

**ALTERACIONES EN LA FRECUENCIA DE ABERRACIONES
CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS DE JÓVENES FUMADORES DE
CIGARRILLO**

YEXANIA YUTRY ARBOLEDA MORENO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2003**

**ALTERACIONES EN LA FRECUENCIA DE ABERRACIONES
CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS DE JÓVENES FUMADORES DE
CIGARRILLO**

YEXANIA YUTRY ARBOLEDA MORENO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo**

Director

Mg. Luz Stella Hoyos

ASESORES

Mg. Silvio Carvajal

Ph.D. Hernán Sierra

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2003**

Nota de aceptación

Director Mg. Luz Stella Hoyos

Firma del jurado

Firma del jurado

Popayán Septiembre 8 de 2003

Con Amor

A mis padres Luis Hernando y Nilsa

A mis hermanos Fabián y Luis

A mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial agradezco a todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de este estudio.

A MIS PADRES Y HERMANOS, por su profundo e incondicional amor, por el apoyo que han brindado durante toda mi vida, permitiendo mi realización personal y profesional.

A MI FAMILIA, por su enseñanza, entrega y especialmente por confiar en mi.

A la Mg. LUZ STELLA HOYOS, profesora de Genética de la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación, Directora de este trabajo, por su gran ejemplo de constancia en el trabajo, apoyo, calidad humana y enseñanza.

Al Mg. SILVIO CARVAJAL, profesor de Genética de la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación, Asesor de este trabajo, por su amistad, apoyo y ejemplo a nivel profesional.

Al Ph.D. HERNAN SIERRA, director de investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Salud, Asesor de este trabajo, por su colaboración incondicional y asesoría en esta investigación y por su guía como un gran profesional

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LABORATORIO, por su incondicional apoyo

A LAS DIFERENTES DEPENDENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA, la Vicerrectoría de Investigaciones y Administrativa, la Fundación de Apoyo y al Museo de Historia Natural, por su apoyo financiero.

Y agradezco de manera muy especial a los participantes de esta investigación, por su colaboración.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. IMPACTO	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 OBJETIVO GENERAL	23
5.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	23
6. ANTECEDENTES	24
7. MARCO REFERENCIAL	27
7.1 COMPONENTES DEL CIGARRILLO	27
7.2 EL CIGARRILLO Y LOS PROBLEMAS DE SALUD	28
7.3 UTILIDAD DE LOS LINFOCITOS EN MONITOREO GENÉTICO	29

7.4 MONITOREO	30
7.4.1 Monitoreo ambiental	30
7.4.2 Monitoreo biológico	31
7.5 BIOMARCADORES	31
7.5.1 Biomarcadores de exposición	31
7.5.2 Biomarcadores de efecto	32
7.5.3 Biomarcadores de susceptibilidad	34
8. CÁNCER ASOCIADO AL CONSUMO DE CIGARRILLO	36
9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	39
9.1 TIPO DE ESTUDIO	39
9.2 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	39
9.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	40
9.4 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO EN LINFOCITOS	40
9.5 EXTRACCIÓN DE ADN	41
9.6 COSECHA CELULAR	41

9.7 COLORACIÓN DIFERENCIAL DE LAS PLACAS	41
9.8 ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO	42
9.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
10. RESULTADOS	43
10.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	43
10.2 EFECTO GENOTÓXICO DE LA ADICCIÓN AL CIGARRILLO	44
11. DISCUSIÓN	52
12. CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	62

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Carcinógenos del humo del cigarrillo en pulmón.	28
Tabla 2. Características de la población de estudio.	44
Tabla 3. Efecto del consumo de cigarrillo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas.	46

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Linfocitos humanos de sangre periférica	30
Figura 2. Tipo de daño cromosómico estructural	33
Figura 3. Proceso de la carcinogénesis	37
Figura 4. Protocolo para cultivo de aberraciones cromosómicas	40
Figura 5. Número promedio de quiebres cromatídicos según grupo de adicción al cigarrillo	46
Figura 6. Número promedio de quiebres cromosómicos según grupo de adicción al cigarrillo	47
Figura 7. Numero promedio de aberraciones cromosómicas totales según grupo de adicción	47
Figura 8. Análisis de correlación lineal entre el numero promedio de aberraciones cromosómicas y paquetes – años de consumo de cigarrillo	48
Figura 9. Célula metafásica de linfocitos humanos.	49
Figura 10. Células metafásicas en primer y segundo ciclo de división celular marcadas con BrdU.	49
Figura 11. Células metafásicas de linfocitos humanos con quiebres cromatídicos	50
Figura 12. Célula metafísica de linfocitos humanos con quiebres cromosómicos	51

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A Consentimiento informado	62
Anexo B Modelo de encuesta	63
Anexo C Modelo de tabla de registro de aberraciones cromosómicas	70

RESUMEN

El consumo de cigarrillo es una de las principales causas de mortalidad relacionadas con cáncer principalmente de pulmón, lo cual constituye una de las mayores preocupaciones de la salud pública a nivel mundial. En Colombia se ha observado un incremento en el consumo de cigarrillo especialmente en jóvenes entre los 10 y 24 años de edad. En la ciudad de Popayán el consumo de cigarrillo es la segunda sustancia psicoactiva legal de mayor consumo. El humo del cigarrillo es una mezcla compleja de más de 4.000 compuestos diferentes, y de los que se han identificado 60 compuestos como carcinógenos.

El propósito de ese estudio fue evaluar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica en jóvenes consumidores de cigarrillo en la ciudad de Popayán, empleando la prueba citogenética de aberraciones cromosómicas (AC). Las AC como biomarcador de efecto y de exposición, es indicador de daños genéticos tempranos que permite evaluar y predecir riesgos de salud por exposición a agentes genotóxicos, para tomar medidas preventivas que reduzcan los posibles riesgos de salud. La población objeto de estudio incluyó 32 fumadores y 32 no fumadores de cigarrillo entre 19 - 29 años de edad, con un mínimo de exposición de 4 años. El análisis de los datos mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.000$) entre la frecuencia promedio de AC de fumadores (8.91 ± 0.87) respecto a los no fumadores (4.56 ± 0.53). El incremento en la frecuencia de AC en los fumadores de cigarrillo indica el efecto genotóxico que este produce, incrementando el riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer. Se realizó la extracción de ADN para futuros estudios moleculares de polimorfismo genético que permitan relacionar los efectos genotóxicos (AC) de las personas con genes del metabolismo (activación y detoxificación) y la reparación de daños en el ADN, factores moduladores de la respuesta biológica a la exposición del humo del cigarrillo.

El estudio constituye un gran aporte a la literatura científica ya que en Colombia no existen reportes en la población juvenil consumidora de cigarrillo. Los resultados complementan datos de otro estudio realizado en una población mayor de 30 años de edad. La socialización de estos resultados permite motivar a los jóvenes a evitar el consumo de cigarrillo como estrategia de prevención a un problema de salud ambiental como el cáncer.

INTRODUCCIÓN

Varios estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre el consumo de cigarrillo y el desarrollo de cáncer (IARC, 1986). Actualmente la incidencia de cáncer asociada al consumo de cigarrillo, es una de las principales preocupaciones de salud pública a nivel mundial. Según datos estadísticos en los Estados Unidos se reportan 400.000 muertes por año causadas por enfermedades relacionadas con el consumo de cigarrillo; y en América Latina se registran 150.000 muertes por tal causa (Cifras del Tabaquismo, 2000). En los últimos años, el consumo de cigarrillo ha incrementado especialmente en la población juvenil (NIDA, 1999). En Colombia, en una encuesta sobre consumo de sustancias psicoactivas en jóvenes entre 10 – 24 años de edad, se encontró que cerca del 68.7% eran consumidores de cigarrillo (OCCSP, 2001) esto asociado a factores como la publicidad del consumo de cigarrillo que ha tenido gran acogida en el mercado. La ciudad de Popayán presenta datos donde el consumo de cigarrillo es la segunda sustancia psicoactiva legal de mayor consumo después del consumo de alcohol (RUMBOS, 2001).

El cáncer más frecuente por efecto del consumo de cigarrillo es el cáncer de pulmón (87%), aunque también se encuentran otros como el cáncer de laringe, boca, esófago, y lengua (American Cancer Society, 1996).

El cigarrillo es una mezcla de más de 4000 químicos diferentes entre ellos sustancias dañinas como el monóxido de carbono, el alquitrán, la nicotina y se han identificado 60 sustancias carcinógenas como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA), las nitrosaminas (NNK), entre otras. Las sustancias químicas que contiene el cigarrillo pueden interactuar y alterar macromoléculas como el ADN y proteínas, alterar las funciones normales de las células, e iniciar potenciales riesgos de salud (Hoffmann and Hecht, 1990).

El cáncer es un proceso de múltiples estadios (iniciación, promoción y progresión), donde compuestos como las nitrosaminas, 4-(metilnitrosamina)-1-(3piridil)-butanona (NNK), los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHAS), y Benzo (a) pireno, inducen una serie de alteraciones genéticas específicas como las anormalidades cromosómicas (Klung, *et al*; 1999). Estas anormalidades han sido evaluadas mediante pruebas citogenéticas como aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y micronúcleos (Mn), pruebas de gran relevancia y sensibilidad.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de jóvenes fumadores de cigarrillo, en la ciudad de Popayán. Para ello se calculó la frecuencia de aberraciones cromosómicas de los jóvenes fumadores de cigarrillo y de los no fumadores con rango de edad entre 19 a 29 años y con un mínimo de exposición de 4 años.

La prueba de aberraciones cromosómicas (AC) es muy importante en el estudio ya que permite evaluar la totalidad del genoma para la identificación de químicos mutagénicos y carcinogénicos (Au, 1991). Además, se ha demostrado que las AC se hallan asociados a diferentes enfermedades como cáncer, abortos y enfermedades genéticas (Rowley, 1982; Yamamoto *et al*, 1982; Jacobs *et al*, 1974).

Los resultados de esta investigación, complementan datos de dos estudios realizados previamente en una población consumidora de cigarrillo mayor de 30 años de edad. Los estudios antes mencionados hacen parte de la base de datos del grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación de la Universidad del Cauca, el cual se propone evaluar los efectos genotóxicos por el consumo de sustancias psicoactivas como el cigarrillo y el bazuco en la población caucana. Estas investigaciones permitieron la extracción de ADN para futuros estudios de polimorfismo genético y así relacionar susceptibilidad genética al consumo de cigarrillo.

El desarrollo metodológico se inició con una motivación a diferentes grupos de personas donde se da a conocer la importancia y objetivos del mismo, luego se realizó una encuesta donde se tienen en cuenta aspectos como estilo de vida, historia ocupacional, familiar, exposición al cigarrillo y la historia médica, para así seleccionar la población a estudiar. Una vez firmado el consentimiento voluntario por las personas seleccionadas fumadores (32) y no fumadores sanos (32), se procedió a tomarles una muestra de sangre de 20 ml. Se hizo cultivos de 52h para AC y se extrajo el ADN. El registro de AC se realizó en 150 células de primer ciclo por individuo. Para el análisis estadístico se empleó análisis de varianza (ANOVA), correlación y regresión con el programa SPSS.

La investigación es de gran importancia ya que en Colombia no se han realizado estudios como este en la población juvenil. Además a nivel internacional los científicos están muy interesados en conocer este tipo de estudios en diferentes poblaciones y realizar comparaciones entre ellas.

Los resultados obtenidos se darán a conocer mediante la participación en seminarios para motivar y diseñar estrategias de prevención de posibles riesgos de salud a largo plazo en jóvenes consumidores de cigarrillo. El ADN almacenado permitirá, en una segunda fase del estudio, realizar los polimorfismos genéticos en la población de estudio y asociarlos con las diferentes respuestas biológicas (AC) por el consumo de cigarrillo e identificar individuos más o menos susceptibles a los riesgos de salud.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de cigarrillo es una de las más importantes y principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. Es bien conocido que el fumar no sólo puede causar cáncer de pulmón, sino también en otros órganos como boca, lengua, esófago, laringe, cerebro y vejiga (American Cancer Society, 1996). Motivo de gran preocupación en la salud pública.

La complejidad de compuestos que contiene el humo de cigarrillo, genera gran confusión acerca de los mecanismos por los cuales causa cáncer de pulmón. De los numerosos compuestos del cigarrillo, 60 han sido identificados como carcinógenos (Hoffman, 1997). Esto implica la necesidad de evaluar los compuestos restantes en cuanto a su potencial mutagénico y/o carcinogénico.

En la actualidad muchas investigaciones indican que el cigarrillo es el causante de una serie de problemas de salud tales como accidentes cerebro vasculares, síntomas de abstinencia, infecciones respiratorias en los niños, muerte infantil súbita, pérdida de vitaminas y antioxidantes como la vitamina A importante en el mantenimiento de los pulmones (Varela, 2002).

Debido a tal problemática y a la alta prevalencia de tabaquismo y sobre todo el incrementando consumo en jóvenes (NIDA, 1999), es necesario seguir evaluando los efectos dañinos del cigarrillo como son las alteraciones cromosómicas muy relacionados con diferentes problemas de salud. Además se ha evidenciado que ciertas anormalidades genéticas encontradas en fumadores de cigarrillo con cáncer de pulmón son diferentes a las observadas en los no fumadores con cáncer (Sánchez, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) presenta cifras y estimaciones inquietantes y revelan que las muertes asociadas al consumo de cigarrillo aumentarán en los países en desarrollo; de la cifra de un millón al año, a comienzos de los 90, a dos millones en el año 2000 y a siete millones dentro de veinte o treinta años. Según el informe de la OMS, aproximadamente más de tres millones de personas mueren al año por enfermedades asociadas al cigarrillo (Khor, 1996).

