

**BIOMONITOREO EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL A PARTIR DE ANOMALÍAS NUCLEARES, PARA DETERMINAR EL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL CONSUMO DE CIGARRILLO EN UNA POBLACIÓN DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

**GILMAR YUNIOR DELGADO BURBANO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2014**

**BIOMONITOREO EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL A PARTIR DE ANOMALÍAS NUCLEARES, PARA DETERMINAR EL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL CONSUMO DE CIGARRILLO EN UNA POBLACIÓN DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

**GILMAR YUNIOR DELGADO BURBANO**

**TRABAJO DE GRADO**

**DIRECTOR**

Ph.D. Nohelia Cajas Salazar  
Docente del departamento de Biología

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2014**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

**Director**

---

**Ph.D. Nohelia Cajas Salazar  
Docente del Departamento de Biología  
Universidad del Cauca  
Popayán - Colombia**

**Jurado**

---

*Elizabeth Londoño V*

Mg. Elizabeth Londoño  
Pontificia Universidad Javeriana  
Cali - Colombia

**Jurado**

---

Mg. Sulma Muñoz  
Universidad del Cauca  
Popayán - Colombia

Fecha de sustentación: 9 de Octubre de 2014

## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor y su directora de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación nombrare, que han sido un soporte logístico, emocional y moral.

Quisiera primero agradecer a Dios, por estar siempre conmigo, fortalecer mi espíritu, corazón, y mente para poder iluminar cada paso que doy. Pero en especial por poner en mi camino aquellas personas que me han acompañado durante mi etapa de formación académica.

Quiero agradecer infinitamente a toda mi familia especialmente a mis padres Melva Burbano Ortega, Gilmar Delgado Zambrano y a mi hermano Cristian Alexander Delgado, que se preocupan día a día por mí, brindándome bienestar y me dan toda su fortaleza para seguir adelante en mis estudios.

A mi directora Nohelia Cajas Salazar, mis jurados Elizabeth Londoño, Sulma Muños por aportar conocimiento relevante y oportuno que permitieron generar conocimiento de calidad en el desarrollo de esta investigación.

A los laboratoristas y amigos Jhon Melendez y Elsa Bety Velasco por colaborarme en el suministro de implementos indispensables para el normal transcurso de esta investigación, así como apoyarme emotivamente en los momentos críticos acontecidos en el desarrollo de este estudio.

A mis amigos de Universidad María Mercedes, Juliana Salazar, Liseth Bolaños, Angie Marcela Bolaños por todo su apoyo, colaboración, su amistad y por esos momentos inolvidables ocurridos en el transcurso del pregrado.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. MARCO TEÓRICO.....	15
4.1. COMPUESTOS DEL CIGARRILLO.....	15
4.2. CARCINOGENESIS Y PROGRESIÓN TUMORAL.....	16
4.3. BIOMARCADOR DE ANOMALÍAS NUCLEARES.....	17
4.4. BIOMARCADOR DE ANOMALÍAS NUCLEARES EN CÉLULAS BUCALES.....	19
4.5. ÍNDICE DE REPARACIÓN (IR) Y POTENCIAL PROLIFERATIVO.....	20
5. ANTECEDENTES.....	21
6. OBJETIVOS.....	23
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	23
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
7. MARCO METODOLÓGICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
7.1. TIPO DE ESTUDIO.....	24
7.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	24
7.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	24
7.4. PROCESAMIENTO DE CÉLULAS BUCALES.....	24
7.5. COLORACIÓN DE LAS PLACAS.....	25
7.6. CONTEO Y CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ANOMALÍAS NUCLEARES PRESENTES EN LA MUCOSA BUCAL.....	25
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
9. RESULTADOS.....	27
9.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.....	27
9.2. FRECUENCIA DE ANOMALÍAS NUCLEARES INDUCIDAS POR EL CONSUMO DE CIGARRILLO.....	29
9.3. EVALUACIÓN DE LA EDAD SOBRE LA FRECUENCIA DE LAS ANOMALÍAS NUCLEARES.....	35
9.4. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PROLIFERATIVO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL DE LOS PARTICIPANTES.....	41
9.5. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.....	42
9.6. DETERMINACIÓN DE LAS CORRELACIONES ENTRE LOS BIOMARCADORES USADOS EN EL ENSAYO.....	44
9.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONSUMO DE ALCOHOL, Y LA DIETA, SOBRE LA MODULACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LAS ANOMALÍAS NUCLEARES.....	45
10. DISCUSIÓN.....	49
11. CONCLUSIONES.....	62
12. RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Células con anomalías nucleares del epitelio bucal teñidas con el método diferencial Feulgen Fast Green.....	18
<b>Tabla 2.</b> Características demográficas de la población objeto de estudio.....	28
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de anomalías nucleares en células del epitelio bucal de fumadores y referentes.....	31
<b>Tabla 4.</b> Frecuencia de anomalías nucleares en las células epiteliales de la mucosa oral evaluadas con la marca de cigarrillo.....	35
<b>Tabla 5.</b> Frecuencia de anomalías nucleares en las células epiteliales de la mucosa oral evaluadas con el tiempo de consumo.....	35
<b>Tabla 6.</b> Coeficiente de correlación entre la edad y la frecuencia de ANs en células del epitelio bucal.....	38
<b>Tabla 7.</b> Impacto del consumo de cigarrillo en el potencial proliferativo del epitelio bucal.....	42
<b>Tabla 8.</b> Efecto del consumo de cigarrillo sobre el índice de reparación de las células buco-epiteliales de los participantes.....	42
<b>Tabla 9.</b> Coeficiente de correlación entre los biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad, índice de reparación y potencial proliferativo.....	43
<b>Tabla 10.</b> Efecto del consumo de alcohol y cigarrillo en la frecuencia de anomalías nucleares.....	45
<b>Tabla 11.</b> Evaluación del efecto modulador de la dieta sobre la frecuencia de anomalías nucleares BE y BN.....	46
<b>Tabla 12.</b> Evaluación del efecto modulador de la dieta sobre la frecuencia de anomalías nucleares PIC, CC, CR y CL.....	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estratificación y migración de las células de la cavidad oral.....	19
<b>Figura 2.</b> Fotografías de las Anomalías Nucleares inducidas por el consumo de cigarrillo en fumadores del departamento del Cauca.....	29
<b>Figura 3:</b> Análisis de correlación lineal entre las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares y el número de paquetes-años.....	32
<b>Figura 4.</b> Análisis de correlación lineal entre las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares y el tiempo de consumo en años.....	34
<b>Figura 5.</b> Análisis de correlación lineal entre las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares y la edad.....	38
<b>Figura 6.</b> Fotografía de las células basales del epitelio bucal de los participantes.....	40
<b>Figura 7.</b> Gráfico del impacto de fumar cigarrillos sobre el índice de reparación en las células exfoliadas de los de los participantes.....	43

