN en los fumadores activos y sus testigos, encontrada en este estudio.

Se observa en el cuadro 2 que la frecuencia de micronúcleos del grupo testigo es muy alta. Comparando con los resultados publicados por otros autores (cuadro 16), los valores encontrados solo son superados por los reportados por Lohani *et al.* 2002. Esta diferencia en la frecuencia de MN de ambos grupos no puede ser atribuida al sexo o la edad, ya que los promedios de edad de ambos grupos fueron muy parecidos ( $47.3 \pm 12.9$  años;  $47.7 \pm 13.2$  años, activos y testigos, respectivamente) y la distribución de sexos fue idéntica, 14 hombres y 18 mujeres, por lo tanto, el efecto de la edad y el sexo sobre la frecuencia de MN debería actuar de igual manera en ambos grupos, lo que hace suponer que las diferencias encontradas no son debidas a estas variables. Estos factores, sexo y edad, llegan a explicar del 32 % (hombres) al 48 % (mujeres) de la variabilidad que se presenta en la frecuencia de MN (Fenech, 1998a) y evidentemente, éste no es el caso. Además, observando los resultados de los cuadros 7 y 9 donde se analiza la influencia de la edad sobre las frecuencias de células BN con MN y de MN totales, no se aprecia que los subgrupos de mayor edad presenten una frecuencia significativamente mayor de MN.

Al comparar las frecuencias de MN obtenidas en este estudio, con las de los cuadros 17 (tabaquismo asociado con exposición a otros agentes genotóxicos) y 18 (exposición a diversos agentes genotóxicos), la frecuencia de MN de los testigos se asemeja a la de personas no-fumadoras expuestas a agentes genotóxicos como: cadmio o plomo (Palus *et al.*, 2003), campos magnéticos de baja frecuencia (Scarfí *et al.* 1997), radiación (Chang *et al.*, 1997), epíclorhidrina (Hindsólandin *et al.*, 1997), drogas antineoplásicas (Maluf *et al.*, 2000), por mencionar algunos. Estos estudios fueron realizados en otros países y cabe la posibilidad de que la comparación no sea del todo válida debido a las diferentes condiciones ambientales y técnicas en las que se realizaron y a factores socioeconómicos y ocupacionales de los sujetos estudiados; pero como ya se mencionó en los antecedentes, no existen en México estudios que evalúen la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica, pero dado que los micronúcleos provienen de aberraciones cromosómicas, que sí han sido estudiadas en este país, se decidió hacer una comparación con los resultados encontrados en sus poblaciones *testigo*. En 1982 se evaluó el efecto del diclorobenceno en el Centro Médico de la Ciudad de México y la población

testigo reportó una frecuencia de aberraciones cromosómicas de 2.02 % (Zapata *et al.*, 1982). En 1995 se estudio la influencia negativa de trabajar en un tiradero de basura de San Luis Potosí y la población testigo expresó una frecuencia de aberraciones del 3.47 % (Gonsebatt *et al.*, 1995). En 2000 se analizó el posible daño en pintores de exteriores en Mérida, Yucatán, y se encontró una frecuencia de aberraciones cromosómicas del 3.7 % en los testigos (Pinto *et al.*, 2000). En 2002 en Mérida, Yucatán, se evaluó el posible incremento de aberraciones en personas expuestas a rayos x y se reportó una frecuencia de 0.12 % en los testigos (Ceballos *et al.*, 2002). Se ha determinado que existe una correlación elevada entre los resultados obtenidos con la prueba de aberraciones cromosómicas y los obtenidos con la prueba de MN (88 % según Miller *et al.*, 1997). Suponiendo que los MN totales, hubieran provenido exclusivamente de fragmentos acéntricos, y que cada MN contuviera solo un fragmento (se sabe que pueden contener más de uno a la vez (Savage, 2000)) estaríamos hablando de una frecuencia de aberraciones cromosómicas para este estudio de 0.9 % en fumadores activos y de 1.7 % en los testigos, aproximadamente. Así que aunque la frecuencia de MN parezca ser alta en el grupo testigo, existen regiones de México con frecuencias aún mayores de aberraciones cromosómicas que deberían corresponderse con una alta frecuencia de MN.

La frecuencia de MN del grupo testigo parece corresponder a la de un grupo expuesto a un agente genotóxico potente, más que a la de un grupo de personas que vive en ambientes limpios, es decir, con un mínimo de contaminantes ambientales, lo que sugiere un posible efecto genotóxico causado por la contaminación atmosférica en los habitantes de la Ciudad de México. La ciudad esta cubierta por una compleja mezcla de ozono, materia particulada, aldehídos, metales y óxidos de nitrógeno, entre otros (Calderon-Garcidueñas *et al.*, 1999). Muchos de estos contaminantes tienen propiedades oxidantes conocidas que pueden ser causa de estrés en las células con las que tienen contacto. Los efectos del estrés oxidante en las células son muchos y variados. Entre ellos están, el inducir la formación de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), aberraciones cromosómicas y reducción de la proliferación celular (Lioi *et al.*, 1998; Burgaz *et al.*, 2002). También disminuye la respuesta de los linfocitos a los mitógenos (Bechoua *et al.*, 1999), ocasiona rupturas de una hebra en el ADN (Chen *et al.*, 2003), induce la formación de MN en células de epitelio bucal de niños (Lahiri *et al.*, 2000), en esplenocitos y fibroblastos de ratón (Dreosti *et al.*, 1999). Asimismo, se ha determinado que las personas de edad avanzada son más sensibles al estrés oxidante que los jóvenes (Lopez-Hellin *et al.*, 1998).

No se han publicados estudios que investiguen la formación de MN en linfocitos de sangre periférica, causada por contaminación atmosférica en la Ciudad de México, pero se ha determinado que la contaminación de esta ciudad causa estrés oxidante (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004), que provoca daño genotóxico en epitelio nasal de niños (Calderon-Garcidueñas *et al.*, 1999), que puede reducir la proliferación celular (Calderon-Segura *et al.*, 2004), y reduce la actividad de enzimas involucradas en el combate al estrés oxidante, como la superóxido dismutasa, a la mitad de sus niveles normales con tan solo 16 semanas de exposición (Medina-Navarro *et al.*, 1997). Lo anterior permite suponer que los habitantes de la Ciudad de México tengan una frecuencia elevada de micronúcleos, tal como ocurre en Kiev, que tiene una población 3 veces menor y donde Romanova y colaboradores (2001) reportaron una frecuencia de MN totales de 10.5 para una muestra de personas no fumadoras de 42 años en promedio.

No obstante, aunque los fumadores también son habitantes de la Ciudad de México y de igual manera están expuestos a dicha contaminación, se piensa que la baja frecuencia de MN en el grupo de fumadores puede deberse a las propiedades protectoras de los eritrocitos de los fumadores. Estas células poseen concentraciones elevadas de glutatión reducido (GSH) y catalasa (Sierra *et al.*, 2004). El primero es un tripéptido que es capaz de atrapar radicales libres en su estructura y después, mediante ayuda de enzimas como la glutatión peroxidasa, transformarlos en agentes menos reactivos. La catalasa, por su parte, se encarga de eliminar el ion peróxido (Klaunig y Kamendulis, 2004). Los eritrocitos presentan gran cantidad de estos agentes antioxidantes, y se ha observado que las células de individuos fumadores contienen más glutatión reducido (GSH) y catalasa que los individuos no fumadores, presumiblemente por que los eritrocitos de fumadores están constantemente expuestos a un estrés oxidante (causado por el humo de tabaco), que aunado a mecanismos de adaptación, tiene como consecuencia una producción mayor de estas enzimas protectoras (Sierra *et al.*, 2004).

Este fenómeno de adaptación ya ha sido observado antes, por ejemplo, Rothfub *et al.* (1998) descubrieron que una exposición hiperbárica (el doble de la presión atmosférica normal) de oxígeno al 100 %, durante 3 periodos de 20 minutos cada uno, inducía la formación de MN en linfocitos, pero después de un tiempo la frecuencia bajaba a niveles menores de los mostrados al iniciar el tratamiento. La razón de esto se relaciona con enzimas, como la 8-oxo-7,8-dihidrodéoxiguanosina trifosfatasa,

capaces de reparar aductos de ADN provocados por agentes oxidantes. Estas enzimas se han encontrado en células de mamíferos, y funcionan removiendo bases oxidadas del ADN. Se ha observado que la cantidad y la eficiencia de estas enzimas se incrementa luego de una exposición a especies de oxígeno reactivo (Klaunig y Kumendalis, 2004). Además, la exposición al humo de tabaco aumenta la cantidad de glutatión reducido (GSH) en la sangre (Oesch *et al.*, 1994) y a pesar de tener propiedades oxidantes, el humo de tabaco no reduce la concentración de las principales enzimas involucradas en la protección contra este tipo de estrés (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), disminución que sí se presenta conforme avanza la edad (Bolzan *et al.*, 1997).

Finalmente, de los elementos que constituyen al humo de tabaco, por ejemplo, uno tiene la capacidad de reducir la formación de MN y es la hidroquinona. Este compuesto se encuentra en grandes cantidades en el humo de tabaco y se ha comprobado (O'Donoghue *et al.*, 1999), que en la médula ósea de ratones reduce significativamente la frecuencia de MN debido a un efecto antioxidante directo y la misma nicotina puede prevenir el estrés oxidante en bajas concentraciones, pero en altas lo induce por sí misma (Yildiz, 2004). La conjunción de la adecuación adaptativa de los eritrocitos de los fumadores con la presencia de compuestos capaces de reducir la frecuencia de MN en el humo de tabaco, hace viable la hipótesis de que el humo de tabaco realmente pueda reducir la frecuencia de MN.

Otra posibilidad para explicar la frecuencia menor de MN en los fumadores activos, consiste en que sus linfocitos pueden estar tan dañados que no respondan al efecto de la fitohemaglutinina y no alcanzan a dividirse y por ello no expresan MN; sin embargo, esto parece poco plausible por que una condición así, conllevaría un correspondiente descenso en los valores de los índices de división nuclear (IDN), y de bloqueo de proliferación de la citocinesis (IBPC), y los resultados del cuadro 2 muestran lo contrario, es decir, IDN e IBPC mayores en los fumadores que en los testigos.