En Colombia, el consumo de cigarrillo ha incrementado en los jóvenes; siendo la segunda sustancia psicoactiva de mayor consumo. En 1998 se reportaron 22.000 muertes de colombianos por causas atribuibles al cigarrillo, según los datos presentados por el DANE. Y es aún más preocupante el incremento en el número de nuevos casos de cáncer de pulmón, especialmente en la población masculina (Ministerio de Salud, 1998). Son pocos los estudios realizados en Colombia sobre el efecto genotóxico que produce el cigarrillo. Aún así existen dos estudios realizados al respecto en personas mayores de 30 años en la ciudad de Popayán y no se han reportado resultados sobre el efecto genotóxico del cigarrillo en jóvenes (Sierra 1999; López 2001).

El estudio en personas jóvenes consumidoras de cigarrillo de la ciudad de Popayán, permitió complementar y sacar conclusiones relevantes sobre los efectos genotóxicos del cigarrillo; para así poder conocer y comprobar que la frecuencia de alteraciones cromosómicas en los fumadores es mayor que en los no fumadores de cigarrillo y relacionar los efectos genotóxicos con los polimorfismos genéticos que serán realizados en una segunda fase del presente estudio.

2. JUSTIFICACIÓN

El consumo de cigarrillo es reconocido desde hace varios años como un problema de salud pública, ya que es el responsable de un gran número de muertes reportadas a nivel mundial. El cigarrillo representa el mayor factor de riesgo de prevalencia de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados (Khor, 1996); debido a que el cigarrillo contiene muchas sustancias químicas que son dañinas para el organismo. Los riesgos a los que se hallan expuestos los fumadores son bien extensos ya que son muchas las sustancias que el cigarrillo contiene y que pueden interactuar con nuestro organismo, afectando cualquier órgano del cuerpo. A pesar de conocer los riesgos y la problemática actual que produce el consumo de cigarrillo, no se han tomado las medidas correctas de prevención. Datos estadísticos muestran el incremento en el consumo en los últimos años, especialmente en la población juvenil (NIDA, 1999).

En un estudio realizado por el Instituto de Investigación Social de la Universidad de Michigan (NIDA,1999), sobre uso de drogas y actitudes asociadas en los adolescentes de los Estados Unidos, se reportó que desde 1975 los cigarrillos han sido la sustancia constantemente usada a diario por el mayor número de estudiantes de secundaria en los Estados Unidos. Además, se ha encontrado gran relación entre el uso de cigarrillo y el uso de sustancias alucinógenas como la marihuana y el consumo de bebidas alcohólicas, factores que posibilitan riesgos de salud a más temprana edad. Ya que existe mayor mortalidad entre quienes comienzan a consumir cigarrillos alrededor de los 15 años de edad que entre los que lo hacen después de los 25 años (Salazar, 2001).

En Colombia el cigarrillo es la segunda sustancia legal de mayor consumo en los jóvenes y son pocos los reportes sobre el efecto genotóxico que este produce (Rumbos, 2001). A nivel de la población juvenil no hay antecedentes al respecto, por esta razón el estudio es fundamental ya que permitió inicialmente evaluar las alteraciones genéticas en linfocitos de fumadores jóvenes de la ciudad de Popayán; producidas por el consumo de cigarrillo mediante el muestreo de esta población, aplicando la prueba citogenética de aberraciones cromosómicas (AC). Por otra parte se extrajo ADN para posteriores análisis de polimorfismo genético.

Investigaciones como esta son de gran importancia para el país porque permiten conocer reportes de la incidencia y los efectos genéticos causados por el consumo de cigarrillo a nivel de nuestra población. Ya que actualmente sólo se conocen marcos referenciales de otros países, quienes han desarrollado investigaciones de

este tipo. De tal manera se podrá evaluar y tomar las medidas de prevención respectivas a problemas de salud e incentivar la reducción del consumo de cigarrillo, ya que abarca otra serie de problemas de tipo familiar y social. La conducta que toman los adolescentes frente a este hecho es negativa, además varias investigaciones indican que los jóvenes suelen ser resistentes a muchos tipos de mensajes en contra del cigarrillo (NIDA, 1999)

Los resultados sirven para evaluar y comparar la frecuencia de alteraciones genéticas de los fumadores con reportes de otras poblaciones y realizar posteriores análisis de susceptibilidad entre diferentes poblaciones.

3. IMPACTO

La evaluación del daño cromosómico causado por el consumo de cigarrillo en jóvenes de la ciudad de Popayán, es de gran importancia en muchos aspectos tales como: a nivel científico, social y económico.

A nivel científico, este tipo de investigación es fundamental ya que contribuye a determinar el número basal de aberraciones cromosómicas (AC) en nuestra población y de igual manera conocer e identificar los efectos genotóxicos causados por el consumo de cigarrillo en nuestra población, de tal forma que nos permitan crear nuevas estrategias frente a esta problemática, ya que no se conocen reportes hasta el momento de la población latina. En Colombia, se han realizado hasta el momento dos estudios en una población fumadora mayor de 30 años. A nivel internacional, hay varios investigadores y laboratorios interesados en conocer este tipo de reportes, para llevar a cabo análisis entre diferentes poblaciones y a su vez observar susceptibilidad genética entre individuos consumidores de cigarrillo.

A nivel social, la problemática del cigarrillo es una causa de gran preocupación. Es necesario seguir evaluando los posibles efectos genotóxicos que pueda causar y ver la influencia en las generaciones futuras, para prevenir los posibles riesgos de salud. Es importante de igual manera, tomar las medidas de prevención para disminuir su consumo y los posibles riesgos de salud.

El consumo de cigarrillo conlleva a una serie de graves problemas a nivel económico tanto en la familia como en la sociedad. Un aspecto de gran interés para el gobierno es la disminución de costos que se emplean para la salud, en la población que sufre de enfermedades costosas como el cáncer, por ello una propuesta interesante planteada por el Dr Willian Au es el de invertir en la investigación para prevenir riesgos de salud y así disminuir costosos tratamientos clínicos para la familia y el gobierno (Au, 1999).

4. HIPÓTESIS

El cigarrillo es una mezcla compleja de sustancias, de las cuales algunas son carcinogénicas por su habilidad de interactuar y alterar el material genético (ADN) expresado como aberraciones cromosómicas. Por ello, se espera que al analizar los linfocitos de sangre periférica de personas consumidoras de cigarrillo, se encuentre una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas (quiebres cromatídicos y cromosómicos) respecto a los no fumadores. Además se espera un incremento en la proporción promedio de AC/célula/individuo respecto al número de cigarrillos consumidos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar e identificar las alteraciones genéticas en linfocitos de sangre periférica en personas jóvenes consumidoras de cigarrillo en la ciudad de Popayán.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar la proporción promedio de aberraciones cromosómicas / célula entre los fumadores de cigarrillo (grupo experimental) y los no fumadores de cigarrillo (grupo control).

Correlacionar la proporción promedio de AC / célula / individuo con el número de años de consumo de cigarrillo y número de cigarrillos por día.

Contribuir a la formación del Banco de ADN en la Unidad de Toxicología Genética y Citogenética para futuros estudios.

Fortalecer la base de datos de fumadores de la Unidad para estudios prospectivos.

Divulgar los resultados en seminarios y congresos.

6. ANTECEDENTES

En la historia de la epidemiología del cáncer, el efecto carcinogénico del tabaco es el descubrimiento más importante. Durante la década de 1950 los británicos y americanos reportaron que el humo del cigarrillo es el principal factor de desarrollo de cáncer de pulmón; debido al incremento en el consumo de cigarrillo observado durante y después de la primera guerra mundial. En América ocurrieron cambios similares 20 años más tarde durante la segunda guerra mundial, donde se incrementó el consumo de cigarrillo (Peto, 2001).

En 1989, el Director General de Salud Pública de los Estados Unidos publicó un informe en el que se determinó que los cigarrillos y otros productos del tabaco son adictivos, siendo la nicotina la sustancia responsable de la adicción, también se reportó que el tabaquismo era una causa importante de accidentes cerebro vasculares y ocupaba el tercer lugar entre las principales causas de muertes en los Estados Unidos (NIDA, 1999).

A nivel mundial el cáncer de pulmón asociado al consumo de cigarrillo produce la muerte de más de un millón de personas al año. Sólo en los Estados Unidos en el año 1999, se reportaron cerca de 158.900 muertes por cáncer de pulmón (Landis, 1999). Muchos estudios epidemiológicos han establecido claramente que el humo de cigarrillo es la mayor causa de cáncer de pulmón. Se ha estimado que cerca del 90% de los hombres y el 75-80% de las mujeres mueren por cáncer de pulmón en los Estados Unidos cada año causadas por el cigarrillo (Surgeon General, 1989; Shopland, 1995). En Colombia el cáncer de tráquea y de pulmón es la tercera causa de muerte entre hombres y la cuarta entre mujeres. La tasa de mortalidad ha aumentado más del 100% en los últimos treinta años, asociado al consumo de cigarrillo (Medina, 1994). Sin embargo el cáncer de pulmón no sólo depende de esta causa, algunos científicos han sugerido diferencias significantes en la susceptibilidad individual a desarrollar cáncer (Fraumeni, 1975; Mulvihill, 1976). Además, varios estudios epidemiológicos han demostrado un excesivo riesgo de cáncer de pulmón en algunas familias, presentándose una predisposición hereditaria (Tokuhata and Lilenfeld, 1963; Ooi et al., 1986; Sellers et al, 1992).

Es de gran importancia comparar resultados entre diferentes poblaciones ya que existen reportes contradictorios en la literatura en cuanto al potencial genotóxico del cigarrillo. Por ejemplo, en algunos estudios no se encontró incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de fumadores respecto a

los no fumadores (Obe, 1978; Sinues; 1990). En un estudio realizado en 1997 sobre predisposición genética e incremento de aberraciones cromosómicas en fumadores de cigarrillo con cáncer, se encontró una alta frecuencia de aberraciones estructurales en, seguido por los fumadores sin cáncer y finalmente por los no fumadores. (Conforti *et al*, 1997). Además se encontró que la frecuencia de aberraciones estaba influenciada por la herencia de genes polimórficos de la glutatión S- transferasa. (Conforti *et al*, 1997).

Otro estudio realizado en Estados Unidos, en mujeres jóvenes fumadoras y no fumadoras de los Estados Unidos entre los 16 y 25 años de edad sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de sangre periférica, se encontró un incremento significativo de ICH en las mujeres que consumían cigarrillo. También se analizó la frecuencia de aberraciones cromosómicas, donde no se encontró diferencia estadística entre las mujeres fumadoras y las no fumadoras. El incremento significativo en los ICH pueden indicar que daños iniciales en el ADN en muchas de estas mujeres probablemente ya hayan ocurrido, causando un riesgo potencial a desarrollar cáncer más adelante (Rowland, 1999).

En el Instituto de Salud Ambiental e Ingeniería en China, se realizó un estudio donde se emplearon dos pruebas citogenéticas, aberraciones cromosómicas y micronúcleos para evaluar el daño producido en el material genético de hombres fumadores y los resultados muestran que hay un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromatídicas, cromosómicas y en la frecuencia de micronúcleos en los fumadores respecto a los no fumadores de cigarrillo. Indicando que el cigarrillo es uno de los factores mutagénicos que causan daño en el material genético humano (Jin, 1997).

En Colombia, se conoce que el consumo de cigarrillo es una de las principales amenazas a la salud pública ya que 6 de las 10 causas de mortalidad están asociadas con el consumo de cigarrillo (Liga Colombiana de Lucha contra el Cáncer, 1986), pero son muy pocas las investigaciones sobre los daños genéticos que este produce. Se conocen datos de dos estudios realizados en 1999 en la ciudad de Popayán en la Universidad del Cauca, uno realizado sobre alteraciones en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de fumadores de cigarrillo, en personas mayores de 30 años, encontrándose un incremento significativo de aberraciones cromosómicas en los fumadores de cigarrillo comparados con los no fumadores (Sierra, 1999). En las mismas personas se realizó otro estudio donde se aplicó la prueba de intercambio de cromátidas hermanas, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa, en los fumadores que en los no fumadores de cigarrillo (López, 1999). Según estos

resultados el cigarrillo es un potencial genotóxico en las personas mayores de 30 años que lo consumen.

Esta investigación se basó en analizar la frecuencia de daño causada en la población juvenil entre los 19 a 29 años de edad consumidora de cigarrillo, para así realizar comparaciones entre las dos poblaciones muestreadas.

7. MARCO REFERENCIAL

7.1 COMPONENTES DEL CIGARRILLO

El humo del cigarrillo es una mezcla compleja de sustancias que se encuentra en dos formas, la fase de partículas que emerge de la boca en forma de aerosol y la fase de vapor que esta conformada por gases como nitrógeno, oxígeno y monóxido de carbono. La fase de partículas está constituida por más de 4.000 compuestos (Hoffmann *et al*, 1990). Los principales efectos causados por el cigarrillo son producidos por:

La nicotina (alcaloide) ocupa un porcentaje de 1-2% de un cigarrillo; es decir, un cigarrillo normal de un gramo contiene más o menos 10-20 mg de nicotina. Esto significa que 1-2 mg (10%) pasaran al humo. La nicotina es una sustancia adictiva pero no causa efectos genotóxicos, actúa como estimulante y sedante del sistema nervioso central; además se absorbe con facilidad del humo en los pulmones sin importar si procede de cigarrillos o de tabacos.

El monóxido de carbono, compite por la hemoglobina y se fija más eficazmente que el oxígeno, impidiendo el suministro de oxígeno y como consecuencia los músculos se fatigan más fácilmente. Por ello, la gente fumadora tiene un mal rendimiento físico. El alquitrán es una mezcla de más de 1.000 químicos. Este incluye una variedad de irritantes y de algunos carcinógenos conocidos. El alquitrán se deposita en los pulmones y en el sistema respiratorio, los cuales son absorbidos gradualmente por el resto del cuerpo (Salazar, 2001).