## RESUMEN

**Introducción:** Una de las problemáticas a nivel mundial que afecta notoriamente la salud del hombre es indiscutiblemente el consumo de cigarrillo, el cual se ha convertido en un precursor de cientos de enfermedades que han llevado a un inevitable aumento en la mortalidad de las poblaciones expuestas. Actualmente uno de los biomarcadores ampliamente utilizado en la evaluación del daño genético, muerte celular y potencial regenerativo es el ensayo de anomalías nucleares. La evaluación de estos biomarcadores en tejidos de fácil obtención (células exfoliadas del epitelio bucal) se establece como herramienta prometedora para el estudio de carcinógenos ambientales como el humo de cigarrillo y su aplicación permite detectar de manera confiable la rotura de cromosomas, anomalías citoquinéticas y el proceso apoptótico que tiene un lugar importante en la carcinogénesis.

**Objetivo:** El presente estudio tuvo como objetivo principal: Determinar el daño citotóxico y genotóxico provocado por el humo de cigarrillo en una población fumadora del departamento del Cauca mediante el biomarcador de anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal.

**Metodología:** Se seleccionaron 160 sujetos sanos (80 varones consumidores de cigarrillo y 80 varones no fumadores) entre los 18 y 40 años. Las muestras se obtuvieron a partir de un frotis vigoroso sobre el interior de las mejillas con un cepillo citológico, posteriormente fueron procesadas en el laboratorio y tenidas con el método diferencial Feulgen Fast Green. Para cada sujeto fueron evaluadas 1000 células en aumentos de 40x y 100x. La evaluación celular fue determinada por criterios morfológicos propuestos Tolbert en 1991, y el análisis estadístico fue procesado por el programa SPSS 11, con pruebas no paramétricas (U de Mann Withney y Kruskal Wallis).

**Resultado:** Los resultados indican que el hábito de fumar induce aumentos estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ) en las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares, además esta frecuencia se asocia positivamente con la intensidad de exposición (paquetes-años) y el tiempo de consumo. De la misma manera, el consumo de cigarrillo disminuye la proliferación y la reparación de células epiteliales de la cavidad bucal.