Una explicación adicional, para la frecuencia menor de MN en los fumadores, es la de que el humo de tabaco induzca la formación de MN *in vivo*, pero las células que los contienen no se dividan o mueran durante la etapa de cultivo y por ello no sean contabilizadas al momento de la observación. Para confirmar esto, se requeriría incluir en el estudio la cuantificación de células mononucleadas con MN,

células en apoptosis y células en necrosis (Bonassi *et al.*, 2003). Un incremento significativo de estas células en los fumadores, indicaría un efecto dañino del humo de tabaco, más que un efecto protector.

Respecto al grupo de fumadores pasivos, y a diferencia de lo reportado por Baier *et al.* (2002), no se encuentra una diferencia en la frecuencia de MN con respecto a sus testigos, con una excepción. El subgrupo de fumadores pasivos menores de 23 años, presentó una frecuencia significativamente mayor de células binucleadas con micronúcleos, que los testigos con los que fue comparado (cuadro 6). De este análisis se puede apreciar, que el subgrupo testigo con el que fue comparado presenta una frecuencia de células BN con MN particularmente baja ( $5.36 \pm 1.57$ ), lo que podría explicarse en función de la corta edad de los individuos que conforman este grupo (menores de 23 años) y por consiguiente, un menor tiempo de exposición a la influencia genotóxica de la contaminación atmosférica. Por otro lado, la elevada frecuencia de células BN con MN, del subgrupo pasivo de menores de 23 años ( $8.73 \pm 4.69$ ) podría deberse a la exposición al humo de tabaco y la razón por la que no se observa esa diferencia en los fumadores pasivos de mayor edad, se debe a que conforme transcurre el tiempo, aumenta la frecuencia de MN en los testigos, imposibilitando, de esta manera, encontrar una diferencia significativa entre ambos grupos luego de aplicar la prueba estadística de Mann-Whitney.

Parece contradictorio el hecho de que se observe un incremento significativo en la frecuencia de MN en este subgrupo pasivo, cuando no es posible verlo en los fumadores activos que ingieren cantidades significativamente mayores de humo de tabaco, sin embargo, este resultado (solo de este subgrupo) está de acuerdo con lo publicado por Baier *et al.* (2002), que reportan un aumento significativo en la frecuencia de células BN con MN, trabajando con niños fumadores pasivos (8.0 en niños pasivos y 6.2 en niños testigos). Como este comportamiento no es apreciable cuando se evalúa el grupo completo de fumadores pasivos es razonable pensar que el subgrupo de fumadores pasivos menores de 23 años presenta una frecuencia mayor de MN por una razón ajena a la exposición al humo de tabaco. Suponiendo que el incremento en la frecuencia de MN fuera realmente atribuible a la exposición al humo de tabaco, los resultados sugerirían que el humo de tabaco ambiental (que es al que están expuestos los fumadores pasivos) es mucho más dañino que el humo principal (el que ingieren los fumadores), por que bastarían cantidades menores para inducir la formación de MN, lo que esta de acuerdo con DeMarini (2004).

Además de lo ya expuesto, debe considerarse también que la frecuencia de MN es muy susceptible a otros factores como la dieta. Se sabe que la inclusión en la alimentación de vitaminas, C, E, betacarotenos y zinc pueden reducir significativamente la frecuencia de MN (Konopacka y Rzeszowska-Wolny, 2001), y que incluso cantidades tan pequeñas como, por ejemplo, 700  $\mu\text{g}$  de ácido fólico y 2.5  $\mu\text{g}$  de vitamina B<sub>12</sub> pueden reducir la frecuencia de MN en 25% (Fenech, 1998b). Otra variable con efecto en la frecuencia de MN son los polimorfismos en el gen GSTT1, ya que se ha observado que los individuos que carecen de este gen o lo tienen alterado, son más susceptibles a tener una

frecuencia de MN mayor, sin importar si están expuestos o no a agentes genotóxicos, debido a una deficiente producción de glutatión-S transferasa (Vlachodimitropoulos *et al.*, 1997). Estos factores son muy difíciles de controlar y por lo tanto, su efecto en este estudio es desconocido, aunque parece poco probable que hubieran actuado preferentemente sobre un grupo en particular, tomando en cuenta que los participantes de este estudio presentan ocupaciones laborales, niveles de estudio y niveles socioeconómicos variados, y la única característica común que poseen y que permite agruparlos es que unos fuman, otros solo están expuestos al humo de tabaco de manera involuntaria por largos periodos de tiempo y el resto no esta en contacto con el humo de tabaco mas que ocasionalmente.

En conclusión, los resultados obtenidos parecen indicar que la población testigo ha estado expuesta a la acción de uno o varios agentes inductores de MN que provocan frecuencias elevadas de MN en los testigos, y que el humo de tabaco tiene la capacidad de; ya sea evitar el incremento en la frecuencia de MN en los fumadores activos mediante la activación de una respuesta adaptativa en los eritrocitos que aumente sus propiedades antioxidantes; o inducir respuestas genotóxicas y citotóxicas que reduzcan la capacidad de los linfocitos de dividirse y por lo tanto imposibiliten la expresión de MN y su consiguiente observación. En los fumadores pasivos no se observó diferencia significativa con respecto a sus testigos de manera general.

### Índices de División Nuclear y de Bloqueo de Proliferación de la Citocinesis

Respecto a la progresión del ciclo celular, los resultados presentados en los cuadros 2 y 5 muestran ser similares para los fumadores *activos* y *pasivos* en los caso del IDN ( $1.69 \pm 0.27$  en activos,  $1.68 \pm 0.29$  en pasivos) e IBPC ( $1.63 \pm 0.22$  en activos,  $1.60 \pm 0.24$  en pasivos). Para el caso de los testigos, la situación es semejante ya que el grupo de 20 testigos presentó valores de IDN de  $1.44 \pm 0.26$  e IBPC de  $1.41 \pm 0.22$ , que resultaron parecidos a los del grupo testigo de 32 personas: IDN de  $1.48 \pm 0.25$  e IBPC de  $1.44 \pm 0.21$ . Estos valores indican que el ciclo celular es más rápido en los fumadores activos y pasivos, que en los testigos. Los resultados del cuadro 3 mostraron que las diferencias se concentraron en el grupo de mujeres, y en las personas mayores de 41 años; efectos que no se aprecian entre los fumadores pasivos y sus testigos (cuadro 6) donde ni el sexo o la edad parecieron influir significativamente.

Estos resultados parecen indicar que el humo de tabaco ejerce un efecto acelerador sobre el ciclo celular, tanto en fumadores activos como en pasivos, lo cual estaría de acuerdo a lo publicado por Argentin y Cicchetti (2004) y Woggner y Wang (1994) quienes reportan que la nicotina tiene la propiedad de estimular la proliferación celular en algunos casos (fibroblastos gingivales y epitelio cervical, respectivamente). Sin embargo, existen otros estudios que apoyan la hipótesis contraria, es decir, que el humo de tabaco no acelera el ciclo celular e incluso puede ocasionar un retraso. Pastor *et al.* (2002) reporta específicamente una disminución en el IBPC asociado al tabaquismo. Pitarque *et al.* (1999) y Palus *et al.* (2003) (cuadros 16 y 17) reportan valores de IBPC e IDN cercanos a 2, tanto en fumadores como testigos, y en ningún caso resultaron ser significativamente diferentes. Este valor de 2 es el que deberían adoptar estos índices en condiciones ideales donde no existieran factores externos que alteraran el ciclo celular. En el cuadro 18 se muestran evaluaciones de otros agentes genotóxicos y los valores de IBPC presentados en los *testigos* son superiores a los encontrados en los *testigos* de este estudio, excepto por Maffei *et al.* (2002) que reporta un promedio menor, señal de que aparentemente existe un retraso celular en los testigos de este estudio. Además, también se sabe que la exposición a contaminantes atmosféricos disminuye la respuesta de linfocitos a la fitohemaglutinina (Tomei *et al.*, 2004) y que el tabaquismo disminuye la proliferación celular (Sánchez, 2004) al igual que exposiciones crónicas a la nicotina (Sopori *et al.*, 1993; Yildiz, 2004). Es por ello que parece más

plausible suponer que existe un retraso en el ciclo celular de los fumadores activos, pasivos y testigos, que por alguna razón es mas severo en los testigos, que suponer que el ciclo celular esta acelerado en los fumadores.

El hecho de que los valores de los índices (IDN e IBPC) obtenidos en el presente estudio sean significativamente menores en el grupo testigo que en los fumadores activos y pasivos, parece sugerir que el humo de tabaco interactúa con los contaminantes o agentes causales de este retraso en forma tal, que reduce su efecto en los fumadores activos y pasivos. El mecanismo de acción para que esto ocurra es desconocido, pero quizás entre los más de 4000 compuestos químicos que integran el humo de tabaco uno o más tengan efectos antagónicos a los que se encuentran presumiblemente en la atmósfera y que retrasan el ciclo celular, o incluso puede existir competencia entre los compuestos de ambas fuentes cuando ya están en el interior del organismo, y los provenientes del humo de tabaco tengan mayor afinidad con las células y sean menos dañinos, lo que parece ser confirmado por la fuerte correlación negativa que existe entre ambos índices con la frecuencia de MN. Para el IDN se tiene un coeficiente de correlación de  $-0.758$  ( $p=0.049$ ) con las células BN con MN, y de  $-0.764$  ( $p=0.046$ ) para MN totales. En cuanto al IBPC se tiene un coeficiente de correlación de  $-0.764$  ( $p=0.046$ ) con las células BN con MN; y de  $-0.799$  ( $p=0.031$ ) con MN totales, todos ellos únicamente en el subgrupo de *fumadores intensos*. Lo anterior sugiere que en las personas que fuman más de 30 cigarrillos diarios, a mayor frecuencia de MN, mayor retraso celular, lo que no parece ser provocado por el humo de tabaco ya que como se puede observar en el cuadro 15 (donde se muestran los coeficientes de correlación entre los niveles de nicotina y cotinina en orina con otros parámetros evaluados) que no existe correlación entre el contenido de nicotina y cotinina con la frecuencia de células BN con MN y MN totales en estos fumadores. En los fumadores ligeros y moderados los coeficientes de correlación entre los índices y la frecuencia de MN no fueron significativos.