Otras de las sustancias constituyentes del humo del cigarrillo son: amoníaco, acetona, benceno, DDT, mercurio, formaldehido, cromo, metanol, níquel, carcinógenos conocidos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs, por ejemplo benzo [a] pireno [BaP]), aminas heterocíclicas (tales como 2-amino-1-metyl-6-fenylimidazol [4,5-*b*] piridina [PhIP] y 2-amino-3-metylmidazol [4,5-*f*]quinolina [IQ], aminas aromáticas (por ejemplo, 4-aminobifenil), y nitro-PAHs (incluyendo 1-nitropireno, 4-nitropireno, 1,6-nitropireno) (ver tabla 1) (Hoffmann *et al*, 2001).

Entre los hidrocarburos policíclicos aromáticos PAHs, el benzo [a] pireno [BaP] es el compuesto más estudiado, y tiene la habilidad de inducir cáncer de pulmón.

Dentro de las nitrosaminas, la N-nitrosodiethylamina es un carcinógeno de pulmón efectivo en hamster, pero no en ratas. Las nitrosaminas específicas del tabaco NNK son un potente carcinógeno de pulmón en ratas, ratones y hamster (Hecht, 1999).

Tabla 1. Carcinógenos del humo de cigarrillo en pulmón.

Tipo de Carcinógenos	Compuestos	Cantidad de humo de cigarrillo inhalado ng/cigarrillo	Especies representativas con cáncer de pulmón
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Benzo [a] pireno	20-40	Ratón, rata, hamster
	Benzo [b] fluoranteno	4-22	Rata
	Benzo [j] fluoranteno	6-21	Rata
	Benzo [k] fluoranteno	6-12	Rata
	Dibenzo [a,i] pireno	1.7-3.2	Hamster
	Indeno [1,2,3-cd] pireno	4-20	Rata
	Dibenzo [a,h] antraceno	4	Ratón
	5-Metilcriseno	0.6	Ratón
Asz-Arenos	Dibenz [a,h] acridina	0.1	Rata
	7H-Dibenzo [c,g] carbazol	0.7	Hamster
N-Nitrosaminas	N-Nitrosodiethylamina	*ND-2,8	Hamster
	4-(Metilnitrosamino) –1-(3-piridyl) –1-butanona (NNK)	80-770	Ratón, rata, hamster
Compuestos orgánicos	1,3-Butadieno	20-70*10 ³	Ratón
	Ethyl carbamato	20-38	Ratón
Compuestos inorgánicos	Niquel	0-510	Rata
	Cromio	0.2-500	Rata
	Cadmio	0-6670	Rata
	Polonio-210	0.03-1.0pCi	Hamster
	Arsénico	0-1400	Ninguno
	Hidracina	24-43	Ratón

*ND = No Detectable

Fuente:Hecht S. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer 1999.

7.2 EL CIGARRILLO Y LOS PROBLEMAS DE SALUD

El consumo de tabaco ha sido muy controvertido. En la década de 1960 los científicos llegaron a la conclusión que el fumar tabaco especialmente en la forma de cigarrillos, podría ocasionar cáncer, enfermedades del corazón y otras

enfermedades más. Razón por la cual algunos fabricantes de cigarrillos resolvieron reducir su contenido de alquitrán y nicotina. Sin embargo, los médicos aseguran que estas medidas no han logrado eliminar los riesgos de fumar (NIDA, 1999).

Muchas investigaciones han verificado la relación entre el humo de cigarrillo y el cáncer. Varios compuestos del cigarrillo (60) han sido evaluados por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) como carcinogénicos, de los cuales hay suficientes evidencias de carcinogenicidad en animales y humanos (Hoffmann and Hecht, 1990).

Varios estudios en fumadores activos en poblaciones de diferentes países muestran una evidencia directa, la asociación causal entre el humo de cigarrillo y el desarrollo de cáncer. Esta evidencia incluye una tendencia de la mortalidad por cáncer de pulmón asociada con el incremento de consumo de cigarrillo, mayor riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón en fumadores de ambos sexos observadas en varios estudios independientes retrospectivos y prospectivos. Además se demostró una relación dosis – respuesta respecto a la intensidad y duración de consumo de cigarrillo y los tipos de cáncer (EPA, 1992).

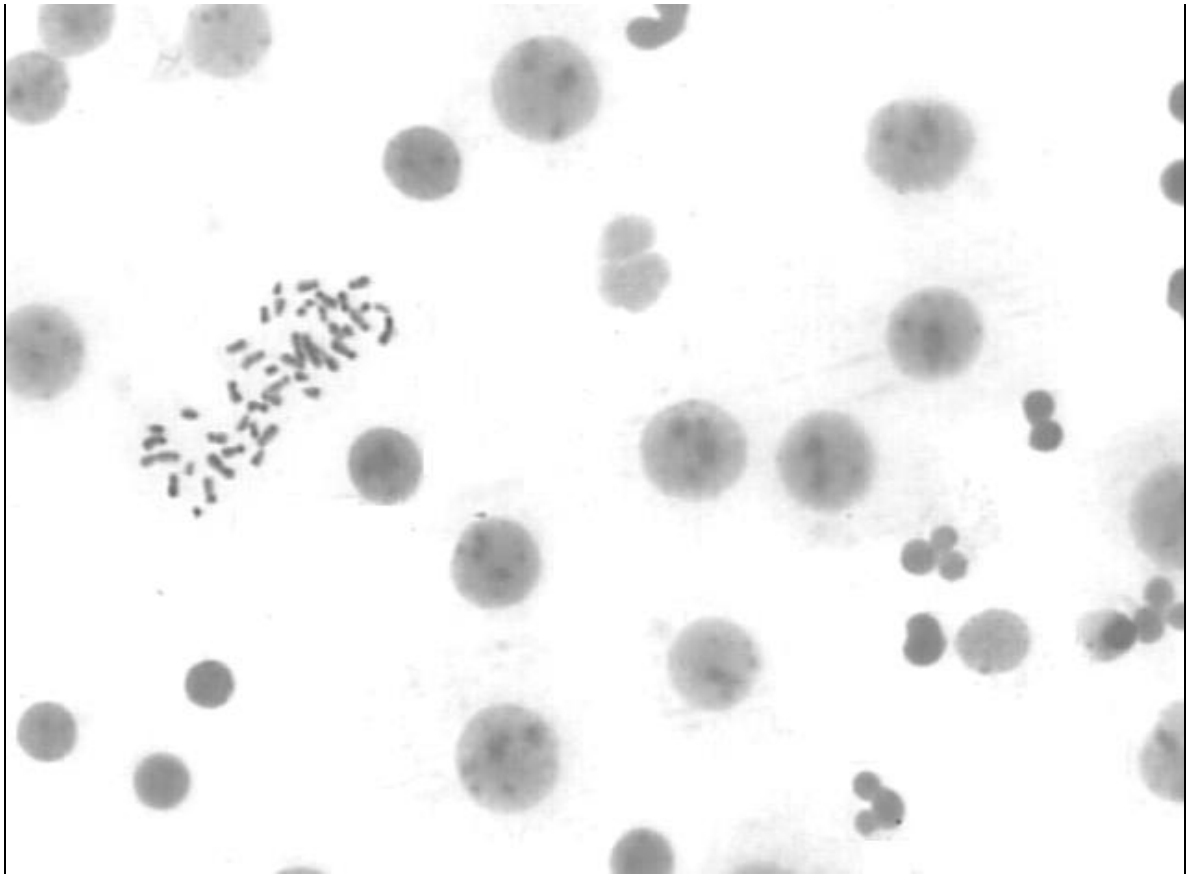
7.3 UTILIDAD DE LOS LINFOCITOS EN MONITOREO GENÉTICO

El linfocito es un tipo de célula humana que sirve como centinela para realizar estudios de monitoreo genético, ya que estas células circulan a través del cuerpo, pueden ser consideradas como un monitor interno sin especificidad de órgano.

Las células se encuentran en un estado no proliferativo, tienen una vida media de aproximadamente 4 meses y algunas duran décadas (ver figura 1). Pueden acumular daños por exposiciones repetidas, ya que son células que se encuentran en un estado de latencia (GO) y son ideales para detectar daños por exposición crónica a bajas dosis de agentes potencialmente genotóxicos (Au, 1991).

Los linfocitos de sangre periférica son frecuentemente empleados en los estudios de monitoreo, por ser obtenidos en forma no invasiva y son social y éticamente aceptados.

Figura 1: Linfocitos humanos de sangre periférica



7.4 MONITOREO

Los estudios de monitoreo de poblaciones permiten analizar si la exposición a diferentes químicos, como los que contiene el cigarrillo, producen alteraciones al organismo que puedan detectarse mediante análisis químicos, biológicos o genéticos de los individuos en una población expuesta. La finalidad del monitoreo es determinar si la exposición a agentes químicos produce algún tipo de daño temprano y relacionarlo con posibles efectos en la salud. El monitoreo puede ser de tipo ambiental o de tipo biológico.

7.4.1 Monitoreo ambiental. En el ambiente existen diferentes agentes que pueden interactuar con el organismo y alterar el buen funcionamiento de las

células y órganos. El monitoreo ambiental es el más empleado para evaluar exposición ocupacional. Mediante el empleo de métodos analíticos se puede conocer los químicos que se encuentren en el ambiente y así determinar los posibles riesgos en la salud en personas expuestas en las diferentes áreas de trabajo (Hoyos, 2002).

7.4.2 Monitoreo biológico. El monitoreo biológico permite determinar las concentraciones de los compuestos o sus metabolitos, en diferentes medios biológicos como sangre, plasma, orina, aire expirado, esputo, pelo, saliva, leche materna y sudor. Con ello se determina si una población está expuesta a algún químico específico y sus posibles riesgos.

Mediante el monitoreo biológico se emplean biomarcadores citogenéticos que permiten identificar posibles daños causados en el material genético (ADN) por un agente externo, en individuos o poblaciones expuestas. Los biomarcadores citogenéticos más frecuentemente empleados son las aberraciones cromosómicas (AC), los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y los micronúcleos (MN); las cuales permiten determinar si el químico es potencialmente mutagénico o carcinogénico. Se monitorean alteraciones de tipo estructural (quebres) o de tipo numérico (aneuploidias y poliplodias) que pueden estar relacionados con algún tipo de enfermedad.

7.5. BIOMARCADORES

Los biomarcadores se han usado en estudios epidemiológicos desde hace décadas. El uso de biomarcadores se emplea específicamente como medida de eventos biológicos, y de los cuales se conoce la relación entre el evento inicial, la exposición y el efecto (enfermedad) (Bonassi, 1999).

Los biomarcadores se emplean con el fin de evaluar exposición, detectar efectos tempranos, y susceptibilidad entre los individuos, poblaciones y grupos étnicos expuestos a determinado agente, con el fin de identificar potenciales riesgos de salud a mediano y largo plazo.

7.5.1 Biomarcadores de exposición. Los biomarcadores de exposición, permiten evaluar e identificar agentes físicos o químicos que se encuentren en el ambiente y que están interactuando con macromoléculas como el ADN, proteínas de individuos o poblaciones expuestas.

Dentro de los biomarcadores de exposición se encuentran, los marcadores de exposición externa y los marcadores de exposición interna. Los biomarcadores de exposición externa son identificados por la medición cuantitativa y cualitativa del agente en el ambiente. Los biomarcadores de exposición interna permiten identificar compuestos o sus metabolitos en fluidos y tejidos de organismos expuestos (Hoyos, 2002).

Los aductos de ADN, son un tipo de biomarcador de exposición, ya que expresan la cantidad de metabolitos que se unen al ADN (lesiones primarias). La prueba de aductos es altamente sensitiva y específica a la exposición y expresan exposición reciente (Mooney *et al*, 1995). Otro tipo de biomarcador es el intercambio de cromátidas hermanas (ICH); su incremento en las células indica una alta exposición ambiental.

7.5.2 Biomarcadores de efecto. Los biomarcadores de efecto son cambios cualitativos o cuantitativos, identificados en los seres vivos, que permiten predecir posibles riesgos de salud como el cáncer. Entre los biomarcadores de efecto más frecuentemente empleados en los estudios de monitoreo se encuentran: los aductos, mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas y micronúcleos.

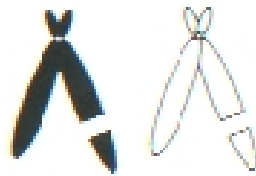
Las aberraciones cromosómicas son daños irreversibles usados como biomarcadores e indicadores de exposición y de efecto en una población expuesta a agentes genotóxicos y por lo tanto, un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas constituye una medida potencial de riesgo de salud en personas expuestas. Las AC pueden ser la causa de diversos problemas de salud como cáncer, problemas reproductivos, defectos genéticos transmisibles y no transmisibles, abortos, problemas de esterilidad y otras enfermedades genéticas.(Rowley,1982; Yamamoto *et al* 1983; Jacobs *et al* , 1974).

La prueba de aberraciones cromosómicas identifica alteraciones de tipo numérico y de tipo estructural, causados por un agente genotóxico. Las alteraciones numéricas son cambios a nivel del número cromosómico, con una adición o disminución de cromosomas a nivel de pares (aneuploidias) o a nivel de juegos cromosómicos (euploidías o poliplodias). Las alteraciones estructurales son aquellas que presentan algún tipo de cambio en la estructura del cromosoma que se pueden manifestar en una sola cromátida si el daño ocurrió después del periodo de replicación del ADN (quiebres cromatídicos) (ver figura 11), o en ambas cromátidas si la lesión ocurrió en el periodo presintético (quiebres cromosómicos) (ver figura 12) también se pueden formar cromosomas dicéntricos y anillos, entre otros (Salamanca, 1990) (ver figura 2). Es claro que el tipo de daño cromosómico que se presente depende del agente causante, bien sea un agente químico, físico o biológico.