**Conclusión:** El ensayo de anomalías nucleares es un método sensible y puede ser utilizado de manera confiable para evaluar el daño en el ADN, el potencial proliferativo y la muerte celular en las células bucales de población expuesta a humo de cigarrillo.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad se cuenta con una amplia información que evidencia el efecto del humo de cigarrillo con el desarrollo del cáncer, afecciones respiratorias y problemas cardiovasculares (IARC, 2002; U.S. Department of Health and Human Services, 2004). En las últimas décadas, el hábito de fumarse ha convertido en uno de los principales factores de riesgo que acaba con la vida de 6 millones de personas al año en el mundo (IARC, 2013; NIDA, 2010; Samet, 2009; WHO, 2011). Para enfrentar la epidemia de enfermedades causadas por este hábito, se propone el uso de biomarcadores sensibles como estrategia promisoría para determinar el riesgo a desarrollar neoplasias malignas en las poblaciones vulnerables. Por lo tanto es indispensable continuar con investigaciones que planteen métodos cada vez más sensibles, para la detección temprana de cambios celulares malignos producidos por los carcinógenos del cigarrillo.

Aproximadamente 5.300 compuestos químicos están presentes en el humo de cigarrillo, de los cuales 70 se han clasificado como carcinogénicos en humanos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2013). Las nitrosaminas específicas del tabaco 4- (metil – nitrosamino)- 1-(3 – piridil) 1-butanona (NKK), N'- nitrosornicotina (NNN) entre otras sustancias químicas oxidantes e irritantes, son altamente reactivas e interactúan con el material genético, provocando transformaciones celulares en los tejidos expuestos (Fenech, 2007; Smith et al., 2003; WHO, 2009). La cavidad oral es uno de los tejidos más afectados por los agentes tóxicos presentes en el cigarrillo, de hecho, ya se ha establecido una relación dosis-respuesta entre la cantidad de cigarrillos consumidos por día y el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de boca (DeMarini, 2004).

En toxicología genética, el uso del ensayo citómico de células exfoliadas compuesto por el biomarcador de micronúcleos y el biomarcador de anomalías nucleares, ha sido determinante en la evaluación citotóxica y genotóxica de xenobióticos ambientales y ocupacionales en biomonitoreos poblacionales, debido a que esta es una prueba rápida y sensible que permite hacer vigilancia epidemiológica en el riesgo potencial de desarrollo de enfermedades como el cáncer (Thomas y Fenech, 2011). Las anomalías nucleares son marcadores categóricos de cambios en la estructura nuclear, y su incremento anormal se debe al producto de la interacción entre células germinativas y los compuestos tóxicos como los presentes en el cigarrillo. Éste es un biomarcador que está siendo ampliamente usado para evaluar los efectos tóxicos de factores de riesgo, que han resultado ser sensibles para este propósito en varios estudios conducidos *in vitro*, *in vivo* y en monitoreo poblacional (Thomas et al., 2009).

En Colombia, hasta el momento existen pocas investigaciones que caractericen la etiología de las enfermedades en cuanto a efectos citotóxicos y genotóxicos tempranos en las poblaciones expuestas, bajo condiciones particulares como el estilo de vida, el ambiente y la etnicidad. Por esta razón, es necesario que se lleven a cabo investigaciones, que evalúen la sensibilidad de los biomarcadores para anticipar el diagnóstico clínico en órganos blanco provocado por el consumo de cigarrillo. De igual manera, se requieren estudios que favorezcan el proceso de validación de este tipo de biomarcadores, para el monitoreo de poblaciones, y en el futuro puedan ser estudios que revelen patrones centinelas para potenciales lesiones premalignas y malignas.

En este sentido, el objetivo de este estudio fue determinar el daño citotóxico y genotóxico provocado por el humo de cigarrillo una población del departamento del Cauca mediante el biomarcador de anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal. Este estudio se escogieron aleatoriamente 80 hombres fumadores y 80 hombres no fumadores, en el cual se asociaron variables como: tiempo e intensidad de consumo de cigarrillo, edad y factores de estilo de vida como el consumo de alcohol.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), considera al consumo de cigarrillo como uno de los principales factores de riesgo por el número de muertes y/o enfermedades que produce sobre las poblaciones expuestas (IARC, 2012; WHO, 2011). La Organización Mundial de la Salud OMS reportó en el año 2009, que había 1.300 millones de adultos fumadores en todo el mundo, lo que representa la vulnerabilidad de desarrollo de enfermedades como el cáncer, al 22% de la población adulta a nivel mundial (WHO, 2011). Recientes informes epidemiológicos evidencian un incremento paulatino en el número de muertes en el mundo a causa del consumo de cigarrillo, convirtiéndolo en la primera causa de muerte prevenible con más de 6 millones de muertes en el 2011 (WHO, 2011) y se estima que al 2030 el número incrementará a más de 10 millones (Shafey et al., 2010). La proyección de muertes en el mundo por consumo de cigarrillo en el 2015, se estima en un 33% por neoplasias malignas, 29% por enfermedades respiratorias, 29% por enfermedades cardiovasculares y un 8% por tuberculosis, diabetes y enfermedades digestivas (Eriksen et al., 2012).