Volviendo a los resultados de este estudio, es necesario comentar dos particularidades respecto a ellos. Primero, los resultados obtenidos parecen no estar influidos por la edad, lo que está en desacuerdo con Quadri *et al.* (1998) quienes reportaron una declinación de la progresión del ciclo celular conforme transcurre la edad, y los valores obtenidos en este estudio, para ambos índices, son muy parecidos tanto en fumadores activos como pasivos, siendo que en promedio los fumadores activos son 23 años mayores que los fumadores pasivos, y el mismo fenómeno se observa en el grupo

testigo de 20 personas, cuando es comparado con el grupo testigo de 32 donde, de nueva cuenta, el grupo de 32 personas tiene una edad promedio 23 años mayor. Segundo, la similitud en los valores de ambos índices en los fumadores activos y pasivos es difícil de interpretar, porque parece indicar que el efecto no es dependiente de la cantidad de humo de tabaco que ha ingresado al cuerpo o a la que se ha sido expuesto. Como ya se mencionó, la nicotina puede retrasar el ciclo celular (Sopori *et al.*, 1993; Yildiz, 2004) al igual que la hidroquinona (Li *et al.*, 1996), así que se esperarían valores menores en el IDN e IBPC de los fumadores activos, comparados con los pasivos, pero éste no es el caso y no hay elementos adicionales para explicarlo.

En conclusión, los índices de división nuclear y de bloqueo de proliferación de la citocinesis parecen indicar que existe un retraso en el ciclo celular en los fumadores activos, fumadores pasivos y testigos, mas que una posible aceleración en los fumadores, probablemente debido a la acción de contaminantes ambientales a los que la población esta expuesta, y aparentemente el humo de tabaco tiene la capacidad de evitar que el ciclo celular de los linfocitos de los fumadores activos y pasivos se retrase tanto como en los testigos, posiblemente debido a fenómenos de competencia entre el agente causante del retraso celular y los componentes del humo de tabaco.

### Nicotina y Cotinina

Con respecto a la cuantificación de nicotina y cotinina, los resultados encontrados son similares a los reportados por la Agencia de Protección al Ambiente de California (EPA, 1997). Esa agencia describe valores de 1749 ng/ml de nicotina y de 1391 ng/ml de cotinina (ambos en orina), para fumadores activos. Los resultados de este estudio presentaron un promedio de nicotina de 983 ng/ml y de cotinina de 1442 ng/ml.

Los resultados del cuadro 11 indican que el sexo, la edad, el tiempo fumando y la cantidad de cigarrillos consumidos no influyeron sobre los niveles de nicotina y cotinina encontrados; lo que contradice lo reportado por Prather *et al.* (1993) que mencionan que la excreción de nicotina y cotinina son mayores en mujeres; a lo publicado por Swan *et al.* (1993) que especifica una correlación positiva de la cantidad de cotinina encontrada respecto a la edad y a lo planteado en Pardell (1996), que establece una excreción mayor de nicotina en los fumadores crónicos.

Se ha determinado que el metabolismo de la nicotina es afectada por gran cantidad de factores como los hábitos alimenticios, género, raza, contenido de alquitrán, tipo de cigarrillo consumido e incluso polimorfismos genéticos (Patterson *et al.*, 2003); aspectos no evaluados en este estudio y que podrían explicar los resultados encontrados.

La carencia de datos significativos entre el consumo de cigarrillos diarios, en personas que fuman más de 30, y aquellos que fuman menos de 30, es aun más controvertido ya que se esperaría un promedio mayor de nicotina y cotinina en aquellos fumadores intensos, aunque por otro lado, también se sabe que el número de cigarrillos consumidos diariamente no es un buen indicador del contenido de nicotina que ingresa al cuerpo. Factores tales como el tipo de cigarrillo, el número y profundidad de las aspiraciones, la presencia de aditivos (ej. el mentol favorece aspiraciones más profundas), contenido de alquitrán y el hecho de terminárselos o no; influyen de manera significativa en la cantidad de nicotina que es absorbida (Patterson *et al.*, 2003).

En un estudio realizado en Alemania en 1998 (Heinrich *et al.*, 2004) en el que se analizó el contenido de nicotina y cotinina de aproximadamente 5000 personas, se llegó a la conclusión de que la cantidad de cigarrillos consumidos solo explicaba el 42 % de la variación encontrada en los contenidos de nicotina y 51 % de los niveles de cotinina, señal de que otros factores intervienen en el metabolismo de la nicotina.

En este estudio, los niveles de correlación (cuadro 12) encontrado entre el número de cigarrillos diarios consumidos, y los contenidos de nicotina y cotinina, fueron muy bajos y no significativos (0.090 para nicotina y -0.044 para cotinina) lo que parece indicar una carencia de asociación entre el nivel de nicotina y cotinina con la cantidad de cigarrillos consumidos, cuando otros autores reportan valores de correlación para cotinina en orina de 0.24 (Wall *et al.*, 1988), 0.54 (Suter *et al.*, 1995), 0.62 (Jacob *et al.*, 1988) y 0.67 (Fried *et al.*, 1995). Sin embargo, Swan *et al.* (1993) encontraron que los valores de cotinina detectados en la saliva de fumadores no se ajustaba a un modelo lineal, principalmente en aquellos que tenían un consumo moderado de cigarrillos, por ello dividió a su población en grupos de fumadores ligeros, moderados e intensos y el coeficiente de correlación mejoró para los ligeros e intensos, y bajó para los moderados. Siguiendo ese criterio, se decidió hacer ese ajuste en los datos obtenidos para los valores de nicotina y cotinina en *orina* y se encontró que

efectivamente, el coeficiente de correlación aumentó para nicotina de 0.090 general a 0.396 en fumadores ligeros (hasta 15 cigarrillos diarios, cuadro 13), bajó a -0.012 en moderados (de 16 a 29 cigarrillos, cuadro 14), y volvió a subir a 0.378 en fumadores intensos (más de 30 cigarrillos, cuadro 15), aunque en ningún caso resultaron ser significativos. En cotinina, sin embargo, el comportamiento se invirtió y los que mostraron un aumento de su coeficiente de correlación fueron los moderados, aunque éste fue mínimo, y en ningún caso los cambios fueron significativos. -0.044 general, 0.006 en ligeros, -0.155 en moderados y 0.059 en intensos.

Una posible explicación para la carencia de una correlación significativa entre la cantidad de cigarrillos diarios consumidos, y los contenidos de nicotina y cotinina encontrados, es que la información dada por los fumadores activos no sea del todo confiable y podría estar subestimada en algunos casos y sobrestimada en otros. De los 32 fumadores analizados, 30 provienen de la clínica Anti-Tabaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y fueron invitados a participar en este estudio, justo antes de ingresar al programa para dejar de fumar. Aunque se les recomendaba a los integrantes de ese programa no dejar de fumar hasta una fecha posterior, podría haberse dado el caso de que algunos de ellos disminuyeran su consumo de tabaco con el fin de facilitar la transición, y que al responder la pregunta ¿Cuántos cigarrillos fuma diariamente? hayan dado información no actualizada. Se recomienda para futuros estudios vigilar de manera más estricta el número real de cigarrillos consumidos, por lo menos los 3 días anteriores antes de la toma de muestra de orina.

Los resultados del cuadro 12 y de las figuras 10 y 14 a 18 muestran que no hay asociación entre las variables citogenéticas evaluadas (células BN con MN, MN totales, IDN e IBPC) con los contenidos de nicotina y cotinina encontrados en los fumadores activos, de manera general, pero al notar el aumento en los coeficientes de correlación cuando se analizaron por grupos de fumadores ligeros, moderados e intensos; se decidió repetir el análisis para las demás variables y los resultados se presentan en los cuadros 13, 14 y 15. Como puede observarse, el coeficiente de correlación entre la nicotina y la cantidad de células BN con MN aumentó hasta volverse significativo (cuadro 13), señal de que en los fumadores activos ligeros ambas variables están asociadas. Aunque en los demás casos no haya pasado eso, puede notarse que los coeficientes aumentan en los fumadores ligeros e intensos, y suponiendo que ese fenómeno no sea debido al azar, indica que es en los fumadores moderados

donde actúan con mayor equilibrio de fuerzas los factores tendientes a causar daño (efecto genotóxico de las sustancias contenidas en el humo de tabaco) y aquellos que tratan de evitarlo (posible respuesta adaptativa de los linfocitos), y por ello debería ser analizado este grupo con mayor detalle.

En conclusión, los fumadores activos ligeros son los únicos que presentan una correlación significativa entre el contenido de nicotina hallado en la orina respecto a células BN con MN.

Finalmente, no deben extraerse conclusiones erróneas de este estudio, a pesar de que los resultados parecen indicar que el humo de tabaco pueda ejercer algún efecto benéfico en los linfocitos al disminuir la expresión de micronúcleos, esto no implica que así suceda en el pulmón u otros tejidos corporales, y debe recordarse la probada capacidad del humo de tabaco de producir cáncer, antes de pensar en sugerir, de cualquier forma, que fumar hace algún bien a la salud, ya que en la mayor parte de los voluntarios se han iniciado problemas, principalmente de tipo respiratorio, motivo por el cual han acudido a dicho hospital con la intención de dejar de fumar.