Figura 2. Tipo de daño cromosómico estructural



Quiebre Cromosómico



Quiebre
Cromatídico



Cromosoma
Dicéntrico

Fuente: Au W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. Occupational medicine, 1991.

La prueba de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos es muy relevante porque evalúa daños genéticos de lesiones primarias no reparadas y acumuladas durante varios años de exposición antes de la prueba y expresados luego de suceder una primera división *in vitro* (Conforti *et al*, 1997).

Las investigaciones de las alteraciones cromosómicas en las neoplasias ha sido importante, especialmente en la última década, ya que ha permitido interesantes avances en el entendimiento del fenómeno de la transformación maligna y ha conducido al descubrimiento de alteraciones citogenéticas útiles en el diagnóstico

y el establecimiento del pronóstico en las leucemias y tumores sólidos, para así conducir adelantos en la prevención y tratamiento del cáncer (Salamanca, 1995).

Los vínculos de las alteraciones cromosómicas con el cáncer se establecieron desde los inicios de la citogenética, al reconocer que las anomalías cromosómicas están asociadas con elevada frecuencia de cáncer (Salamanca, 1995). La hipótesis que las aberraciones cromosómicas están asociadas con el desarrollo de cáncer, se evidencia con cuatro argumentos: (1) Los rearrreglos cromosómicos juegan un importante papel en la activación de protooncogenes y en la activación de genes supresores de tumor; (2) individuos con enfermedades congénitas, tales como la anemia de Fanconi, se caracterizan por una alta frecuencia de AC e incrementa la incidencia de tumores malignos; (3) alteraciones en cariotipos se han encontrado en todos los tipos de células neoplásicas y (4) son a menudo altamente específicas para diagnósticos particulares (Dave *et al*, 1995).

En un estudio de cohorte prospectivo (1978-1986), realizado por un grupo Nórdico, con 3.182 individuos, se encontró una asociación lineal estadísticamente significativa ($P = 0,0009$) entre daño cromosómico en linfocitos de sangre periférica y el riesgo de desarrollar cáncer. El tamaño de la muestra no fue lo suficientemente grande para evaluar ni para determinar si las mismas asociaciones existían para ICH y Mn (Hagmar *et al*, 1994). Un estudio similar realizado por un grupo italiano, determinó que las AC están asociadas con cáncer (Bonassi *et al*, 1995); e igualmente, un estudio caso – control realizado en taiwaneses, reveló similares resultados (Liou *et al*, 1998).

7.5.3 Biomarcadores de susceptibilidad. Los biomarcadores de susceptibilidad son indicadores de la habilidad o limitación de un organismo para responder a la exposición de agentes xenobióticos, y explica las diferencias entre individuos o poblaciones en la respuesta biológica a los agentes tóxicos ambientales (Au *et al*, 1996; El-Zein, 1997; Garte *et al*, 1997; Shen *et al*, 1998).

Los biomarcadores de susceptibilidad permiten identificar polimorfismo de genes que regulan el metabolismo, la reparación del ADN, oncogenes y protooncogenes y el sistema inmunológico e identifican individuos o poblaciones más o menos susceptibles genéticamente a problemas de salud.

El uso de biomarcadores permite evaluar los factores ambientales y genéticos asociados al proceso de la enfermedad y tener un aviso temprano sobre los riesgos de salud para la prevención primaria. Su uso significa enfrentarse a estudios mucho más complejos con más alto costo que antes y la necesidad de una estrecha colaboración entre los epidemiólogos y profesionales de otras disciplinas tales como la toxicología genética (Kogevinas M, 2001).

8. CÁNCER ASOCIADO AL CONSUMO DE CIGARRILLO

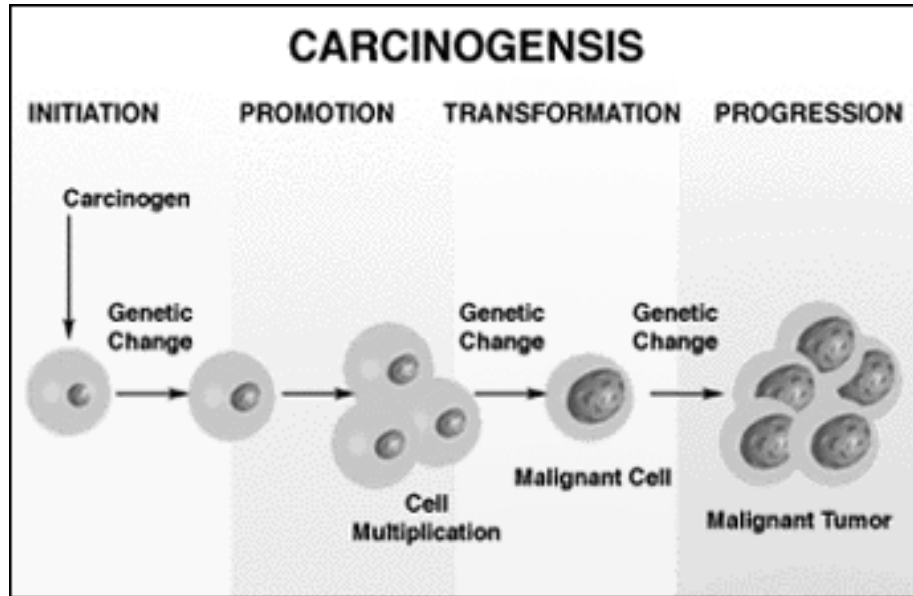
El cáncer es un complejo grupo de enfermedades que afecta a las distintas células y tejidos del cuerpo. Se caracteriza por un crecimiento y una multiplicación celular descontrolados y por la capacidad de estas células para producir metástasis en otras partes del cuerpo.

El cáncer constituye un proceso de múltiples estadios (iniciación, promoción y progresión), que se inicia por una primera mutación (genética, genómica o cromosómica) (ver figura 3). La primera fase, iniciación de un tumor es la alteración de la capacidad de proliferación de una célula como resultado de una mutación en uno de los genes que la controlan. Esta célula "iniciada" crece con una velocidad ligeramente superior a las normales, y puede pasar inadvertida durante un período muy largo.

La segunda fase, promoción, es el proceso durante el cual el agente promotor estimula el crecimiento de las células iniciadas. Este aumento de células con una mutación favorece la posibilidad de que alguna de las células acumule una serie de alteraciones genéticas cuyo resultado es un incremento más agresivo en cada mutación que la haga crecer aún más deprisa, ya que la división celular aumenta el riesgo de adquirir mutaciones.

La tercera fase es la progresión tumoral o adquisición de nuevas alteraciones genéticas que provocan un aumento de la malignidad, con adquisición de capacidad invasiva y metastásica, permitiendo a las células desprenderse del tumor primario y trasladarse a lugares secundarios donde forman nuevos tumores malignos (Salamanca, 1990; Cummings, 1995; CNIO, 2002).

Figura 3. Proceso de la carcinogénesis



Fuente: <URL:<http://www.livercancer.com/images/carcinogenesis.gif.htm>>.

Múltiples causas inciden en el desarrollo de cáncer porque puede ser inducido por agentes físicos, químicos o biológicos y en algunos casos la exposición combinada de agentes carcinogénicos incrementan el riesgo de cáncer.

Además existen varios factores que están asociados al proceso de la carcinogénesis. El factor hereditario (familiar), cuando el daño es transmitido y heredado por la siguiente generación. El factor ambiental, de gran importancia en el desarrollo del cáncer, donde se encuentran gran número de sustancias como los plaguicidas, compuestos de la polución ambiental, el humo del cigarrillo, entre otros, los cuales contribuyen a la iniciación y promoción del cáncer.

Como se mencionó anteriormente en el humo del cigarrillo se han identificado varios compuestos carcinógenos, comprobados mediante los bioensayos realizados en diferentes animales de laboratorio, así como mediante las pruebas *in vitro*. La carcinogenicidad del cigarrillo se ha demostrado por el efecto genotóxico que produce en las células. El cigarrillo contiene aproximadamente 4000 compuestos, de los cuales 60 son carcinogénicos, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y nitrosaminas (NNK) entre otros (IARC, 1986)

Varios estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos han demostrado la asociación entre el humo del cigarrillo y el desarrollo del cáncer. Existe una

relación dosis– respuesta entre cáncer del pulmón y la cantidad de exposición al humo del cigarrillo (American Cancer Society, 2001).

La mayoría de los cánceres de pulmón, así como una gran cantidad de los tumores cancerosos del labio y la cavidad oral, la laringe, el esófago, el páncreas, el cuello uterino, la vejiga y el riñón se le puede atribuir al hábito de fumar cigarrillo. El consumo del cigarrillo es la causa más evitable de muerte prematura en los Estados Unidos y es la responsable del 30% de todas las muertes por cáncer. En los hispanos, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiacas y el cáncer de pulmón es el tercer tipo de cáncer más común entre los hombres y las mujeres (American Cancer Society, 2001). En Colombia el cáncer de pulmón y tráquea es la tercera causa de muerte por cáncer entre los hombres y la cuarta entre las mujeres (Medina, 1994). El cáncer de pulmón ha incrementado dramáticamente en los últimos años, principalmente en mujeres, debido al incremento de consumo de cigarrillo en la actualidad.

9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un monitoreo genético (*cross sectional*), en una población consumidora de cigarrillo y en su respectivo grupo control, no consumidor de cigarrillo. Estudio que se realizó en la ciudad de Popayán, con la finalidad de evaluar e identificar las alteraciones cromosómicas en los fumadores de cigarrillo.

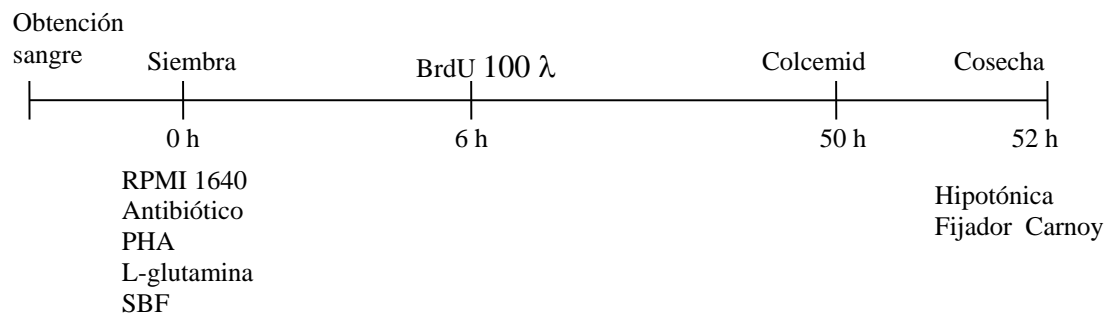
9.2 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

Para la selección de la población se definió como factor de inclusión en el estudio, sólo personas con edades entre 19 a 29 años. Mediante una encuesta corta se entrevistaron 500 personas y se preseleccionaron personas consumidoras y no consumidoras de cigarrillo con base a los criterios de inclusión y de exclusión tales como ser saludables, no consumir drogas psicoactivas, ni haber sufrido de hepatitis. Luego de hacer la preselección se procedió a la motivación individual de los jóvenes sobre el propósito de la investigación, los objetivos, la metodología y la importancia que este implica para la prevención y promoción en la comunidad, además para determinar quienes participarían del estudio. Una vez concluida esta parte las personas firmaron el consentimiento informado (ver anexo A). Luego se aplicó una segunda encuesta más extensa y completa para obtener información sobre: historia personal, de salud, ocupacional y estilo de vida (ver anexo B), la cual permitió seleccionar y clasificar el grupo expuesto (32 fumadores de cigarrillo) y el grupo control (32 no fumadores de cigarrillo). Se formaron parejas lo más parecidas posible entre el grupo control y el expuesto, teniendo en cuenta el estilo de vida, edad, sexo, etc y donde la única variable entre los dos grupos fuese el consumo o no de cigarrillo. La selección de la población consumidora de cigarrillo se hizo teniendo en cuenta el número de cigarrillos consumidos por día (4-5 cigarrillos / día) y el tiempo de consumo (mínimo 4 años de exposición). Esto nos permitió hacer una buena elección tanto del grupo expuesto como del control, para evitar factores que puedan confundir los resultados.

9.3 OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Una vez firmado el consentimiento voluntario por las personas que participaron en el estudio, se tomaron 20 ml de sangre de cada persona con jeringas nuevas previamente heparinizadas para evitar la coagulación, teniendo en cuenta las respectivas medidas de bioseguridad para evitar la contaminación, se procedió al establecimiento de los cultivos *in vitro*.

Figura 4. Protocolo para cultivo de aberraciones cromosómicas



9.4 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE LINFOCITOS

El establecimiento de los cultivos se realizó en la cámara de flujo laminar con todo el material completamente estéril para evitar la contaminación. Se preparó el medio de cultivo completo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, 2mM de L-glutamina 100u/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomina. A cada cultivo de 5 ml se le adicionó 4,5 ml de medio RPMI completo, 0,5 ml de sangre y finalmente se agregó 0,2 ml de fitohemaglutinina. Los cultivos se incubaron a 37°C por 52 horas para aberraciones cromosómicas AC. Después de 6 horas de la siembra, se adicionaron 50ul/5ml de BrdU (Figura, 4), un marcador químico análogo de la timidina, que se incorpora a la célula siendo visible en las metafases lo cual permitió diferenciar las células de primer, segundo y tercer ciclo celular. Este proceso de incorporación de BrdU se debe realizar en completa esterilidad.