En Colombia, el cigarrillo se consolida como la segunda sustancia psicoactiva legal por debajo del consumo de alcohol, con más de 5.1 millones de fumadores, como resultado diariamente mueren cerca de 75 personas por enfermedades relacionadas con el consumo de cigarrillo. Reportes epidemiológicos evidencian que el departamento del Cauca presenta una prevalencia en el hábito de fumar con tendencia al alza del 15,6% por debajo de la media nacional con el 17.3% (MPS y DNE, 2008; MPS, 2011). Según el Ministerio de Salud y Protección Social Colombiano (MPS), la tasa de consumo de cigarrillo es mucho más alta en adolescentes que en adultos, iniciando este hábito desde edades muy tempranas, de ellos un alto porcentaje de fumadores son adictos y a muchos de estos se les hace difícil abandonar este hábito (American Cancer Society, 2010). Según la investigación realizada por Proyectos Prioritarios de la Secretaría Departamental de Salud, en el Cauca la edad promedio para el inicio del consumo de cigarrillo es de 13.9 años de edad (Storr et al., 2008), lo que ha generado unas de las principales problemáticas de salud pública a nivel local.

Una de las principales patologías asociadas al consumo de cigarrillo, es el cáncer de pulmón. A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la forma más frecuente de cáncer en términos de incidencia y de mortalidad causando cerca de 1,59 millones de muertes cada año (WHO, 2012). La asociación con el tabaquismo es tal que la incidencia de muerte por cáncer de pulmón es 46 por cada 100.000 habitantes entre quienes fuman 10 cigarrillos, y se incrementa a 246 por 100.000 habitantes entre quienes fuman más de 20 cigarrillos diarios (Rubin, 2003). Se reporta que el 90% de las personas que desarrollan algún tipo histológico de cáncer de pulmón son fumadores. Además, este riesgo está directamente asociado al tiempo que se lleva fumando (Harris et al., 2009; Society, 2005). El consumo de cigarrillo tiene

una relación con el cáncer oral, el riesgo de padecer cáncer en la cavidad oral es de 1 a 10 casos por 100.000 habitantes en la mayoría de países desarrollados (WHO, 2007), y este riesgo es mucho mayor en combinación con el consumo de alcohol (McErlean y Ginsberg, 2011). El carcinoma oral de células escamosas abarca al menos el 90% de los casos de neoplasias orales malignas presentes cada año, considerándolo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Massano et al., 2006), El tabaquismo también es precursor de afecciones respiratorias y cáncer en otro tipo órganos como laringe, orofaringe, hipofaringe, esófago, tanto en el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma, cáncer de estómago, hígado, páncreas, y vejiga (IARC, 2004; Mackay et al., 2006; Society, 2005). el tabaquismo es también una causa de carcinoma de células escamosas del cuello uterino, leucemia mieloide, y el riesgo de cáncer colorrectal también puede incrementarse por este hábito (IARC, 2012).

Uno de los tejidos más afectados por la exposición directa a mutágenos, carcinógenos y sustancias químicas presentes en el ambiente es el tejido epitelial, esta es la razón por la cual el 90% de los cáncer se inician en las células epiteliales (Thomas et al., 2009). Al igual que muchos agentes tóxicos ambientales, el cigarrillo afecta el epitelio de los órganos respiratorios incluidos los de la cavidad bucal. Los cancerígenos presentes en el cigarrillo interactúan directamente con el ADN de las células epiteliales causando mutaciones, que desencadenan eventos de inicio, desarrollo y progresión de enfermedades que posteriormente llegaran al cáncer y/o la muerte (Shafey et al., 2010).

La cavidad oral ha sido presentada como el espejo que refleja la salud del individuo, debido a que es ahí donde se encuentra los primeros eventos deletéreos provocados por agentes xenobióticos que ingresan por la vía de inhalación o ingestión. Es así que en las últimas décadas ensayo citómico en células exfoliadas de la mucosa oral (BMCyt) se presenta como método prometedor para predecir el riesgo progresivo de desarrollar enfermedades, debido a que su metodología es rápida, económica y mínimamente invasiva que permite medir el daño mediante biomarcadores citogenéticos. Sin embargo el consorcio del proyecto internacional de micronúcleos humanos en células exfoliadas (HUMN<sub>XL</sub>) quien lleva a cabo el proceso de validación, continúa generando incertidumbre por causa de la variabilidad en los métodos utilizados tanto de recolección como técnicas de tinción, los cuales representan el 38% de la variabilidad total de los resultados. Adicionalmente, son escasos los estudios que establezcan los efectos citotóxicos y genotóxicos del hábito de fumar con el biomarcador de anomalías nucleares (Thomas y Fenech, 2011). Por esta razón se requieren nuevas investigaciones que ayuden a determinar su utilidad en la evaluación del daño genético en poblaciones vulnerables. Por lo tanto el presente estudio respondió las siguientes preguntas ¿el consumo de cigarrillo produce daño citogenético en células epiteliales de la mucosa bucal de una población fumadora del departamento del Cauca?, y si es así ¿el uso de anomalías nucleares son sensibles para detectar los efectos genotóxicos y citotóxicos?