## CONCLUSIONES

- En cuanto a la frecuencia de micronúcleos, los resultados obtenidos parecen indicar que el humo de tabaco tiene la capacidad de; ya sea reducir la frecuencia de micronúcleos (MN) en los fumadores activos mediante la activación de una respuesta adaptativa en los eritrocitos que aumente sus propiedades antioxidantes; o inducir respuestas genotóxicas y citotóxicas que reduzcan la capacidad de los linfocitos de dividirse y por lo tanto imposibiliten la expresión de MN y su consiguiente observación. En los fumadores pasivos no se observó diferencia significativa con respecto a sus testigos de manera general.
- Los índices de división nuclear y de bloqueo de proliferación de la citocinesis parecen indicar que existe un retraso en el ciclo celular en los fumadores activos, fumadores pasivos y testigos, mas que una posible aceleración en los fumadores, y aparentemente el humo de tabaco tiene la capacidad de evitar que el ciclo celular de los linfocitos de los fumadores activos y pasivos se retrase tanto como en los testigos, posiblemente debido a fenómenos de competencia entre el agente causante del retraso celular y los componentes del humo de tabaco.
- Los niveles de nicotina y cotinina encontrados en orina son mayores en los fumadores activos que en los pasivos o testigos, y únicamente se evidenció una correlación significativa entre estas variables y los parámetros citogenéticos evaluados, siendo ésta que el contenido de nicotina hallado en la orina de los fumadores ligeros parece estar asociado a la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BN con MN).
- En cuanto a los resultados obtenidos en este trabajo, en comparación con los reportados en otros estudios, se observó que las frecuencias de células BN con MN y MN totales de los fumadores activos y pasivos evaluados resultaron ser similares, mientras que las frecuencias de los testigos fueron mayores. Los índices de división nuclear y de bloqueo de proliferación de la citocinesis de fumadores y testigos se mostraron inferiores a los obtenidos por otros autores, mientras que los niveles de nicotina y cotinina determinados resultaron similares a lo publicado previamente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adler, D., Attia, S. 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.
- Agilent Technologies. 2004. What is Gas Chromatography?. [En línea] [http://www.chem.agilent.com/scripts/cabu/p2\\_cas\\_level3.asp?groupid=490&catid=453&sid=none&catnm=Reference+and+Training+Materials&subcatid=420&subcatnm=GC+Instrument+Manuals&sAnc=cat17](http://www.chem.agilent.com/scripts/cabu/p2_cas_level3.asp?groupid=490&catid=453&sid=none&catnm=Reference+and+Training+Materials&subcatid=420&subcatnm=GC+Instrument+Manuals&sAnc=cat17). Consultado marzo 2004.
- Albertini, S., Kirsch-Volders, M. 1997. Summary and conclusions on the MNT in vitro and implication on testing strategies. *Mutat. Res.* 392: 183-185.
- Albertini, R., Anderson, D., Douglas, G., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A., Norppa, H., Shuker, D., Tice, R., Waters, M., Antero, A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463: 111-172.
- American Cancer Society, Inc., World Health Organization, and International Union Against Cancer. 2003. The Tobacco Control Country Profiles (2nd edition) [En línea] [http://www.who.int/tobacco/global\\_data/country\\_profiles/en/](http://www.who.int/tobacco/global_data/country_profiles/en/). Consultado junio 2004.
- American Council on Science & Health, 1997. Cigarettes: what the warning label doesn't tell you. ACSH. New York, USA. 288p.
- Ames, B. 1989. Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environ. Mol. Mutag.* 14: 66-77.
- Argentin, G., Cicchetti, R. 2004. Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol. Sci.* 79: 75-81.
- Arneric, S. 1998. Neuronal nicotinic receptors: Pharmacology and therapeutic opportunities. Wiley-Liss, Inc. Florida USA. 421 p.
- ASH. 2002. Action on Smoking and Health. [En línea] <http://www.ash.org.uk>. Consultado marzo 2003.
- ASMS. 2004. American Society for Mass Spectrometry: "What is mass spectrometry?". [En línea] <http://www.asms.org/whatisms/p6.html>. Consultado octubre 2004.
- Au, W., Walker, D., Ward, J., Whorton, E., Legator, M., Singh, V. 1991. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutat. Res.* 260: 137-144.
- Badr, F., Habel-Halim, H., Imam, S., Shalaby, I. 1997. Chromosomal damage in experimental schistosomiasis treated with nicotine and praziquantel. *Mutat. Res.* 379: S118.
- Baier, G., Stopper, H., Kopp, C., Winkler, V., Zwirner-Baier, I. 2002. Respiratory diseases and genotoxicity in tobacco smoke exposed children. *Laryngorhinologie* 81: 217-225.

- Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del, S., Andreassi, M., Ballardini, M., Bulleri, M., He, J., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F., Landi, S. 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ. Mol. Mutagen.* 31: 228-242.
- Bardana E. 1997. *Indoor Air Pollution and Health*. Marcel Dekker, Inc. New York USA. 507 p.
- Bazylak, G., Brozik, H., Sabanty, W. 2000. HPTLC screening assay for urinary cotinine as biomarker of environmental tobacco smoke exposure among male adolescents *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* 24: 113-123.
- Bechoua, S., Dubois, M., Dominguez, Z., Goncalves, A., Ne'moz, G., Lagarde, M., Prigent, A. 1999. Protective effect of docosahexaenoic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 57: 1021-1030.
- Bender, M. 1980. relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production, en: Generoso, W., Shelby, F., De Serres, F. *DNA repair and mutagenesis in eukaryotes*. Plenum, New York, 245-265.
- Bolzan, A., Bianchi, M., Bianchi, N. 1997. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clinic. Biochem.* 30: 449-454.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A., Tinnerberg, H., Fornj, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I., Knudsen, L., 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., 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.
- Bonassi, S. 2003. Usefulness of biomarkers for prediction of cancer risk based on perspective population studies. En: 4th International Conference on Environmental Mutagens in Human Population. Mayo 04-08 2003. Florianópolis, Brazil. [En linea] [http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=4th\\_6cong\\_download](http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=4th_6cong_download). Consultado octubre 2004.
- Buckvic, N., Bavaro, P., Elia, G., Cassano, F., Fanelli, M., Guante, G. 1998. Sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. *Mutat. Res.* 415: 25-33.
- Burgaz, S., Iscan, A., Büyükbingöl, Z., Bozkurt, A., Karakaya, A. 1995. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioter excretion of smokers. *Mutat. Res.* 335: 163-169.
- Burgaz, S., Karahalil, B., Bayrak, P., Takın, L., Yavuzaslan, F., Bökesoy, I., Anzion, R., Bos, R., Platin, N. 1999. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. *Mutat. Res.* 439: 97-104.

- Burgaz, S., Demircigil, G., Karahalil, B., Karakaya, A. 2002. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. *Chemosphere* 47: 57-64.
- Calderón-Garciduenas, L., Wen-Wang, L., Zhang, Y., Rodríguez-Alcaraz, A., Osnaya, N., Villarreal-Calderon, A., Santella, R. 1999. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ. Health Perspect.* 107: 469-474.
- Calderón-Segura, M., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Butterworth, F., Amador-Munoz, O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat. Res.* 558: 7-17.
- Calvert, G., Talaska, G., Mueller, C., Ammenheuser, M., Au, W., Fajen, J., Fleming, L., Briggie, T., Ward, E. 1998. Genotoxicity in workers exposed to methyl bromide. *Mutat. Res.* 417: 115-128.
- Ceballos, J., Pinto, D., Canto, J. 2002. Incremento de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátides hermanas en personas sanas con exposición laboral a rayos x. *Rev. Biomed.* 13: 76-82.
- Cole, J., Skopek, T. 1994. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens, working paper 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.* 304: 33-106.
- Chang, W., Hwang, BF., Wang, D., Wang, J. 1997. Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate gamma-radiation in residents of irradiated buildings. *Lancet* 350: 330-333.
- Chen, C., Wang, Y., Huang, W., Huang, Y. 2003. Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189: 153-159.
- Cheng, T., Christiani, D., Xu, X., Wain, J., Wiencke, J., Kelsey, K. 1996. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat. Res.* 349: 43-50.
- Cui Y, Dong Z, Liu S, Zhang S, Wang Y, Ji Y. 1990. Assessment of the mutagenic effect of maternal factors on human chorionic villi by micronucleus test. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340: 217-222.
- DeMarini, D. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.* 567: 447-474.
- Doolittle, D., Winegar, R., Lee, C., Caldwell, W., Hayes, A. J., Donald de Bethizy. 1995. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat. Res.* 344: 95-102.
- Dreosti, I., Baghurst, P., Partick, E., Turner, J. 1999. Induction of micronuclei in cultured murine splenocytes exposed to elevated levels of ferrous ions, hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation. *Mutat. Res.* 244: 337-343.
- Duffaud, F., Orsière, T., Digue, L., Villani, P., Volot, F., Favre, R., Botta, A. 1999. Micronucleated lymphocyte rates from head-and-neck cancer patients. *Mutat. Res.* 439: 259-266.

- Dutrix, M., Wambersie, A. 1990. Introduction of radiobiology. Taylor and Frances. New York, USA. 247 p.
- Enstrom, J., Kabat, G. 2003. Environmental tobacco smoke and tobacco related mortality in a prospective study of Californians, 1960-98. *BMJ*. 326: 1057. [En línea] <http://bmj.bmjournals.com/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=bmj&resid=326/7398/1057>. Consultado febrero 2004.
- EPA. 1997. Health Effects of Exposure to Environmental Tobacco Smoke. [En línea] [http://www.oehha.org/air/environmental\\_tobacco/finalets.html](http://www.oehha.org/air/environmental_tobacco/finalets.html). Consultado abril 2002.
- Evans, H. 1997. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res.* 392: 5-10.
- Falck, G., Hirvonen, A., Scarpato, R., Saarikoski, S., Migliore, L., Norppa, H. 1999. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* 441: 225-237.
- Fenech, M. 1998a. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes, a biomarkers for DNA damage in human populations. *Mutat. Res.* 404: 155-165.
- Fenech, M. 1998b. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann. NY Acad. Sci.* 854: 23-36.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.
- Fenech, M., Morley, A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29-36.
- Fenech, M., Crott, J. 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* 504: 131–136.
- Fenech, M., Holland, N., Wushou, P., Zeiger, E., Bonassi, S. 1999. The Human MicroNucleus Project- An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428: 271-283.
- Fried, P., Perkins, S., Watkinson, B., McCartney, J. 1995. Association between creatinine-adjusted and unadjusted urine cotinine values in children and the mother's report of exposure to environmental tobacco smoke. *Clin. Biochem.* 28: 415-420.
- Gersen S. 1999. The principles of clinical cytogenetics. Human Press. New Jersey, EUA. 558p.
- Gonsebatt, M., Salazar, A., Montero, R., Díaz, F., Yañez, L., Gómez, H., Ostrosky, P. 1995. Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in Mexico. *Environ. Health Perspect.* 103: 111-113.
- Guerin, R., Jenkins, A., Tomkins, A. 1992. The chemistry of environmental tobacco smoke: composition and measurement. Lewis, EUA. 330 p.
- Hackshaw, A., Law, M., Wald, N. 1997. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 315: 980-988.