9.5 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Salting - out (Miller *et al*, 1988). Se procedió al aislamiento de linfocitos con histopaque. Muestras de sangre de 15 ml fueron procesadas, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, quedando 3 capas visibles precipitadas por diferencia de peso (plasma, histopaque y células rojas), los linfocitos los encontramos entre las dos capas de plasma e histopaque. Se procedió a realizar los lavados con PBS. Una vez aislados los linfocitos se procedió al aislamiento del ADN. Se adicionaron reactivos como buffer lysis, SDS, proteinasa K, RNasa esenciales para la digestión. Luego se incubaron las células durante toda la noche a 37⁰ C y se adicionó NaCl saturado, para facilitar la precipitación de proteínas. Se agitó fuertemente (con un Vortex), para evitar la formación de un gel difícil de separar, luego el ADN fue colocado en hielo durante 15 minutos, se centrifugó y se adicionó etanol absoluto frío, donde se hace visible el ADN. El ADN fue lavado con etanol al 70 %, se dejó secar parcialmente y luego el ADN se suspendió en buffer tris-EDTA para ser incubado durante toda la noche. El ADN fue crío preservado para futuros estudios (Miller *et al*, 1988).

9.6 COSECHA CELULAR

Dos horas antes de iniciar la cosecha, las células de cultivo se trataron con colchicina a una concentración final de 0,1 mg/ml para obtener un buen número de metafases. Los cultivos se centrifugan 800-1000 r.p.m. por 7 minutos. El sobrenadante se descartó con pipeta pasteur, luego se adicionó 6 ml de solución hipotónica (KCl 0,075 M) y se incubó a 37°C por 20 minutos terminado este tiempo se fijaron las células con un ml de fijador Carnoy (metanol: ácido acético, 3:1). Se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se descartó, el botón del precipitado se resuspendió moderadamente y se adicionó 0,5-1ml de solución fijadora agitando fuerte. Rápidamente se adicionó más fijador hasta llegar a un volumen final de 6-7 ml, se dejó reposar de 20 a 30 minutos en el refrigerador, y se centrifugó. El proceso de fijación se repitió tres veces más. Finalmente, se realizó el goteo de linfocitos en portaobjetos limpios y mantenidos en ácido acético al 60%. Se secaron en la plancha a 56⁰ grados centígrados listas para ser coloreadas.

9.7 COLORACIÓN DIFERENCIAL DE LAS PLACAS

Después de tres días de secado las placas fueron coloreadas por el método de coloración diferencial (Goto *et al*, 1978), con el fin de diferenciar metafases en primero, segundo y tercer ciclo de división celular (ver figura 10). Para ello se utilizó una técnica de incorporación con Bromodeoxiuridina. Las placas coloreadas se observaron bajo el microscopio a 100x. Se analizaron 150 metafases completas con 46 cromosomas por persona para el registro de AC y se montaron permanentemente con entellan, se codificaron , y se les realizó doble ciego, para evitar sesgar los resultados.

9.8 ANÁLISIS CITOGENÉTICO

El registro de aberraciones cromosómicas (AC), se realizó en las tablas maestras (ver anexo C), que incluyen quiebres cromatídicos y cromosómicos. Los extendidos metafásicos se analizaron al microscopio ubicando un buen campo de células y metafases en el objetivo de 10 X y luego se pasa al objetivo de 100 X para analizar las AC.

9.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos registrados sobre AC fueron ingresados al computador empleando el programa SPSS para constituir una base de datos que permitió realizar el análisis estadístico mediante las siguientes pruebas: Chi - Cuadrado y prueba T de Studens para determinar la asociación o dependencia entre el factor principal de la investigación (consumo de cigarrillo) y los demás factores o características registradas durante el muestreo (sexo, edad, radiación, operaciones, medicamentos). El análisis de varianza (Anova) permitió determinar la influencia del factor principal (consumo de cigarrillo) sobre el número promedio de AC/Célula/individuo y su posible interacción o dependencia con los demás factores registrados. El análisis de regresión lineal permitió determinar la asociación o dependencia entre el número de paquetes de cigarrillos fumados por año y el número de AC por célula.

10. RESULTADOS

10.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Mediante una encuesta corta se entrevistaron 500 jóvenes de la ciudad de Popayán de diferentes instituciones, de los cuales se seleccionaron 64 jóvenes (32 fumadores y 32 no fumadores de cigarrillo). Las características de los individuos se presentan en la Tabla 2. La población de estudio fue seleccionada teniendo en cuenta los respectivos criterios de inclusión tales como ser personas entre los 19 y 29 años de edad y ser sanos. Los fumadores debían tener una exposición mínima de 4 años y un promedio de 4-5 cigarrillos por día. En cuanto a los criterios de exclusión ninguno de los participantes debía presentar historia previa de quimioterapia, radioterapia o cáncer y no consumir drogas psicoactivas.

La selección de los grupos mediante el diseño de muestreo “caso – control” fue eficaz originando dos grupos muy semejantes en factores como sexo, edad, radiación, medicamentos, operaciones. Como se observa en la Tabla 2; no hay asociación o dependencia ($p > 0.05$) entre el factor principal de esta investigación (consumo de cigarrillo) y los demás factores.

El diseño empleado, asegura que la principal diferencia entre los grupos fue el consumo o no de cigarrillo, minimizando fuentes de error de los demás factores que sesgaran los resultados.

Tabla 2. Características de la Población de Estudio

12.1.1 Variable	Fumadores <i>n</i> (%)	No Fumadores <i>n</i> (%)	<i>P</i>
12.2 Sujetos	32	32	
12.3 Sexo			
Hombres	25 (78)	25 (78)	1,00 ^a
Mujeres	7 (22)	7 (22)	
12.4 Exposición ocupacional	12.5	12.6	12.7
No expuesto	30 (94)	23 (85)	0,39 ^b
Expuesto	2 (6)	4 (15)	
Radiación	12.8	12.9	12.10
No irradiado	17 (57)	13 (54)	0,85 ^b
Irradiado	13 (43)	11 (46)	
12.11 Medicamentos	12.12	12.13	12.14
No consume	29 (97)	22 (92)	0,57 ^b
Consume	1 (3)	2 (8)	
12.15 Operaciones	12.16	12.17	12.18
No operado	26 (87)	17 (71)	0,18 ^b
Operado	4 (13)	7 (29)	
Edad (años)			
12.19 Media \square SD	22.84 \square 2.69	23.41 \square 2.51	0.39 ^c
12.20 18-21	10 (31)	9 (28)	0.65 ^a
12.21 22-25	17 (53)	15 (47)	
12.22 26-29	5 (16)	8 (25)	
12.23 Consumo de Alcohol			
Positivo	32 (100)	18 (56)	N.A. ^d
Negativo		14 (44)	

^a Prueba de Chi-cuadrado.

^b Estadístico exacto de Fisher

^c Prueba de t.

^d No aplicable.

10.2 EFECTO GENOTÓXICO DE LA ADICCIÓN AL CIGARRILLO

En el estudio se realizaron cultivos de linfocitos de sangre periférica para analizar la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) tanto en fumadores de cigarrillo

como en no fumadores de cigarrillo. Se analizaron un total de 150 células de primer ciclo celular por individuo, teniendo en cuenta metafases completas con un número cromosómico de 46. El dato se expresa como No. Promedio de AC \pm Error Estándar.

Como se observa en la Tabla 3, el número promedio de aberraciones cromosómicas totales AC en 150 células (Nº AC/150 células) es significativamente más alto en fumadores de cigarrillo (8.91 \pm 0.87 AC/150 células) respecto a los no fumadores de cigarrillo (4.56 \pm 0.53 AC/150 células) (ver figura 7)

Según el tipo de aberración cromosómica, se observa que tanto en el grupo expuesto (fumadores) y el grupo control (no fumadores), los quiebres cromatídicos son el tipo de aberración más frecuente (ver figura 5). En los fumadores la relación entre quiebre cromatidico (Q. CT) y quiebre cromosomico (Q. CM) es de 2.96 y en los no fumadores es de 2.8. Además se observa que los Q. CT son los que se incrementan significativamente por efecto del consumo de cigarrillo (fumadores 7.35 \pm 0.81 Q. CT /150 células y no fumadores 4.06 \pm 0.44 Q. CM /150 células). Respecto a los quiebres cromosómicos, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre fumadores (2.48 \pm 0.27 Q. CM /150 células) y no fumadores (1.45 \pm 0.21 Q. CM /150 células) (ver figura 6).

Según el número de paquetes – años de cigarrillo, definido como el numero de paquetes de cigarrillos fumados por día y multiplicados por el tiempo de consumo de cigarrillo en años (Sierra et al, 2003), la más alta frecuencia de aberraciones cromosómicas se encontró en los que se fuman más de 1 un paquete por día en tres años (11.67 \pm 2.38), determinando que a mayor consumo de cigarrillos mayor es la frecuencia de daño cromosómico.

También se observa una significativa ($p = 0.000$) relación dosis – efecto entre el número de paquetes – años de cigarrillo consumidos por los fumadores y el número de aberraciones cromosómicas totales (se incluyen los no fumadores). A medida que se incrementa el número de paquetes de cigarrillos se incrementa el número de aberraciones cromosómicas totales en 150 células (ver figura 8).

El coeficiente de determinación (R^2) permite inferir que la variabilidad observada en el número de aberraciones cromosómicas totales en 150 células, se debe en un 21.7% a la variabilidad en el número de paquetes – años. Cuando el mismo análisis se realizó sólo a los fumadores de cigarrillo se observó una asociación entre el número de aberraciones cromosómicas/150 células y los paquetes – años ($R^2 = 0.065$; $p = 0.158$). En este caso la variabilidad observada entre el número

de aberraciones cromosómicas totales en 150 células, se explicaría solo en un 6,5% causada por la acción de fumar (paquetes – años).

Tabla 3. Efecto del Consumo de Cigarrillo en la Frecuencia de aberraciones cromosómicas.

12.23.1 Consumo	Aberraciones Cromosómicas		
	12.23.2 Quiebres Cromatídicos	12.23.3 Quiebres Cromosómicos	12.23.4 Quiebres 12.23.5 Totales
	Media \pm SE (n) ^a		
12.24 No Fumador	4.06 \pm 0.44 (32)	1.45 \pm 0.21 (11)	4.56 \pm 0.53 (32)
12.25 Fumador	7.35 \pm 0.81 (31) ^b	2.48 \pm 0.27 (23)	8.91 \pm 0.87 (32) ^b
0.3 – 1.5	5.80 \pm 0.87 (10)	2.43 \pm 0.48 (7)	6.82 \pm 1.05 (11)
1.6 – 3.0	7.25 \pm 0.81 (12)	2.25 \pm 0.37 (8)	8.75 \pm 0.88 (12) ^b
> 3.0 paq.-años	9.22 \pm 2.38 (9) ^c	2.75 \pm 0.56 (8)	11.67 \pm 2.38 (9) ^c
P-ANOVA	0.001	0.104	0.000

^a Media \pm error estándar (número de sujetos); 150 células contadas por sujeto.

^b P < 0.05 comparado con No fumador, basado en ANOVA.

^c P < 0.05 comparado con No Fumador y \pm 1.5 paq.-años, basado en ANOVA y la corrección Bonferroni como prueba de comparaciones múltiples.

Figura 5. Número promedio de quiebres cromatídicos según grupo de adicción al cigarrillo

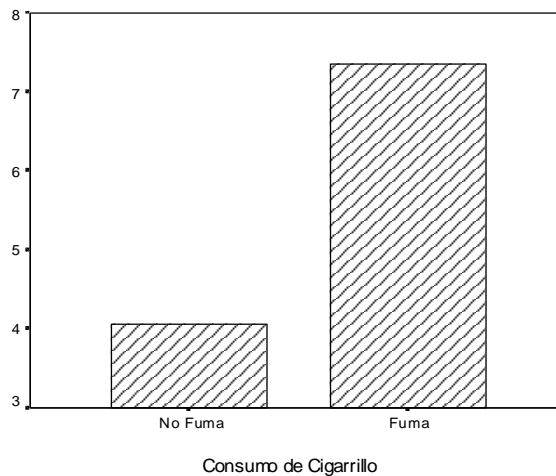


Figura 6. Número promedio de quiebres cromosómicos según grupo de adicción al cigarrillo

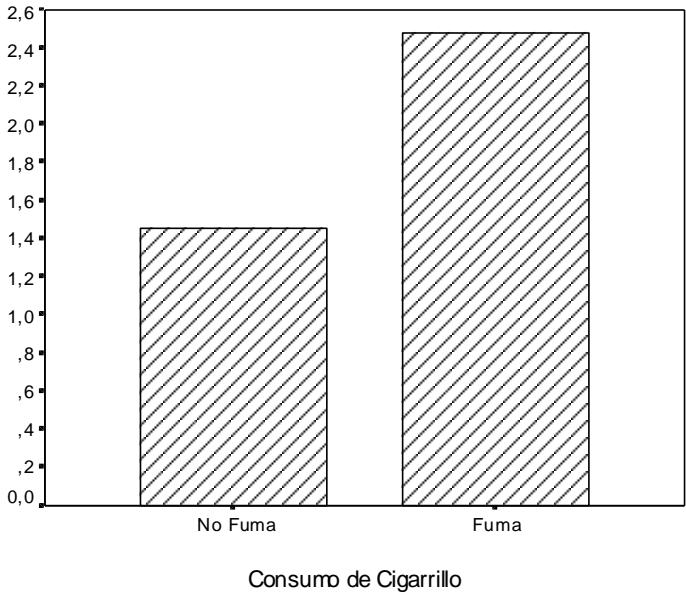


Figura 7. Número promedio de aberraciones cromosómicas totales según grupo de adicción al cigarrillo

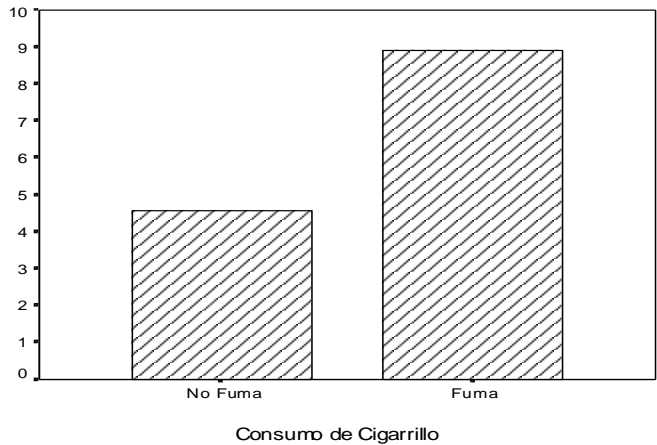


Figura 8. Análisis de correlación lineal entre el número de aberraciones cromosómicas y paquetes – años al consumo de cigarrillo.