### 3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de cigarrillo representa la principal causa única prevenible de enfermedad, discapacidad y muerte en el mundo actual. Por esto, entre las metas del sector salud especialmente de la organización mundial de la salud (OMS) que se ha propuesto alcanzar hacia el año 2020, es la disminución significativa de los índices de prevalencia de consumo de cigarrillo en la población a nivel mundial y en el país. En estos momento Colombia es pionero en la prevención de este hábito en Suramérica: Con los programas de prohibición total de la publicidad, desarrollo de políticas en salud pública para control del tabaco y advertencias sanitarias en las cajetillas, entre otras acciones, han llevado al país a estar a la vanguardia en la prevención del consumo del consumo de cigarrillo de acuerdo a lo establecido en los artículos 14 al 17 de la ley 1335 del 2009. Aunque se logrado un discreto descenso del 5% en la prevalencia de consumo de cigarrillo, la mortalidad sigue siendo muy elevada (MPS, 2011). Por esta razón se requiere el estudio de nuevos modelos educativos y clínicos que contribuyan a la disminución y remplazo de este hábito particularmente en las poblaciones jóvenes.

La patología que desata mayor número de muertes entre quienes consumen cigarrillo es el cáncer, por lo tanto hay una necesidad urgente de reducir esta epidemia a través de estrategias preventivas efectivas, ya que su cura a través de los tratamientos establecidos de radioterapia y quimioterapia no han logrado reducir la mortalidad. Siguiendo este interés, el uso de biomarcadores citogenéticos que puedan evaluar estadios tempranos de la enfermedad, son útiles para diseñar modelos de seguimiento y tratamientos más efectivos. Uno de los biomarcadores que ha despertado interés en el área de la toxicología genética y la epidemiología molecular es el ensayo citómico de micronúcleos y de anomalías nucleares debido a que es una prueba que permite ser llevada a cabo en diversos tejidos con células en división o interface incluyendo las células epiteliales (Thomas et al., 2011).

En comparación con otras partes del cuerpo, el tejido epitelial bucal ofrece una oportunidad única para definir biomarcadores, porque permite encontrar los primeros acontecimientos citotóxicos y genotóxicos como resultado de los carcinógenos potenciales que entran en el cuerpo. Las células bucales han demostrado tener una capacidad de reparación de ADN limitada con relación a los linfocitos de sangre periférica, lo cual permite expresar de forma precisa la inestabilidad genómica y la muerte del tejido acorde a su nivel de exposición atreves de marcadores citogenéticos (Dhillon et al., 2004; Holland et al., 2008). De igual forma, el uso de células epiteliales de tejidos diana de fácil obtención ofrece además, una alternativa que permite estimar el índice de proliferación celular así como la capacidad de reparación del tejido. Por este motivo, la conducción de estudios que incluyan parámetros de medición de daño en el ADN y de eventos deletéreos en tejidos blanco originado por los cancerígenos presentes en el humo

de cigarrillo, son útiles para aclarar los perfiles citogenéticos de inicio, desarrollo y control de la enfermedad.

Ya varias investigaciones han demostrado sensibilidad en pruebas *in vitro*, *in vivo*, y en biomonitorio de poblaciones humanas expuestas, para determinar la genotoxicidad y citotoxicidad de varios agentes mutágenos, carcinogénicos y para la identificación de individuos susceptibles a cáncer (El-Zein et al., 2008). El ensayo en células exfoliadas bucales es un método útil para el seguimiento de alteraciones genéticas en los seres humanos expuestos al humo de cigarrillo, ya que, la colección de células bucales es probablemente el método menos invasivo para medir el daño del ADN. (Bonassi et al., 2011). Por esta razón, existe aun la necesidad de conducir estudios de biomonitoreos poblacional utilizando el ensayo de anomalías nucleares con el fin de generar criterios confiables que ayuden a determinar su utilidad la evolución del daño en el ADN y para monitorear e identificar genotoxicidad y citotoxicidad (Bonassi et al., 2011). De igual forma tener conocimiento acertado que pueden tener impacto a nivel investigativo y ambiental en nuestra sociedad para que se tomen medidas de protección para disminuir los efectos adversos de la exposición en particular de las poblaciones jóvenes.

Actualmente Colombia cuenta con pocos estudios que evidencien el efecto del hábito de fumar con tejidos blanco de fácil obtención, teniendo en cuenta condiciones particulares ambientales, edad, dieta y factores individuales genéticos. Por lo tanto este estudio es pionero abordando la problemática en un tejido centinela de exposición directa con el biomarcador de anomalías nucleares, incluyendo sus aplicaciones derivadas como el índice de reparación, potencial proliferativo y muerte celular, lo cual complementa estudios de la evaluación del consumo de cigarrillo en jóvenes Caucanos con el biomarcador de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica desarrollado por Arboleda en el 2004.