- Hansen, M., Garde, A., Christensen, J., Eller, N., Knudsen, L., Heinrich-Ramn, L. 2001. Reference interval and subject variation in excretion of urinary metabolites of nicotine from non-smoking healthy subjects in Denmark. *Clin. Chimic. Acta* 304: 125-132.
- Heinrich, J., Hölischer, B., Seiwert, M., Carty, C., Merkel, G., Schulz, C. 2004. Nicotine and cotinine in adults urine: The German Environmental Survey 1998. *J. Exp. Anal. Environ. Epidem. May*: 1-7.
- Hemmink, K., Dipple, A., Shuker, D., Fadlubar, F., Segerbäck, D., Bartsch, H. 1994. Adducts, identification and biological significance. International Agency for Research on cancer. Lyons. IARC Scientific publications 125. 478 p.
- Hindsølandin, H., Grummt, T., Laurent, C., Tates, A. 1997. Monitoring of occupational exposure to epichlorohydrin by genetic effects and hemoglobin adducts. *Mutat. Res.* 381: 217-226.
- Holmén, A., Karlsson, A., Bratt, I., Högstedt, B. 1995. Increased frequencies of micronuclei in T8 lymphocytes of smokers. *Mutat. Res.* 334: 205-208.
- HUMN. 2001. A detailed description of the scoring method and scoring criteria for the micronucleus assay in cytokinesis-blocked human lymphocytes. [En línea] <http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/Publications.html>. Consultado enero 2003.
- Huret, J. 2000. Mitosis-Meiosis. [En línea]. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/IntroItems/PolyMecaEng.html> Consultado abril 2002.
- Husgafvel-Pursiainen, K. 2004. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat. Res.* Por publicar. [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- Hutchinson, J., Tizabi, Y., Taylor, R. 1998 Rapid method for the simultaneous measurement of nicotine and cotinine in urine and serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 708: 87-93.
- Jacob, P., Benowitz, N., Shulgin, A. 1988. Recent studies of nicotine metabolism in humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30: 249-253.
- Joksic, G., Spasojevic-Tisma, V. 1998. Chromosome analysis of lymphocytes from radiation workers in tritium-applying industry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71: 213-220.
- Kalaiselvi, K., Rajaguru, P., Palanivel, M., Usharani, M., Ramu, G. 2002. Chromosomal aberration, micronucleus and comet assays on peripheral blood lymphocytes of leprosy patients undergoing multidrug treatment. *Mutagenesis* 17: 309-312.
- Karahalil, B., Burgaz, S., Fisek, G., Karakaya, A. 1998. Biological monitoring of young workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine repair workshops. *Mutat. Res.* 412: 261-269.
- 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., Wakata, A. 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540: 153-163.

- Klaunig, J., Kamendulis, L. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 239-267.
- Konopacka, M., Rzeszowska-Wolny, J. 2001. Antioxidant vitamins C, E and beta -carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 491: 1-7.
- Lacadena, 1996. *Citogénetica*. Editorial Complutense. Madrid, España. 931p.
- Lahiri, T., Roy, S., Basu, C., Ganguly, S., Ray, M., Lahiri, P. 2000. Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *The Indian J. Med. Res.* 112: 21-26.
- Lazcano-Ponce, E., Hernández-Avila, M. 2002. La epidemia de tabaquismo. *Epidemiología, factores de riesgo y medidas de prevención. Salud Pública Mex.* 44: 1-2.
- Lee, C., Brown, B., Reed, E., Lowe, G. McKarns, S., Fulp, C., Coggins, C., Ayres, P. Doolittle, D. 1990. Analysis of cytogenetic effects in bone-marrow cells of rats subchronically exposed to smoke from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Mutat. Res.* 240: 251-257.
- Li, Q., Geiselhart, L., Mittler, J., Mudzinski, S., Lawrence, D., Freed, B. 1996. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hidroquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139: 158-165.
- Lioi, M., Scarfi, M., Santero, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di-Berardino, D., Ursini, M. 1998. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. *Mutat. Res.* 403: 13-20.
- Liou, S., Lung, J., Chen, Y., Yang, T., Hsieh, L., Chen, C., Wu, T. 1999. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res.* 59: 1481-1484.
- Lohani, M., Dopp, E., Becker, H., Setha, K., Schiffmann, D., Rahman, Q. 2002. Smoking enhances asbestos-induced genotoxicity, relative involvement of chromosome 1: a study using multicolor FISH with tandem labeling. *Toxicol. Lett.* 136: 55-63.
- Lopez-Hellin, J., Garcia-Arumi, E., Schwartz, S. 1998. Oxidative stress induces age-dependent changes in lymphocyte protein synthesis and second messenger levels. *Life Sci.* 63: 13-21.
- Lucero, L., Pastor, S., Suárez, S., Durbán, R., Gómez, C., Parrón, T., Creus, A., Marcos, R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.* 464: 255-262.
- Maffei, F., Forti, G., Castelli, E., Stefanini, G., Mattioli, S., Hrelia, P. 2002. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 514: 49-58.
- Maiuf, S., Erdtmann, B. 2000. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 471: 21-27.

- Marshall, R., Murphy, M., Kirkland, D., Bentley, K. 1996. Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutat. Res.* 372: 233-245.
- Medina-Navarro, R., Lifshitz, A., Wachter, N., Hicks, J. 1997. Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. *Arch. Med. Res.* 28: 205-208.
- Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V., Lorge, E. 1997. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test : industrial experience. *Mutat. Res.*392: 45-59.
- Mohtashampur, E., Norpoth, K., Straeter, H. 1987. Clastogenic effect of passive smoking on bone marrow polychromatic erythrocytes of NMRI mice. *Toxicol. Lett.* 35: 153-156.
- Montes, A., Valencia, E., Terán, L., Martínez, L. 1998. Cotinina urinaria como indicador de la cesación del habito tabáquico. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*11: 96-101.
- Morrison, R., Boyd, R. 1998. *Química organica*. 5ª edición. Addison-Wesley Iberoamericana. México. 1477 p.
- Nersessian, A, Arutyunyan, R. 1994. The comparative clastogenic activity of mainstream tobacco smoke from cigarettes widely consumed in Armenia. *Mutat.Res.* 321: 89-92.
- Nordenson, I., Beckman, L., Liden, S., Stjernberg, N. 1984. Chromosomal aberrations and cancer risk. *Hum. Hered.* 34: 76-81.
- O'Donoghue, J., Barber, E., Hill, T., Aebi, J., Fiorica, L. 1999. Hydroquinone: Genotoxicity and prevention of genotoxicity following ingestion. *Food Chem. Toxicol.* 37: 931-936.
- Oesch, F., Hengstler, J., Fuchs, J. 1994. Cigarette smoking protects mononuclear blood cells of carcinogen exposed workers from additional work exposure-induced DNA single strand breaks. *Mutat. Res.* 321: 175-185.
- OIT, 2001. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 3ª edición. Capitulo 33 "Toxicología" [En línea] <http://www.mtas.es/insh/EncOIT/pdf/tomo1/33.pdf> . Consultado julio 2004.
- OMS 2003. Informe sobre la salud en el mundo 2003. [En línea] <http://www.who.int/whr/2003/es/> Consultado junio 2004.
- Otsuka, R. 2001. Acute effects of passive smoking on the coronary circulation in healthy young adults. *JAMA.* 286: 436-441.
- Pacheco, A., Hackel, C. 2002. Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cadernos de Saude Publica* 18: 1675-1683.
- Palus, J., Rydzynskia, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan A., Nilsson R. 2003. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res.* 540: 19-28.

- Pardell H. 1996. Manual de diagnóstico y tratamiento del tabaquismo. Ed. Panamericana. Madrid, España. 196p.
- Pastor, S., Creus, A., Xamena, N., Siffel, C., Marcos, R. 2002. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a hungarian population study using the micronucleus. *Environ. Mol. Mutag.* 40: 101-109.
- Pastor, S., Creus, A., Parron, T., Cebulka-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, S., Marcos, R. 2003. Biomonitoring of four european populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18: 249-258.
- Patterson, F., Benowitz, N., Shields, V., Jepson, C., Wileyto, P., Kucharski, S., Lerman, C. 2003. Individual differences in nicotine intake per cigarette. *Cancer Epid. Biomar. & Prev.* 12: 468-471.
- Pilger, A., Kohler, I., Stettner, H., Mader, R., Rizovski, B., Terkola, R., Diem, E., Franz-Hainzl, E., Konnaris, C., Valic, E., Rudiger, H. 2000. Long-term monitoring of sister chromatid exchanges and micronucleus frequencies in pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73: 442-448.
- Pinto, D., Ceballos, J., García, G., Guzman, P., Del Razo, L., Vera, E., Gómez, H., García, A., Gonshebb, M. 2000. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutat. Res.* 467: 105-111.
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J., Anderson, D. 1999. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutat. Res.* 440: 195-204.
- Prather, R., Tu, T., Rolf, C., Gorsline, J. 1993. Nicotine pharmacokinetics of Nicoderm (nicotine transdermal system) in women and obese men compared with normal sized men. *J. Clin. Pharmacol.* 33: 644-649.
- Quadri, R., Arbogast, A., Phelouzat, M., Boutet, S., Plastre, O., Proust, J. 1998. Age-associated decline in cdk1 activity delays cell cycle progression of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 161: 5203-5204.
- Rojas E., Valverde, M., Sordo, M., Ostrosky-Wegman P. 1996. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 370: 115-120.
- Romanova, O., Bezdobna, L. 2001. Spontaneous frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of Kiev residents. *Tsitologija i Genetika.* 35: 56-58.
- 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.
- Rothfub, A., Dennog, C., Speit, G. 1998. Adaptative protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 19: 1913-1917.
- Salamanca, F. 1990. Citogenética humana, fundamentos y aplicaciones clínicas. Editorial Medica Panamericana. México. 450 p.