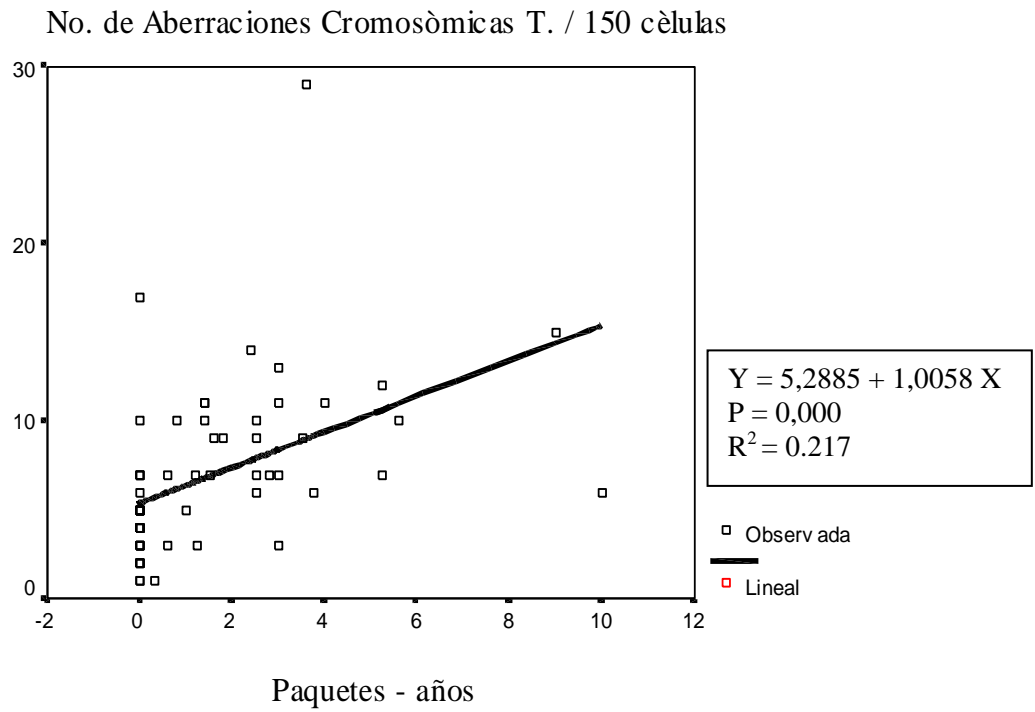


Figura 9. Célula metafásica de linfocitos humanos.

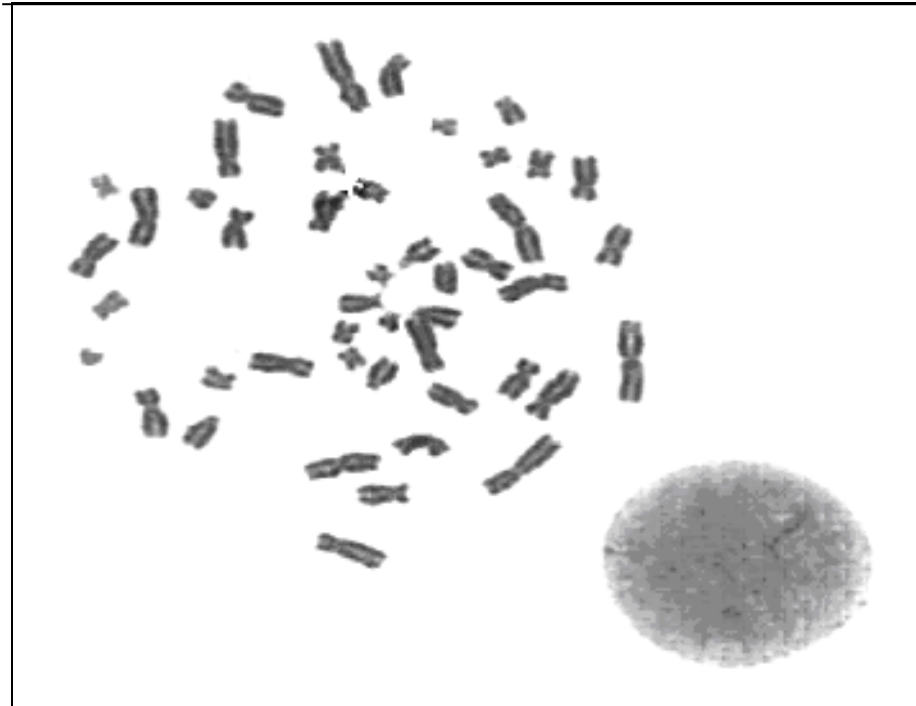


Figura 10. Células metafásicas en primer (M1) y segundo ciclo (M2) de división celular marcadas con BrdU

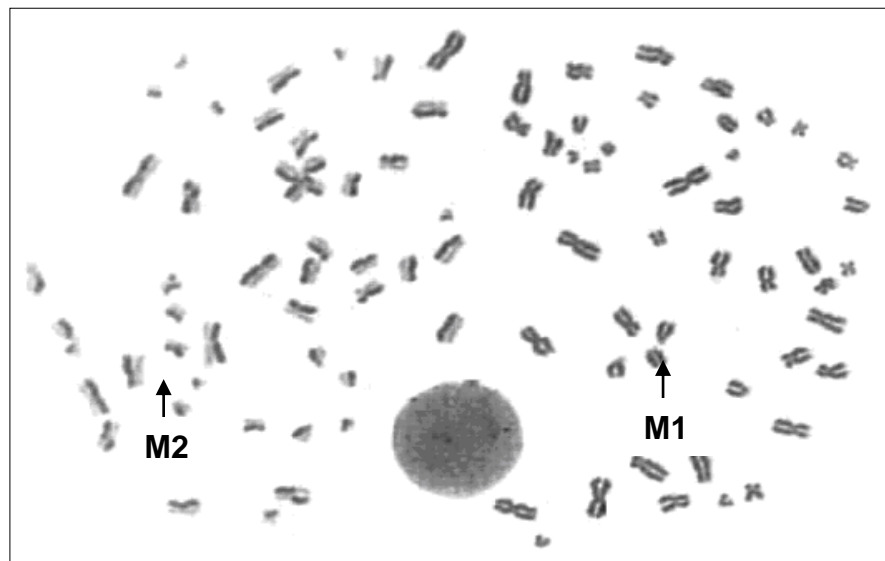


Figura 11. Células metafásicas de linfocitos humanos con quiebres cromatídicos

*Q.CT: Quiebre Cromatídico

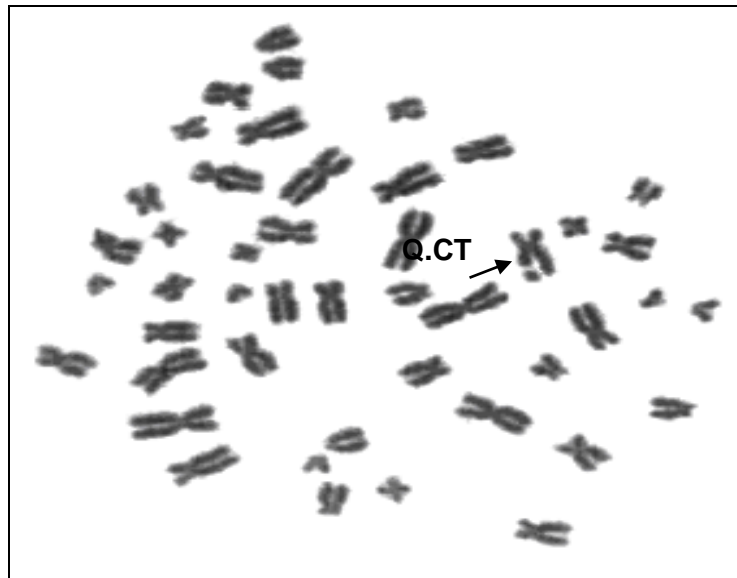
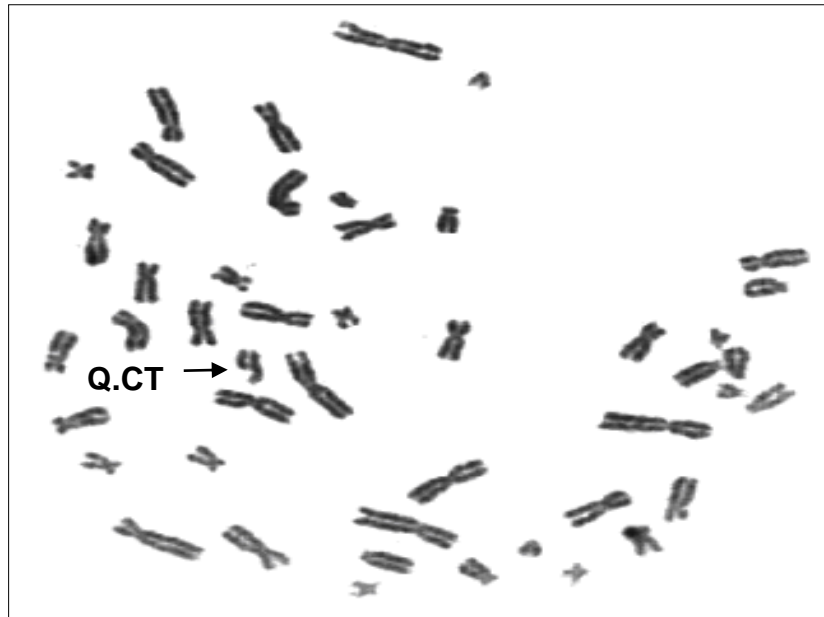
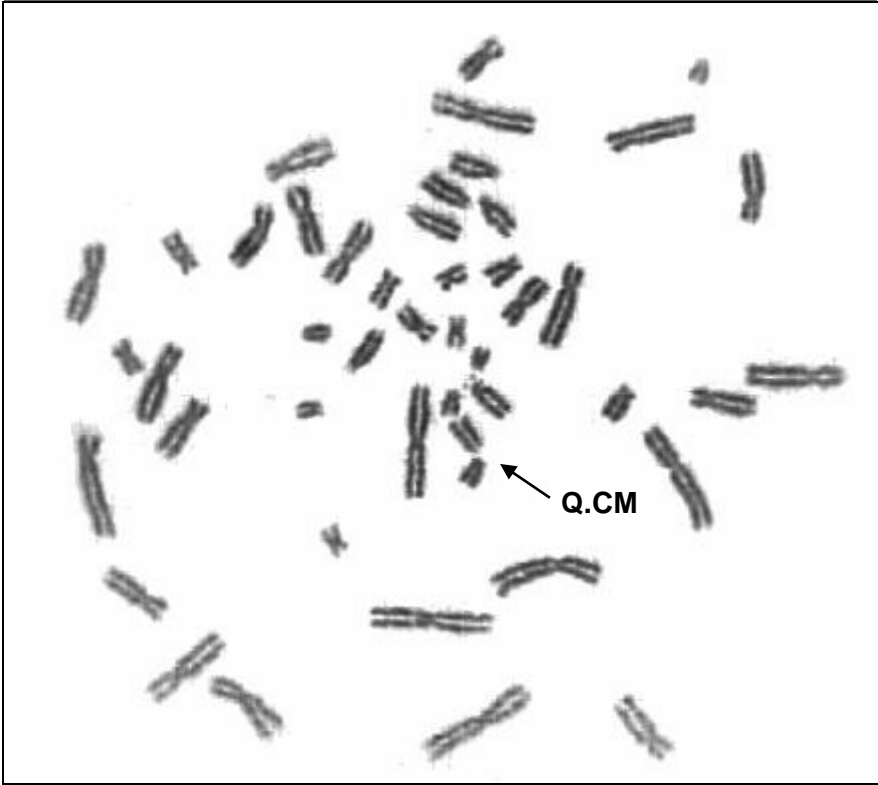


Figura 12. Célula metafásica de linfocitos humanos con quiebre cromosómico
*Q.CM: Quiebre Cromosómico



11. DISCUSIÓN

La asociación entre el desarrollo de cáncer de pulmón y el consumo de cigarrillo se explica por el efecto genotóxico que este produce en las células (IARC, 1986). Varios estudios han demostrado que la alta frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) se halla relacionada con el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Estudios de cohorte prospectivos realizados en Italia y el norte de Europa encontraron que existe una asociación estadísticamente significativa entre las AC y el riesgo de desarrollar cáncer (Bonasi *et al*, 1995).

Mediante este estudio se demuestra que el cigarrillo altera el material genético (ADN) de los fumadores, produciendo una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas totales en los fumadores de cigarrillo indicando un potencial riesgo de salud más adelante como el cáncer. Varios estudios epidemiológicos y genéticos se ha demostrado que el humo del cigarrillo es un potencial carcinógeno principalmente de pulmón y es el responsable de un gran número de problemas respiratorios y cardiovasculares (IARC, 1986).