Este estudio tuvo como finalidad generar conocimiento que permite evidenciar la sensibilidad del biomarcador de anomalías nucleares ANs para determinar daño genético en una población fumadora del departamento del Cauca haciendo uso de metodologías adecuadas tanto de recolección, procesamiento de muestras, tinción diferencial específica para ADN y criterios de lectura apropiados propuestas por Thomas y Fenech en el 2011, así se permite minimizar los falsos positivos, generar datos confiables y a su vez aportara información relevante en la iniciativa internacional para validar éste biomarcador de efecto temprano para predecir el perfil de riesgo a cáncer (Thomas y Fenech, 2011).

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. COMPUESTOS DEL CIGARRILLO

El humo de cigarrillo es una mezcla compleja de compuestos químicos que comprende dos fases, la primera, compuesta por gases y productos semivolátiles denominada fase de vapor, constituida por oxígeno, carbono y nitrógeno que representan el 95,5% de todo el humo. El 4,5% restante de todo el humo corresponde a la segunda fase de material particulado. Este complejo de compuestos químicos presente en el humo de cigarrillo tiene cerca de  $4 \times 10^9$  partículas con un diámetro de aproximadamente 0,2 micras, que en su mayoría se encuentran en forma de radicales libres, que son trascendentales en el inicio y desarrollo de enfermedades. (Pasupathi et al., 2009; Smith et al., 2003). El humo de cigarrillo, ha generado controversia por los efectos adversos que repercuten sobre la población. Muchos de estos efectos son causados por componentes como: la nicotina, el alquitrán, monóxido de carbono y otros agentes químicos, con funciones oxidantes e irritantes.

Uno de los principales compuestos presentes en el cigarrillo es la nicotina, este es un alcaloide de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que ocupa el 2% de un cigarrillo. En promedio un cigarrillo contiene de 6 a 11 mg de nicotina, de los cuales un fumador promedio absorbe de 1 a 3mg. El 95% de la nicotina que es aspirada llega al pulmón, de ahí llega a la sangre y a distintos órganos del cuerpo en escasos 10 segundos (U.S. Department of Health and Human Services, 2010). Las investigaciones evidencian que la nicotina se concibe como un obstáculo para la prevención de muertes provocadas por el cigarrillo, ya que es un ingrediente altamente adictivo, el cual activa el sistema mesolímbico en el cerebro y aumenta los niveles de dopamina, una sustancia química clave en la mediación del deseo de consumir cigarrillo y drogas (NIDA, 2011; Shafey et al., 2010). Aunque la nicotina no es cancerígena por sí sola, los efectos de la combustión generan derivados que puede mejorar la carcinogenicidad de diversas maneras (Schuller 2009), provocando en su mayoría mutaciones específicas en genes como RAS, p53, MYC e induciendo una cadena de eventos que promueven y desarrollan tejidos cancerosos (Wogan et al., 2004).

La materia particulada total, después de restar la cantidad de nicotina y agua, se conoce como "alquitrán". El alquitrán al igual que el monóxido de carbono, son producto de la pirólisis incompleta de la combustión del cigarrillo, el alquitrán compuesto por más de 1.000 compuestos químicos que se depositan en los pulmones y son absorbidos gradualmente, generando distintas afecciones respiratorias. El monóxido de carbono es 250 veces más afín a la hemoglobina que el oxígeno, permitiendo la formación de carboxihemoglobina, este producto puede durar 6 horas circulando en el cuerpo, de manera que la hemoglobina

queda enganchada y el oxígeno no es llevado a los tejidos, generando fatiga muscular(Shafey et al., 2010).

Otras sustancias químicas presentes en el humo de cigarrillo son: óxidos de nitrógeno, amidas aromáticas como el 4-aminobifenil y 2-naftilamina, ácidos carboxílicos, lactonas, ésteres, aldehídos como el formaldehído y el acetaldehído, fenoles como el catecol y el ácido cafeico. Entre los derivados carcinogénicos de la nicotina tenemos a: N-nitrosoanabasina (NAB), N-nitrosoanatabina (NAT), N-nitrosornicotina (NNN), N-nitrosaminas (TSNA) como el 4-(Metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona(NNK), hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos monocíclico y policíclicos (HAPs) como el benceno, entre estos TSNA, NNK y NNN sean considerados cancerígenos en humanos por la IARC y se ha considerado que las NNK pueden tener efectos tumorogénicos más fuertes (Amin et al., 1996; Rodgman y Perfetti, 2009). También se encuentra el cianuro de hidrógeno, amoníaco, y nitrosaminas. (Pieraccini et al., 2008). Hidrocarburos volátiles, el DDT y compuestos inorgánicos como el cadmio y el polonio-210, que también son cancerígenos humanos conocidos. (Djordjevic et al., 1991; IARC, 1986).