- Salamanca, F. 1995. Alteraciones cromosómicas en el cáncer humano. *Salud Publica Mex.* 37: 162-170.
- Sánchez, R. 2004. Evaluación de daño genotóxico en un grupo de mujeres fumadoras que asisten a la clínica Anti-tbaco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Sánchez-Rodríguez, M., Retana-Ugalde, R., Ruiz-Ramos, M., Muñoz-Sánchez, J., Vargas-Guaderrama, L., Mendoza-Núñez, V. 2005. Efficient antioxidant capacity against lipid peroxide levels in healthy elderly of Mexico City. *Environ. Res.* 47: 322-329.
- Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Bellon, L., Pompili, J., Sapin, C., Botta, A. 2002. Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 521: 37-46.
- 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 abril 2003.
- Scarfì, M., Lioi, M., Della-Noce, M., Zeni, O., Franceschi, C., Monti, D., Castellani, G., Bersani, F. 1997. Exposure to 100 Hz pulsed magnetic fields increases micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43: 77-81.
- Schiffli, C., Zieres, C., Zankl, H. 1997. Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutat. Res.* 389: 243-246.
- Schulz, J. 1980. *Cytogenetics-plants, animals, humans*. Springer Verlag. New York, USA. 446p.
- Secretaría de Salud. 2001. Programa de Acción: Adicciones. Tabaquismo. México. [En línea] [www.ssa.gob.mx/unidades/conadic/index.html](http://www.ssa.gob.mx/unidades/conadic/index.html). Consultado diciembre 2002.
- Secretaría de Salud. 2002. Encuesta Nacional de Adicciones 2002. Tabaco, alcohol y otras drogas, resumen ejecutivo. [En línea]. <http://www.conadic.gob.mx/fileinclude.asp?inc=ena2002.raw> Consultado junio 2004.
- Seifert, B. 1993. *Environmental carcinogens methods of analysis and exposure measurement*. International Agency for Research on Cancer. Oxford University Press. Nueva York, USA. 384p.
- Sepulveda J. 2002. La epidemia del tabaquismo en las Americas. *Salud Pública Mex.* 44: 7-10.
- Settle, F. 1997. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. Prentice Hall. Nueva Jersey. USA. 995 p.
- SGR. 1988. The health consequences of smoking. Nicotine addiction. A report of the Surgeon General. [En línea]. [http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr\\_1988/](http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr_1988/). Consultado septiembre 2002.
- Sierra, M., Guzmán-Grenfell, A., Olivares-Corichi, I., Torres, Y., Hicks, J. 2004. participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 17: 135-148.

- Slozina, N., Neronova, E., Kharchenko, T., Nikiforov, A. 1997. Increased level of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators 6-10 years after the accident. *Mutat. Res.* 379: 121-125.
- Somorovska, M., Szabova, E., Vodicka, P., Tulinska, J., Barancokova, M., Fabry, R., Liskova, A., Riegerova, Z., Petrovska, H., Kubova, J., Rausova, K., Dusinska, M., Collins, A. 1999. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat. Res.* 445: 181-192.
- Sopori, M., Savage, S., Christner, R., Geng, Y., Donaldson, L. 1993. Cigarette smoke and the immune response: Mechanism of nicotine-induced immunosuppression. *Adv. Biosci.* 86: 663-672.
- Stoichev, I., Todorov, D., Christova, L. 1993. Dominant-lethal mutations and micronucleus induction in male BALB/c, BDF1 and H mice by tobacco smoke. *Mutat. Res.* 319: 285-92.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., Marcos, R. 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 341: 169-184.
- Surrallés, J., Natarajan, A. 1997. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat. Res.* 392: 165-174.
- Suter, P., Spitzbarth, A., Gautschi, K., Erdmenger, L., Vonderschmitt, D., Vetter, W. 1995. Cotinine-a useful biomarker for tobacco use? *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* 84: 821-825.
- Swan, G., Habina, K., Means, B., Jobe, J., Esposito, J. 1993. Saliva cotinine and recent smoking-evidence for a nonlinear relationship. *Pub. Health Rep.* [En linea] [http://www.findarticles.com/p/articles/mi\\_m0835/is\\_n6\\_v108/ai\\_14750056/pg-2](http://www.findarticles.com/p/articles/mi_m0835/is_n6_v108/ai_14750056/pg-2). Consultado noviembre 2004.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A., Smith, M. 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat. Res.* 388: 85-95.
- Tomanin, R., Ballarin, C., Nardini, B., Mastrangelo, G., Sarto, F. 1991. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis* 6: 123-126.
- Tomei, F., Rosati, M., Baccolo, T., Bernardini, A., Ciarrocca, M., Caciari, T., Tomao, E. 2004. Response of lympho-monocytes to phytohemagglutinin in urban workers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17: 13-18.
- Trivedi, H., Dave, B., Adhvaryu, S. 1990. Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test system. *Cancer Lett.* 54: 89-94.
- Trivedi, A., Dave, B., Adhvaryu, S. 1993. Genotoxic effects of nicotine in combination with arecoline on CHO cells. *Cancer Lett.* 74: 105-110.

- Tyrpie, K., Wielkoszyskia, T., Janoszka, B., Dobosza, C., Bodzeka, D., Stplewskib, Z. 2000. Application of liquid separation techniques to the determination of the main urinary nicotine metabolites. *J. Chromatogr.* 870: 29–38.
- Vlachodimitropoulos, D., Norppa, H., Autio, K., Catalan, J., Hirvonen, A., Tasa, G., Uuskuela, M., Demopoulos, N., Sorsa, M. 1997. GSTT1-dependent induction of centromere-negative and –positive micronuclei by 1,2:3,4-diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 12: 397-403.
- Wall, M., Johnson, J., Jacob, P., Benowitz, N. 1988. Cotinine in the serum, saliva, and urine of nonsmokers, passive smokers, and active smokers. *Am. J. Public Health* 78: 699-701.
- Warangkana, P., Christine, S. 2004. Environmental Sampling & Monitoring Primer. "Gas chromatography". [En linea] [http://www.cee.ut.edu/program\\_areas/environmental/teach/smprimer/gc/gc.html](http://www.cee.ut.edu/program_areas/environmental/teach/smprimer/gc/gc.html). Consultado octubre 2004.
- WHO. 1999. International consultation on environmental tobacco smoke (ETS) and child health. WHO Tobacco free initiative, WHO/NCD/TFI/99.10. [En linea] [http://www.who.int/tobacco/health\\_impact/youth/ets/en/ETSreport.pdf](http://www.who.int/tobacco/health_impact/youth/ets/en/ETSreport.pdf). Consultado septiembre 2004.
- Woggner, S., Wong, X. 1994. Effects of nicotine on proliferation of normal, malignant, and human papillomavirus-transformed human cervical cells. *Gynecol. Oncol.* 55: 91-95.
- Yildiz, D. 2004. Nicotina, its metabolism and overview of its biological effects. *Toxicol.* 43: 619-632.
- Zapata, C., Zapata, N., Gonzalez, A. 1982. Clastogenic chromosomal aberrations in 26 individuals accidentally exposed to ortho dichlorobenzene vapors in the National Medical Center in Mexico City. *Arch. Environ. Health* 37: 231-235.
- Zhao, X., Niu, J., Wang, Y., Yan, C., Wang, X., Wang, J. 1998. Genotoxicity and chronic health effects of automobile exhaust: a study on the traffic policemen in the city of Lanzhou. *Mutat. Res.* 415: 185-190.

## APÉNDICE

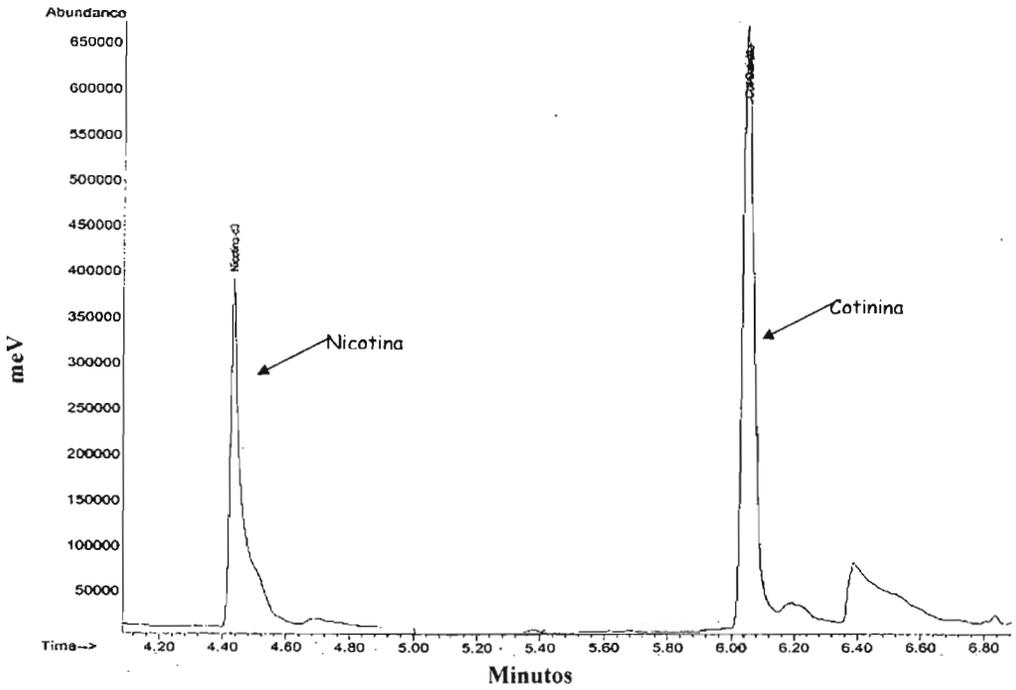


Figura 11. Cromatograma mostrando los tiempos de retención (en minutos) para nicotina y cotinina así como la abundancia absoluta expresada en meV.