Este estudio confirma el efecto genotóxico del cigarrillo, observados en otros estudios realizados en fumadores de cigarrillo, donde se empleó la prueba de AC y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los fumadores y no fumadores de cigarrillo. Por ejemplo Conforti *et al*, en 1997, realizó una investigación en personas fumadores con cáncer, fumadores sin cáncer y personas no fumadoras, encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos, siendo mayor la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los fumadores con cáncer, esto nos permite relacionar el posible efecto biológico que produciría el consumo de cigarrillo en la población muestreada en este estudio. En China se realizó un estudio con fumadores empleando la prueba de aberraciones cromosómicas y la prueba de micronúcleos siendo mayor estadísticamente significativa en los fumadores de cigarrillo respecto a los no fumadores (Jin, 1997). En Colombia se llevó a cabo un estudio en personas fumadoras de cigarrillo mayores de 30 años y se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las AC e intercambio de cromátidas hermanas de los fumadores de cigarrillo comparados con los no fumadores de cigarrillo (Sierra, 1999; López, 2001).

Al comparar las dos poblaciones consumidoras de cigarrillo, la población mayor de 30 años (32 – 63 años) y la población juvenil (19 – 29 años) muestreadas en la ciudad de Popayán, encontramos que hay diferencia significativa entre los fumadores y no fumadores de cigarrillo. En las personas mayores de 30 años la frecuencia promedio de AC en los fumadores fue de 12.2 ± 3.33 y en los no fumadores de cigarrillo fue de 3.44 ± 2.60 con $P < 0.01$. La población juvenil presentó datos con una relación aproximada, la frecuencia de AC totales en los fumadores fue de 8.91 ± 0.87 y en los no fumadores fue de 4.56 ± 0.53 con $P = 0.000$. Estos resultados nos permite concluir que el cigarrillo produce un efecto potencialmente genotóxico que depende de la cantidad y duración de consumo como se pudo observar en este estudio. Los fumadores de cigarrillo que presentaron una mayor frecuencia de daño cromosómico eran quienes consumían más de 3.0 paquetes – años y quienes llevaban mayor tiempo de consumo, aclarando que el número de personas encontradas en las tres categorías de consumo de cigarrillo, fue casi proporcional entre ellas. Varios estudios han demostrado que el riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer varía según la cantidad y duración de consumo de cigarrillo (EPA, 1992).

Contrario a los estudios antes reportados, en Estados Unidos se realizó la prueba de AC en mujeres jóvenes fumadoras de cigarrillo y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las fumadoras de cigarrillo y las no fumadoras, en cambio si se encontró un incremento significativo en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas entre las fumadoras y las no fumadoras de cigarrillo (Rowland, 1999). Los investigadores concluyeron que la alta frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en mujeres jóvenes de cigarrillo puede indicar que el daño en el ADN en muchas de las mujeres, probablemente ya había ocurrido, incrementando el riesgo de desarrollar cáncer más adelante. Debido a este tipo de resultados contradictorios es importante tener en cuenta que cada población tiene unas condiciones diferentes en cuanto al estilo de vida que las hace más o menos vulnerables a problemas de salud, por ello es importante realizar comparaciones entre las diferentes poblaciones expuestas a sustancias tóxicas como las que contiene el cigarrillo.

En este estudio queda claro que la diferencia en el número de AC es estadísticamente significativa cuando se compara a los fumadores con los no fumadores de cigarrillo. Cuando la comparación se hace entre las diferentes categorías de fumadores no se halla diferencia estadísticamente significativa. El tipo de alteración cromosómica que produce el cigarrillo depende básicamente de la etapa en la que se encontraban los linfocitos durante la exposición a los químicos que contiene el cigarrillo, de ahí que se note en el estudio una diferencia

significativa entre los quiebres cromatídicos (que se inducen al final de S y G2) de los fumadores respecto a los no fumadores de cigarrillo comparados con los quiebres cromosómicos (que se inducen en G1). Esto indicaría que la alta frecuencia de quiebres cromatídicos inducidos en la población de fumadores de cigarrillo sería causada por residuos de sustancias acumuladas en sus células o daños ocasionados al final de la síntesis.

Mediante biomarcadores citogenéticos como las AC, empleadas en este estudio nos permite tomar medidas preventivas a tiempo ya que es una prueba que mide exposición a químicos y esta relacionada con efectos biológicos como el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas en fumadores respecto a los no fumadores, como se presentó en este estudio permite asociarlas a la exposición de químicos que contiene el cigarrillo y con ello, contribuir al conocimiento acerca del efecto genotóxico de la adicción en la población colombiana y así tomar las medidas de prevención pertinentes para disminuir los posibles riesgos en la salud.

Como una segunda fase de este estudio, se extrajo ADN de cada persona para realizar estudios más adelante de polimorfismo genético y así determinar la susceptibilidad individual y poblacional a desarrollar enfermedades. Este tipo de estudios se puede complementar asociando el efecto genotóxico causado por el consumo de cigarrillo y el polimorfismo genético mediante pruebas moleculares, determinando una relación dosis – efecto – enfermedad. La asociación de estos tres factores permite conocer el riesgo de exposición y prevenir posibles riesgos de salud tempranamente.

12. CONCLUSIONES

El empleo de biomarcadores citogenéticos como la prueba de aberraciones cromosómicas en monitoreo de poblaciones expuestas, es de gran relevancia ya que permite conocer el efecto genotóxico de sustancias como las que se encuentran en el cigarrillo. En este estudio se empleó la prueba de AC y se logró determinar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en fumadores jóvenes de cigarrillo de la ciudad de Popayán, siendo mayor en los fumadores respecto a los no fumadores de cigarrillo (8.91 ± 0.87 vs 4.56 ± 0.53). Los resultados son de gran importancia ya que no se conocían reportes en la población juvenil de Colombia y, con acuerdo con otros estudios realizados en personas mayores de 30 años en la ciudad de Popayán, se puede concluir que el consumo de cigarrillo incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas, siendo un posible riesgo de salud a futuro.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman el efecto genotóxico que produce el cigarrillo, ya que se encontraron alteraciones cromosómicas tanto cromatídicas como cromosómicas, la diferencia significativa se encontró en los quiebres cromatídicos. Además nos permitió conocer y observar que el daño cromosómico causado por el cigarrillo es dependiente tanto de la cantidad de cigarrillos consumidos por día como del tiempo a pesar del poco tiempo de consumo y cantidad de cigarrillos presentados en esta población en comparación a la población mayor de 30 años de edad que abarcaba en su mayoría fumadores pesados y de más tiempo de consumo.

El estudio se realizó teniendo en cuenta el diseño “caso – control”, que permitió obtener grupos de personas semejantes para evitar sesgar los resultados y así obtener una diferencia en cuanto al consumo de cigarrillo. Estudios como este en diferentes poblaciones nos permite determinar y comparar el grado de daño causado por el cigarrillo, ya que cada población se diferencia en aspectos como estilo de vida, tipo de alimentación y sus costumbres, factores que intervienen en los procesos biológicos.

Los estudios de monitoreo genético de poblaciones expuestas son importantes por que permiten conocer el grado de exposición de las poblaciones y sus posibles efectos en la salud. La finalidad de este tipo de estudios es implementar programas de prevención a tiempo para así disminuir los posibles efectos en la

salud en las personas expuestas ocupacional o ambientalmente. Últimamente se están implementando estos estudios en epidemiología molecular para contribuir al conocimiento acerca del riesgo de cáncer y determinar la susceptibilidad genética individual y poblacional a desarrollar esta enfermedad.

La socialización de estos resultados a la comunidad es fundamental para concientizar y motivar a las personas consumidoras de cigarrillo hacia la disminución de su consumo y así prevenir posibles riesgos de salud.

BIBLIOGRAFÍA

AMERICAN CANCER SOCIETY FACTS AND FIGURES, 1996. Disponible en Internet: <URL: [http:// www.graylab.ac.uk](http://www.graylab.ac.uk)>

AMERICAN CANCER SOCIETY. Datos y estadísticas del cáncer en los hispanos/latinos, 2000-2001. Atlanta Georgia, 2001.

AU, W; CAJAS-SALAZAR, N; SALAMA, S. Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. Mutation Research, 1998. p. 467-478.

AU, W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. Occupational medicine Hanley & Belfus, 1991. v.6 N^o 4, p. 597-609.

----- . Prevention of environmental health problems . Curso susceptibilidad genética y cáncer. Popayán 1999

CIFRAS DEL TABAQUISMO, 2000. Disponible en internet: <URL:http://www.tabaquismo.freehosting.net/cifras_del_tabaquismo.htm>

CNIO. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Etapas del desarrollo del Cáncer. Madrid 2002. Disponible en Internet: <URL:<http://www.cnio.es/es/home.htm>>.

CONFORTI, N; EL ZEIN, R;SHERI, Z RAHMAN, A; ZWISCHENBERGER, J; AU, W. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers, Mutation Research, 1997. p.1-7.

Cummings, R Michael. Principios y conceptos Herencia Humana. Ed MacGRAW HILL. Madrid España, 1995. p 373 – 405.

DAVE B.J; HOPWOOD V.L; SPITZ M.R; PATHAK S; SHARED. Citogenetic abnormalities in lung tumours and corresponding peripheral blood lymphocytes, Int J. Oncol. 7 1995, p.1297-1305.

EPA. Lung cancer and others disorders. Respiratory health effects of passive smoking Washington. December 1992.

FRAUMENI, JF. Respiratory carcinogenesis: An epidemiologic appraisal, J Natl Cancer Inst, 1975, p. 1039-1046.

GINNIS, JM; FOEGE, WH, Causas actuales de muerte en los Estados Unidos, JAMA, 1993.

GOTO, K; MAEDA, S; KANO Y; SUGIYAMA, T. Factors involved in differential Giemsa staining of sister chromatids. Chromosoma, 1978, No. 66. p.351-359.

HECHT, SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. Journal of the national cancer institute, 1999. vol. 91, N^o 14.

HOFFMANN, D; HECHT, SS. Advances in tobacco carcinogenesis. In :Cooper CS, Grover PL, editors. Handbook of experimental pharmacology. v. 94/I. Heideberg (Germany): Springer-Verlag, 1990. p. 63-102.

HOFFMANN, D; HOFFMANN, I. The changing cigarette, 1950-1995. Toxicol Environ Health, 1997. p. 307-64.

HOYOS, L Stella. Genotoxicidad de los plaguicidas mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad. En: CORDOBA Dario. Toxicología. Medellín Colombia, 1994. p. 169-184.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans , 1986. v.38. p.1-421.

JACOBS, PA. *et al.* A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann. Hum. Genet.*, 1974. v. 35 p. 301-319.

JIN, YI; WANG, Hz; GU, H. Observation of chromosome aberration and micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes among cigarette smokers. *China* 1997. 18(1). p. 40-42.

KHOR Martín, 1996. *Revista del sur*. Disponible en internet:
<URL:<http://www.revistadelsur.org.uy/revista.059/salud.htm>>.

KLUNG Williams; Cummings Michael. *Conceptos de Genética*. Quinta Edición. España. Prentice Hall Iberia, 1999. 637p.

LANDIS, SH; MURRAY, T; BOLDEN, S; WINGO, PA. *Cancer statistics*, 1999. *CA Cancer J Clin*, 1999. v.49. p. 8-31.

LIGA COLOMBIANA DE LUCHA CONTRA EL CANCER. *El ministerio de salud contra el cigarrillo*, 1986.

LOPEZ, Sayonara. Alteraciones en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de fumadores de cigarrillo. Popayán, 1999, 89 p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de biología.

MEDINA M. *Atlas de mortalidad por cáncer*. Colombia 1990. Santafé de Bogotá. Instituto Nacional de Cancerología Volumen 1 y 2. Santafé de Bogotá, 1994.

MILLER, S. A; DYKES D. D; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids*. 1998. Res v.16. No.3: p. 1215-1215.

Ministerio de Salud. II Estudio nacional de factores de riesgo para enfermedades crónicas. 1998.

MULVIHILL, JJ. Host factors in human lung tumors: An example of ecogenetics in Oncology. J Natl Cancer Inst, 1976. p. 3-7.

NIDA. NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 1999. Disponible en Internet: <URL:[http:// www.drogabase.gov](http://www.drogabase.gov)>.

OCCSP. OBSERVATORIO COLOMBIANO SOBRE CONSUMO DE SUSTANCIAS PETO Julian, Cancer epidemiology in the last century and the next decade. Nature, 2001. v.411

OOI, WL; ELSTON, RC; CHEN, VW; BAILEY, W; ROTHSCHILD, H. Increasedfamilial risk for lung cancer. J Natl Cancer Inst 1986. p. 217-222.

PROCESO DE LA CARCINOGENESIS. Disponible en inetrenet: <URL:[http://www.livercancer.com/images/ carcinogenesis.gif.htm](http://www.livercancer.com/images/carcinogenesis.gif.htm)>.

ROWLAND, R; HARDING, KM. Incresed sister chromatid exchange in the peripheral blood limphocytes of young womwn who smoke cigarettes, 1999. Disponible en Internet: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=Pubmed>>

ROWLEY, J.D. Identification of the constat chromosome regions involved in human hematologic malignant disease. Science 216 1982. p. 749-751.

RUMBOS Programa presidencial. Sondeo nacional de drogas en jóvenes 1999 – 2001. Bogota.

SALAMANCA, Fabio. Citogenética Humana. Editorial Médica Panamericana S.A. México,1990. p. 93-101, 235.

----- . Salud Pública de México. Alteraciones cromosómicas en el cáncer humano. México, 1995. v.35 N 2, p. 162- 170.

SALAZAR Gustavo. El problema del tabaquismo 2001. Disponible en internet: <URL:<http://www.monografías.com/trabajos/probtabaco/probtabaco.shtm>>.

SELLERS, T; BAILY, JE; ELSTON, RC; ELSTON, GZ; OOI, W, ROTSCCHILD, H. Evidence of mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. J Natl Cancer Inst 1990. p. 1272-1279.