En total más de 5.300 compuestos han sido identificados en el humo del cigarrillo (Rodgman y Perfetti, 2009), de los cuales 70 compuestos químicos se han categorizados por la IARC por su carcinogenicidad en humanos (Smith et al., 2003). Se han encontrado resultados contundentes los cuales muestran una relación directa entre carcinógenos del cigarrillo y el desarrollo del cáncer (Huang y Chen, 2011).

#### **4.2. CARCINOGENESIS Y PROGRESIÓN TUMORAL**

El cigarrillo contiene una mezcla de sustancias cancerígenas, promotores tumorales, y co-cancerígenos que en su mayoría requiere activación metabólica para ejercer sus efectos cancerígenos. Muchos de estos pueden tomar la vía de activación en el metabolismo para su detoxificación, producto del metabolismo de xenobióticos, comienzan procesos de la transformación celular y tumorogenesis en los tejidos candidatos donde las diferencias entre las formas individuales de detoxificar afecta el riesgo a padecer cáncer (Hecht, 2003).

Los pasos iniciales se llevan a cabo habitualmente por el citocromo P450. Los compuestos intermedios oxigenados formados en estas reacciones iniciales pueden sufrir transformaciones posteriores por glutatión S-transferasa, la uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferasas, sulfatasas, y otras enzimas de la fase II del metabolismo para ser excretados. Algunos de los metabolitos producidos por las enzimas del citocromo P450 reaccionan covalentemente en sitios nucleófilos (rico en electrones) del ADN para formar productos de unión conocidos como aductos (Hecht, 1998; Jalas et al., 2005). Los aductos en el ADN son absolutamente

fundamentales para el proceso carcinogénico, dado a que si estos persisten evadiendo los mecanismos de reparación, pueden dar lugar a mutaciones permanentes que pueden ir generando transformaciones y acontecimientos múltiples que conllevan a la formación de células aberrantes con pérdida de control del crecimiento normal y finalmente al cáncer( Wogan et al., 2004).

La nicotina 3-1-metil-2- pirrolidinil piridina, y sus derivados como los NNK, se unen a los receptores celulares nicotínicos, lo que resulta en la activación de la serina / treonina quinasa Akt (también conocida como proteína quinasa B), que promueven el aumento de la expresión de la survivina, un inhibidor de la apoptosis en condiciones normales de células epiteliales bronquiales humanas, (Jin et al., 2008). Esto puede causar disminución de la apoptosis, aumento de la angiogénesis y la transformación celular que conducirá al cáncer (Heeschen et al, 2001; West et al, 2003). Los carcinógenos son la conexión clave entre la adicción a la nicotina y el cáncer (Hecht, 2003).

### **4.3. BIOMARCADOR DE ANOMALÍAS NUCLEARES**

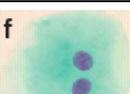
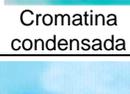
Las anomalías nucleares son cambios nucleares inducidos por tóxicos ambientales, que se pueden identificar mediante el ensayo citómico en mucosa bucal (BMcyt) el cual, además de identificar Micronúcleos formados por pérdida de fragmentos cromosómicos o por cromosomas enteros, permite observar otras permutaciones nucleares y células apoptóticas que son marcadores de genotoxicidad y citotoxicidad (Tabla 1). (Thomas y Fenech, 2011).

Las alteraciones más comunes en la morfología de las células neoplásicas se producen en el núcleo, que puede ser la modificación en tamaño, densidad, o en la distribución de la cromatina. Estos fenómenos son células Binucleadas (BN), Picnóticas o núcleo pequeño (PN), yemas nucleares (BE), alteraciones de la cromatina condensada (CC), Cariorréticas (CR), y Cariolíticas (CL) . La formación de BN se establece por la división del núcleo (cariocinesis), y la interrupción en la división celular (citocinesis), lo que resulta en células BN, pero son otros fenómenos como (PN, CC, KR, y KL) de los mecanismos de su formación aun son desconocidos (Tolbert et al., 1992; Tolbert et al., 1991).

Los biomarcadores de anomalías nucleares en células exfoliadas es una prueba útil para la evaluación del daño citogenético producido por xenobióticos en la exposición ambiental, ocupacional, deficiencias alimenticias y enfermedades. Algunas de las sustancias producidas en la combustión del cigarrillo alteran la homeostasis celular, al reaccionar con el material genético, lo cual les permiten adherirse covalentemente y formar aductos. La unión de estos elementos ocasiona rupturas en las cadenas de ADN que conllevan a la formación de algunas anomalías nucleares (Bernard 2011). Las anomalías nucleares han sido

un biomarcador determinante debido a que se observan en mayor frecuencia en tejidos con cáncer, los cual representan un fenotipo común de las células cromosómicamente inestables que podrían aumentar el riesgo de enfermedades degenerativas (Thomas y Fenech, 2011).