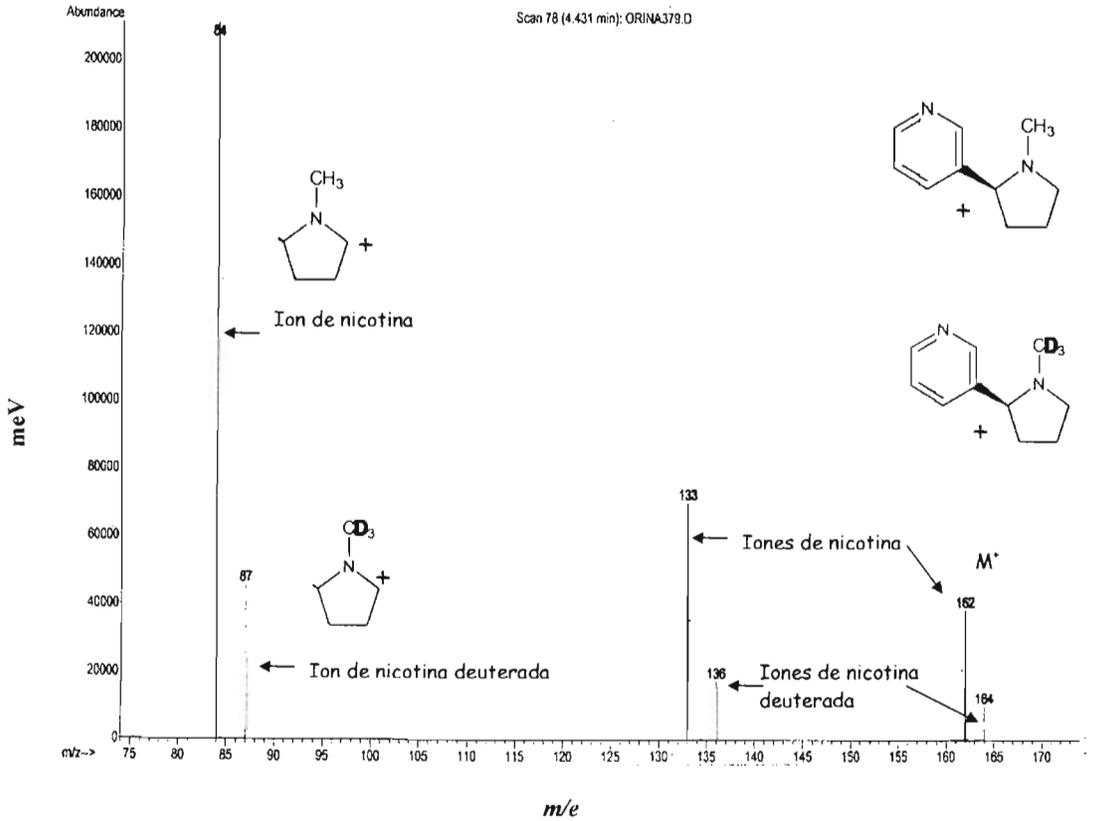


Figura 12. Espectro de masas para nicotina obtenida de la orina de un fumador. Se muestran las abundancias de los iones obtenidos de la nicotina y de los iones del estándar interno. También se incluyen representaciones moleculares de algunos de los iones encontrados. M<sup>+</sup> representa los iones moleculares.

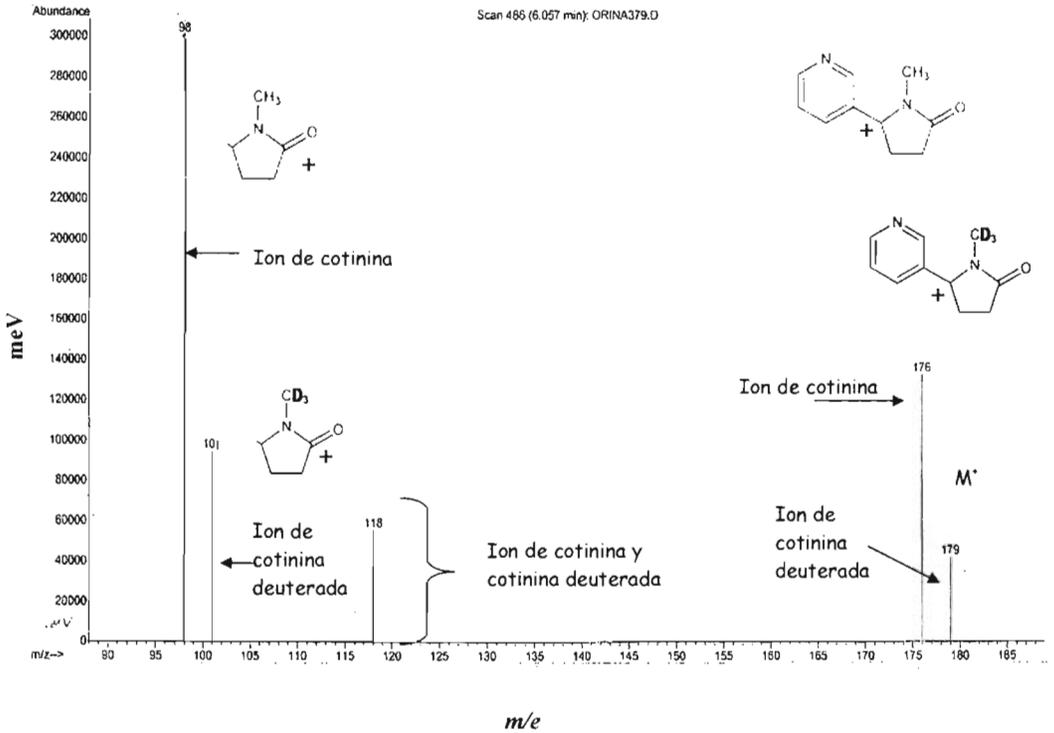


Figura 13. Espectro de masas para cotinina obtenida de la orina de un fumador. Se muestran las abundancias de los iones obtenidos de la cotinina y del estándar interno. También se incluyen representaciones moleculares de algunos de los iones encontrados. En el caso del ion central de  $m/e$  118, la señal es la misma para ambos compuestos, lo cual indica que la porción deuterada no esta incluida.  $M^+$  representa los iones moleculares.

**Cuadro 16. Valores de referencia, encontrados por otros investigadores en fumadores, para los mismos parámetros evaluados en esta tesis.**

	<b>n</b>	<b>MN totales (Promedio ± DE) x 1000 células</b>	<b>Autor</b>
Fumador	3	13.00 ± 4.0	Pitarque <i>et al.</i> , 1999
No-fumador	8	12.38 ± 1.9	
Fumador	3	3.30 ± 2.1	Burgaz <i>et al.</i> , 1999
No-fumador	10	2.60 ± 1.6	
Fumador	6	40.00 ± n.e	Lohani <i>et al.</i> , 2002
No-fumador	6	20.00 ± n.e	
Fumador	27	7.50 ± 4.06	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumador	16	5.28 ± 3.32	
	<b>n</b>	<b>BN con MN (Promedio ± DE) x 1000 células</b>	<b>Autor</b>
Fumador	12	1.48 ± 1.1	Karahalil <i>et al.</i> , 1998
No-fumador	18	1.60 ± 0.5	
Fumador	19	3.89 ± 2.4	Zhao <i>et al.</i> , 1998
No-fumador	15	2.26 ± 1.14	
Fumador	3	11.33 ± 3.18	Pitarque <i>et al.</i> , 1999
No-fumador	8	10.25 ± 1.18	
Fumador	27	7.25 ± 3.72	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumador	16	5.00 ± 2.89	
Fumador	79	4.04 ± 3.27	Barale <i>et al.</i> , 1998
No-fumador	275	4.82 ± 3.50	
Fumador Pasivo	46	8.00 ± n.e	Baier <i>et al.</i> , 2002
No-fumador	46	6.20 ± n.e	
	<b>n</b>	<b>IDN (Promedio ± DE)</b>	<b>Autor</b>
Fumador	27	1.86 ± n.e	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumador	16	1.85 ± n.e	
	<b>n</b>	<b>IBPC (Promedio ± DE)</b>	<b>Autor</b>
Fumador	3	1.94 ± 0.08	Pitarque <i>et al.</i> , 1999
No-fumador	8	1.99 ± 0.05	

n.e. No especificado. El artículo no reporta esta información.

Cuadro 17. Valores reportados por otros investigadores en fumadores expuestos adicionalmente a otros agentes genotóxico para los mismos parámetros evaluados en esta tesis.

Agente o condición evaluada		n	MN totales (Promedio ± DE) x 1000 células	Autor
Fumadores	Aeropuerto	22	7.14 ± 0.49	Pitarque <i>et al.</i> , 1999
No-fumadores		17	8.24 ± 0.91	
Fumadores	Asbesto	6	63.32 ± 3.91	Lohani <i>et al.</i> , 2002
No-fumadores		6	62.48 ± 5.96	
Fumadores	Plomo	22	19.18 ± 5.37	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumadores		8	17.13 ± 3.76	
Fumadores	Cadmio	10	16.50 ± 3.63	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumadores		12	15.27 ± 5.98	
Agente o condición evaluada		n	BN con MN (Promedio ± DE) x 1000 células	Autor
Fumadores	HAP	13	1.93 ± 0.08	Karahalil <i>et al.</i> , 1998
No-fumadores		40	1.84 ± 0.04	
Fumadores	Tráfico carretero	45	6.95 ± 2.37	Zhao <i>et al.</i> , 1998
No-fumadores		22	3.50 ± 8.50	
Fumadores	Aeropuerto	22	6.77 ± 0.47	Pitarque <i>et al.</i> , 1999
No-fumadores		17	7.47 ± 0.79	
Fumadores	Plomo	22	16.82 ± 4.32	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumadores		8	15.38 ± 3.34	
Fumadores	Cadmio	10	10.06 ± 2.02	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumadores		12	13.27 ± 4.61	
Agente o condición evaluada		n	IDN (Promedio ± DE)	Autor
Fumadores	Plomo	28	1.87 ± n.e	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumadores		8	1.86 ± n.e	
Fumadores	Cadmio	10	1.92 ± n.e	Palus <i>et al.</i> , 2003
No-fumadores		12	2.00 ± n.e	
Agente o condición evaluada		n	IBPC (Promedio ± DE)	Autor
Fumadores	Aeropuerto	22	1.88 ± 0.02	Pitarque <i>et al.</i> , 1999
No-fumadores		17	1.91 ± 0.03	

n.e: No especificado. El artículo no incluye esa información.