SHOPLAND, DR. Tobacco use and its contribution to early cancer mortality with a special emphasis on cigarette smoking. Environ Health Perspect .1995. p.131-42.

SIERRA, Mónica. Alteraciones en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de fumadores de cigarrillo. Popayán, 1999, 73 p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de biología.

SIERRA Hernán, Au W *et al*. Polymorphims for chemical metabolizing genes and risk for cervical neoplasia. Environmental and molecular mutagenesis, 2003. v.41. p.69-76.

SURGEON GENERAL. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. Washington (DC) :U.S. Gov print off; 1989.

TOKUHATA, G; LILENFELD, A. Familial aggregation of lung cancer among hospital patients. Public Health Rep. 1963. v.78. p. 277-283.

VARELA R, María. El cigarrillo puede afectar tu nutrición. 2002. Disponible en Internet: <URL:<http://www.saludnutricion.com/scripts/salud.dll/el-cigarrillo-puede-afectar-tu-salud>>.

ANEXO A

CONSENTIMIENTO INFORMADO

COMPROMISO VOLUNTARIO DE PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

Yo _____,
identificado con Cédula de Ciudadanía No. _____ de
_____, declaro que participo en forma **VOLUNTARIA** y
CONCIENTE, como persona objeto de estudio en la ejecución de la investigación
**“ALTERACIONES EN LA FRECUENCIA DE ABERRACIONES
CROMOSÓMICAS E INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS EN
LINFOCITOS DE SANGRE DE FUMADORES JÓVENES”**, donando
aproximadamente 25 ml de sangre para que sea procesada en el laboratorio de la
Unidad de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca para
llevar a cabo el trabajo de grado de la estudiante YEXANIA ARBOLEDA, donde
serán aplicadas las pruebas:

- Aberraciones Cromosómicas.
- Intercambio entre Cromátidas Hermanas.

Firmado en la ciudad de Popayán a los _____ días del mes de _____
de 200____

Código Persona

ANEXO B

**ENTREVISTA
MONITOREO GENÉTICO**

EFFECTO GENOTÓXICO DEL CIGARRILLO EN FUMADORES JÓVENES

Fecha: _____
Entrevistador: _____
Lugar: _____
Duración de la entrevista: _____
Nombre y Apellidos: _____
Dirección: _____
Tiempo de residencia en esta dirección: _____
Dirección y ciudad donde vivía anteriormente: _____
Ciudad: _____
Departamento: _____
Teléfono de la residencia actual: _____
Teléfono Trabajo: _____
Sexo: M F
Fecha y lugar de nacimiento: _____

Edad: _____ Años.
Estado Civil: C S Otros
Número de Hijos: _____
Tiene usted hijos con problemas físicos y mentales desde su nacimiento? SI NO
Cuantos _____
Tipo de problema _____
Algunos de sus familiares presenta el mismo tipo de problema? SI NO
Qué nivel de educación ha cursado?

Primaria: _____
Secundaria: _____
Universidad: _____
Otros: _____

Dirección de una Persona Conocida: _____
Nombre y apellidos de la persona: _____

AHORA, SE HARÁN ALGUNAS PREGUNTAS REFERENTES A SU ESTADO DE SALUD

Ha tenido problemas de salud? SI __ NO __

Cuáles?

Ha sido intervenido quirúrgicamente :SI __ NO __

Ha tenido tratamientos prolongados: SI __ NO __

Tiempo: _____

Si su respuesta es afirmativa conteste:

Tipo de tratamiento	Fecha	Hospital	Ciudad
---------------------	-------	----------	--------

_____	_____	_____	_____
-------	-------	-------	-------

_____	_____	_____	_____
-------	-------	-------	-------

_____	_____	_____	_____
-------	-------	-------	-------

Consumo usted algún tipo de medicamento ? SI __ NO __

Cuáles?

Por cuánto tiempo? __ años __ meses __ semanas

Alguna vez ha sido usted hospitalizado? SI __ NO __

Causa	Hospital	año	Tiempo
-------	----------	-----	--------

_____	_____	_____	_____
-------	-------	-------	-------

_____	_____	_____	_____
-------	-------	-------	-------

_____	_____	_____	_____
-------	-------	-------	-------

Ha tenido usted enfermedad(es) que han sido tratadas pero que no han requerido de hospitalización? SI __ NO __

De que tipo?: _____

Ha tenido enfermedades que no han sido tratadas? SI __ NO __

De que tipo?: _____

En su familia existen problemas de salud hereditarios? SI __ NO

De que tipo? _____

Qué institución cuida de su salud ? _____

Se puede consultar su historia clínica? SI __ NO __

Cuál es el Doctor a cargo de su análisis clínico? _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Está usted bajo algún tipo de tratamiento clínico? SI __ NO __

Utiliza medicina natural? SI __ NO __

Qué toma? _____

Medicamento que utiliza con frecuencia (drogas para la presión, etc.) _____

Ha estado expuesto a químicos o drogas terapéuticas? SI ___ NO ___

Describe: _____

En los últimos 10 años ha sido expuesto a irradiación? SI ___ NO ___

Qué tipo de radiación? _____

Qué parte del cuerpo ha sido irradiada?

Parte del cuerpo	Fecha	Número de irradiaciones
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Cada cuanto visita al odontólogo? _____

Fecha de su última visita: _____

Qué tratamiento le hicieron: _____

ESTAS PREGUNTAS VAN RELACIONADAS CON SU RELACIÓN DE PAREJA SOLO PARA HOMBRES

Su esposa ó compañera ha presentado problemas de aborto espontáneo ó nacimiento de un niño muerto? SI ___ NO ___

Especifique cual caso se ha presentado: _____

En cuantas ocasiones? _____

Se ha establecido la causa? SI ___ NO ___

De que tipo? _____

Se han presentado ambos casos? (aborto espontáneo y/o nacimiento de un niño muerto)
SI ___ NO ___

En cuántas ocasiones? _____

Usted recuerda en cuantas ocasiones durante el año?

En que años?

Año	Nombre del caso
_____	_____
_____	_____
_____	_____

ESTAS PREGUNTAS DEBEN RESPONDERLAS SOLO LAS MUJERES

Ha presentado problemas de aborto ó nacimiento de un niño muerto? SI ___ NO ___

Especifique que caso se ha presentado _____

Causa(s) _____

Cuantas veces al año _____

Durante que años:

Año	Tipo de problema
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Las siguiente serie de preguntas tienen referencia a su empleo actual

Qué cargo desempeña actualmente dentro de la empresa? _____

Qué cargos desempeñó anteriormente dentro de la empresa? _____

En su trabajo anterior o actual ha estado en contacto con alguna sustancia química ?

SI ___ NO ___

A cuáles en la actualidad?

A cuáles anteriormente?

_____	_____
_____	_____
_____	_____

El tiempo que usted dedica o dedicó al manejo de estos químicos

ES	FUE
____ horas diariamente	____ horas diariamente
____ días semanalmente	____ días semanalmente
____ mensualmente	____ mensualmente

Ha trabajado usted en otra ciudad diferente a la actual? SI ___ NO ___

Cual? _____

Cuando usted ingresó a esta compañía?.

Año _____ Mes _____

El cargo que ocupa actualmente es en el que ha permanecido durante mas tiempo a lo largo de su vida? SI ___ NO ___

Si su respuesta es negativa responda la siguiente.

Que tipo de trabajo ha realizado durante mas tiempo en su vida?

Donde ha trabajado usted anteriormente?. (comience con el último de los empleos).

Tipo de empleo

Compañía

_____	_____
-------	-------

Señale con una X a cuál de los siguientes agentes ha estado expuesto en el lugar donde trabajó anteriormente.

materiales radioactivos	_____
radiación	_____
asbestos	_____
basuras	_____
vapores químicos	_____

En que empresa estuvo expuesto a lo anteriormente citado: _____

Durante cuánto tiempo: _____

Especifique con cual o cuales de los materiales tuvo más contacto: _____

Durante cuanto tiempo trabajó en esta empresa?
Años _____ Meses _____ Días _____

LAS PREGUNTAS QUE VIENEN A CONTINUACIÓN SON ACERCA DEL USO DE TABACO Y/O ALCOHOL

Usted fuma? SI ___ NO ___

Si su respuesta es positiva responda las siguientes preguntas:

Hace cuanto que empezó a fumar? Año _____

Ha fumado continuamente por un año o más? SI ___ NO ___

Desde que año _____

Cuanto años lleva fumando? _____

Fuma actualmente? SI ___ NO ___

Si su respuesta es positiva conteste las siguientes preguntas:

Cuántos cigarrillos fuma por día?

1. Medio paquete (10 cigarrillos). _____
2. Un paquete y medio (10-20 cigarrillos). _____
3. Uno o dos paquetes (20-40 cigarrillos). _____
4. Dos o tres paquetes (40-60 cigarrillos). _____
5. Más de tres paquetes por día (mas de 60 cigarrillos). _____
6. No sabe? _____

Qué marca y que tipo de cigarrillo fuma actualmente?.

Marca	Filtro	Sin filtro
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Ha fumado usted previamente? SI ___ NO ___

Si dejo de fumar; hace cuanto tiempo que lo hizo? _____

Cuántos cigarrillos fumaba por día? _____

Por cuantos años fumó? _____

Si usted fuma moderadamente cuántos cigarrillos fuma por día?

1. Menos de dos por día. _____
2. Dos a cuatro por día. _____
3. Cinco a ocho por día. _____
4. Mas de nueve por día. _____
5. No se. _____

Está usted expuesto pasivamente al humo del cigarrillo? SI ___ NO ___

En su casa? ___ En el trabajo? ___

Si su respuesta es positiva responda:

Exposición actual _____ Desde hace cuánto (año)?

Exposición previa _____ Cuándo empezó (año)?

Hasta cuándo duró: _____

CONSUMO DE ALCOHOL

Usted consume bebidas alcohólicas? SI ___ NO ___

Usted toma cerveza SI ___ NO ___

Ha menudo usted toma cerveza

1. Diariamente ó casi todos los días. _____
2. Tres ó cuatro veces a la semana. _____
3. Una ó dos veces en la semana. _____
4. Una ó dos veces al mes. _____
5. Menos de una vez al mes. _____
6. No se. _____

Si usted tomaba cerveza cuando dejó de hacerlo.?

Años _____ meses _____

Toma usted vino SI ___ NO ___

Con que frecuencia usted toma vino?

1. Diariamente ó casi todos los días. _____
2. Tres a cuatro veces en la semana. _____
3. Una ó dos veces en la semana. _____
4. Menos de una vez al mes. _____
5. No se. _____

Si usted tomaba vino cuando dejó de hacerlo.?

Años _____ meses _____

Toma usted Aguardiente, Brandy, Rón, Guarapo ? SI ___ NO ___

Con que frecuencia toma usted estas bebidas?

1. Diariamente ó casi todos los días. _____
2. Tres a cuatro veces en la semana. _____
3. Una ó dos veces en la semana. _____
4. Menos de una vez al mes. _____

Si usted tomaba las bebidas anteriormente mencionadas cuando dejó de hacerlo.

Años _____ meses _____

Usted ha tenido ó tiene algunos pasatiempos preferidos? SI ___ NO ___

Cuál ó cuales son sus pasatiempos preferidos? _____

Consumo café? SI ___ NO ___

Cantidad/Semana _____ Cantidad/Día _____

Consumo té? SI ___ NO ___

Cantidad/Semana _____ Cantidad/Día _____

Consumo bebidas de cola (Pepsi, Cocacola, etc.)? SI ___ NO ___

Cantidad/Semana _____ Cantidad/Día _____

USO DE DROGAS ALUCINOGENAS

Ha consumido drogas alucinógenas SI ___ NO ___

Qué tipo de drogas alucinógenas ha consumido? (Anote la respuesta de acuerdo a la frecuencia de uso del 1 - 7)

Marihuana _____
Cocaína _____
Basuco _____
Heroína _____
Morfina _____
Otras _____

De qué tipo? _____

Consumes drogas actualmente? SI ___ NO ___

De que tipo? _____

Si su respuesta es positiva responda

Hace cuánto tiempo empezó a consumir drogas?

_____ días _____ meses _____ años

Hace cuánto tiempo dejó de consumir drogas?

_____ años _____ meses _____ semanas

Con qué frecuencia consumía drogas?

_____ diariamente _____ semanalmente _____ mensualmente

PREGUNTAS DEL HOGAR

Fumigan su casa? SI ___ NO ___

Con qué frecuencia? _____

Sabe con qué sustancia? _____

Qué elementos utiliza para el aseo de su casa? _____

Los mezcla? SI ___ NO ___

Utiliza tinturas para el cabello?

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

Código persona

ANEXO C

REGISTRO ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

13. Proyecto: _____ Fecha: _____ Placa: _____
 Registrador: _____ Fecha Registro: _____ Microscopio: _____

	Nº CRA	ABERRACIONES CROMOSOMICAS					OTRA S	COO RD	Nº DE CEL	Nº CR	ABERRACIONES CROMOSOMICAS					OTRA S	COO RD
		CROM A	CROM O	GAP.		CRO					CROM A-TIDI	CROM OSOMI	GAP		CRO		
				CROT	CRO								CROT	CRO			
1								51									
2								52									
3								53									
4								54									
5								55									
6								56									
7								57									
8								58									
9								59									
10								60									
11								61									
12								62									
13								63									
14								64									
15								65									
16								66									
17								67									
18								68									
19								69									
20								70									
21								71									
22								72									
23								73									
24								74									
25								75									
26								76									
27								77									
28								78									
29								79									
30								80									
31								81									

32							82							
33							83							
34							84							
35							85							
36							86							
37							87							
38							88							
39							89							
40							90							
41							91							
42							92							
43							93							
45							94							
46							95							
47							96							
48							97							
49							98							
50							99							
Tot al							100							
X														

No. de células aberrantes