**Cuadro 18. Valores reportados de otros agentes genotóxicos con efecto en los parámetros evaluados en esta tesis**

Agente o condición evaluada	n	MN totales (Promedio $\pm$ D.E) x 1000 células	Autor
Radiación	22	12.3 $\pm$ 1.2	Slozina <i>et al.</i> , 1997
Testigo	14	10.6 $\pm$ 1.7	
Epiclorhidrina	14	21.2 $\pm$ 8.4	Hindsólandin <i>et al.</i> , 1997
Testigo	14	15.9 $\pm$ 8.4	
Gasolina	19	29.00 $\pm$ 11.00	Buckvic <i>et al.</i> , 1998
Testigo	22	18.00 $\pm$ 6.00	
Ambiente de fabrica cuero	26	3.5 $\pm$ n.e	Somorovska <i>et al.</i> , 1999
Testigo	19	1.0 $\pm$ n.e	
Rayos x	17	12.3 $\pm$ 7.1	Sari-Minodier <i>et al.</i> , 2002
Testigo	17	7.3 $\pm$ 3.2	
Campos magnéticos de baja frecuencia	10	15.7 $\pm$ 5.3	Scarfí <i>et al.</i> , 1997
Testigo	10	9.1 $\pm$ 3.8	
Antineoplasicos	16	23.3 $\pm$ 7.5	Pilger <i>et al.</i> , 2000
Testigo	16	21.2 $\pm$ 7.2	
Ejercicio intenso	6	18.6 $\pm$ n.e	Schiffel <i>et al.</i> , 1997
Testigo	6	12.3 $\pm$ n.e	
Tritio	24	35.0 $\pm$ 19.0	Joksic <i>et al.</i> , 1998
Residentes Kiev	102	10.5 $\pm$ 0.5	Romanova <i>et al.</i> , 2001
Pesticidas	76	10.22 $\pm$ 0.81	Pastor <i>et al.</i> , 2002
Testigo	53	10.30 $\pm$ 0.97	
Agente o condición evaluada	n	BN con MN (Promedio $\pm$ D.E) x 1000 células	Autor
Radiación	31	16 $\pm$ 9	Chang <i>et al.</i> , 1997
Testigo	31	9 $\pm$ 4	
Epiclorhidrina	14	18.5 $\pm$ 7.8	Hindsólandin <i>et al.</i> , 1997
Testigo	14	14.8 $\pm$ 7.6	

Cáncer de nuca	57	18.0 ± 15.2	Duffaud <i>et al.</i> , 1999
Testigo	198	9.7 ± 2.8	
Obreros invernadero	64	9.53 ± 0.86	Lucero <i>et al.</i> , 2000
Testigo	50	7.90 ± 0.1	
Antineoplásicos	10	19.2 ± 9.31	Maluf <i>et al.</i> , 2000
Testigo	10	11.5 ± 5.21	
Malatión	24	18.0 ± 8.6	Titenko-Holland <i>et al.</i> , 1997
testigo	10	20.1 ± 9.1	
Agroquímicos	30	14.31 ± n.e	Pacheco <i>et al.</i> , 2002
Testigo	30	7.10 ± n.e	
Leprosos bajo tratamiento	50	19.92 ± 2.56	Kalaiselvi <i>et al.</i> , 2002
Testigo	50	1.60 ± 0.23	
Alcohólicos	20	12.05 ± 5.43	Maffei <i>et al.</i> , 2002
Testigo	20	7.60 ± 1.57	
Pesticidas	76	9.30 ± 0.70	Pastor <i>et al.</i> , 2002
Testigo	53	9.15 ± 0.91	
<b>Agente o condición evaluada</b>	<b>n</b>	<b>IBPC (Promedio ± D.E)</b>	<b>autor</b>
Obreros invernadero	64	1.86 ± 0.022	Lucero <i>et al.</i> , 2000
Testigo	50	1.82 ± 0.025	
Campos magnéticos baja frecuencia	10	1.79 ± 0.15	Scarfi <i>et al.</i> , 1997
Testigo	10	1.65 ± 0.15	
Alcohólicos	20	1.44 ± 0.13	Maffei <i>et al.</i> , 2002
Testigo	20	1.37 ± 0.05	
Pesticidas	76	1.32 ± 0.01	Pastor <i>et al.</i> , 2002
Testigo	53	1.51 ± 0.02	

n.e. No especificado. El artículo no reporta esta información.

No se reporta información para IDN.

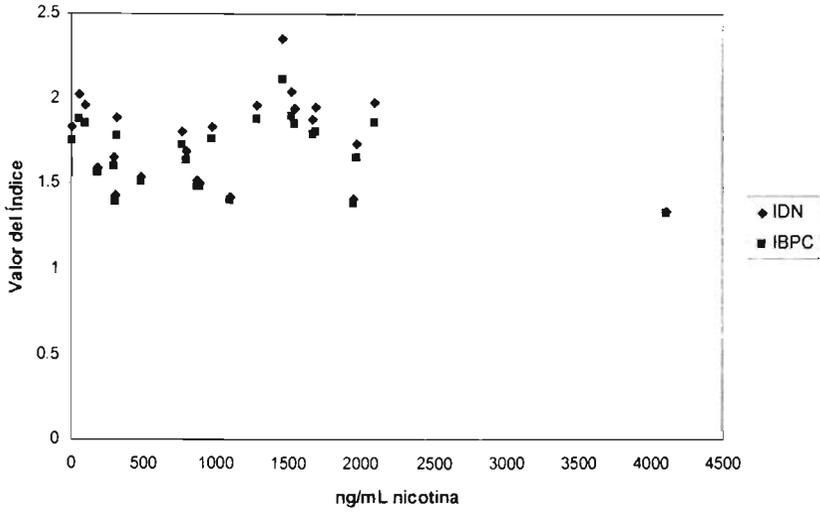


Figura 14. IDN e IBPC contra nivel de nicotina en orina de fumadores activos

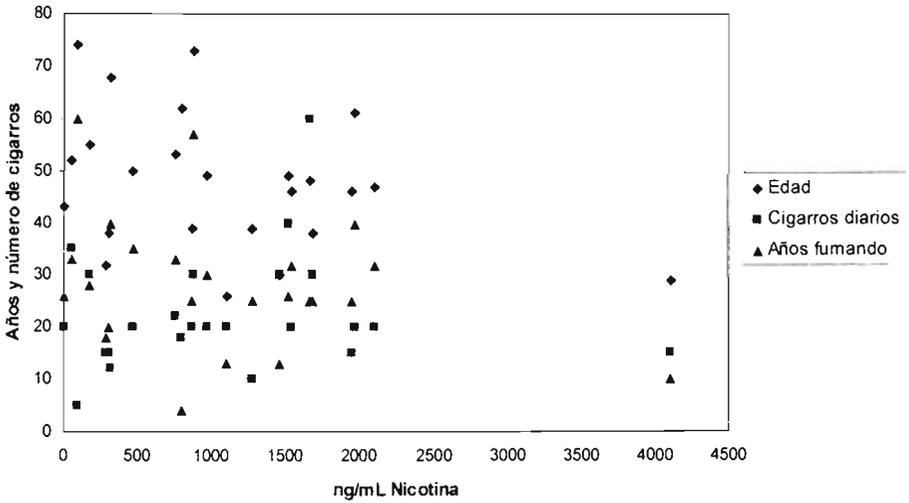


Figura 15. Edad, cigarros y tiempo fumando contra nivel de nicotina en orina de fumadores activos



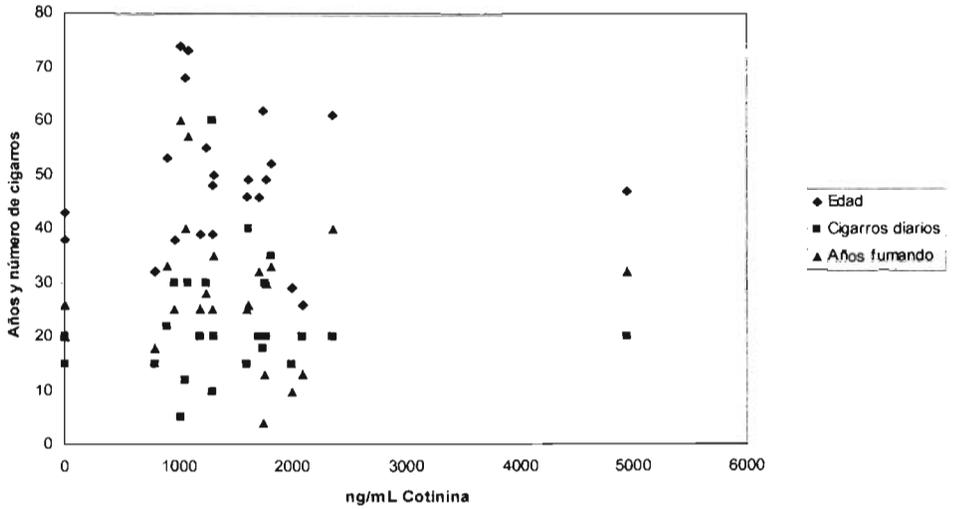


Figura 18. Edad, cigarros y tiempo fumando contra nivel de cotinina en orina de fumadores activos