**Tabla 1.** Células con anomalías nucleares del epitelio bucal teñidas con el método diferencial Feulgen Fast Green.

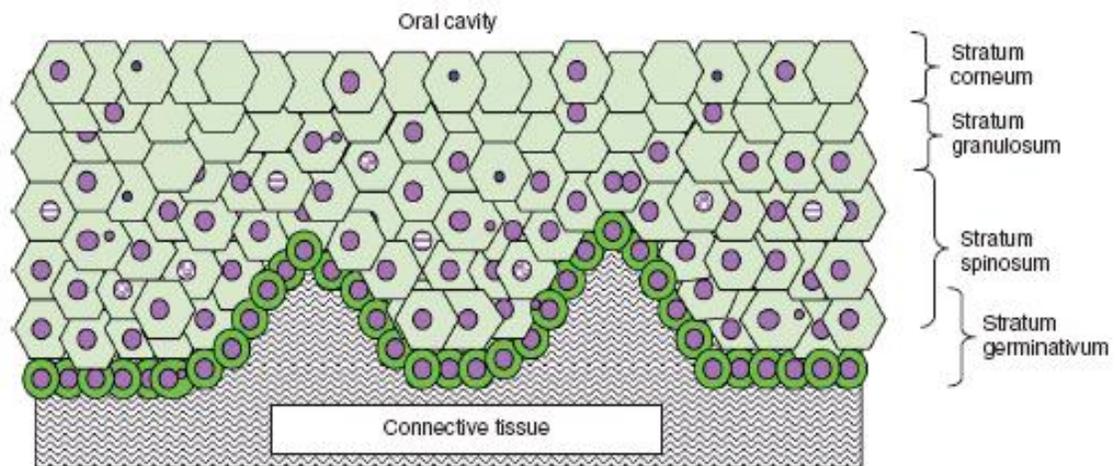
Característica	
Células Normales	<p><b>a</b></p>  <p>Basal</p> <p>Las células basales tienen un núcleo de manera uniforme manchado, son de menor tamaño y poseen una forma ovalada, en comparación con los células planas diferenciadas.</p>
	<p><b>b</b></p>  <p>Diferenciada</p> <p>Tienen un núcleo normal de manera uniforme, el cual es ovalado o redondo. Se distinguen de las células basales por su mayor tamaño.</p>
Células con Anormales Nucleares	<p><b>d</b></p>  <p>Yema nuclear</p> <p>Contiene un núcleo con una constricción aguda sobre un extremo la eliminación de material nuclear por gemación. La yema nuclear y el núcleo están generalmente unidos entre sí. La yema nuclear tiene la misma morfología y propiedades de tinción como el núcleo.</p>
	<p><b>f</b></p>  <p>Binucleadas</p> <p>Son las células que contienen dos núcleos principales en lugar de uno. Los núcleos están generalmente muy cerca como también pueden entrar en contacto entre sí y generalmente tienen la misma morfología que la observada en las células normales (producido por error en la citocinesis).</p>
	<p><b>g</b></p>  <p>Cromatina condensada</p> <p>Muestran un patrón estriado nuclear en el que la cromatina es ligeramente manchada. En estas células, es evidente que la cromatina del núcleo puede parecer que se está fragmentando.</p>
	<p><b>h</b></p>  <p>Cariorréticas</p> <p>Tienen un núcleo que se caracteriza por tener un mayor extendido nuclear, en relación con las células de la cromatina condensada. Tienen al parecer un moteado nuclear, patrón indicativo fragmentación nuclear que conduce a la eventual desintegración del núcleo</p>
	<p><b>i</b></p>  <p>Picnóticas</p> <p>Se caracterizan por un pequeño núcleo encogido, con una alta densidad de material nuclear que se tiñe de manera uniformemente e intensa. Con un diámetro de uno a dos tercios del núcleo normal.</p>
	<p><b>j</b></p>  <p>Cariolíticas</p> <p>Son células, en las que el núcleo y el ADN se encuentran totalmente dañados visualizándose como una imagen fantasma.</p>

Fuente tomada y modificada de (Thomas y Fenech, 2011).

#### 4.4. BIOMARCADOR DE ANOMALÍAS NUCLEARES EN CÉLULAS BUCALES

La mucosa bucal es un epitelio escamoso estratificado que consta de cuatro capas diferenciadas (ver Figura 1) que proporcionan una barrera. El 90% de todos los cánceres tiene un origen epitelial, por lo tanto, la mucosa bucal se podría utilizar para controlar los primeros acontecimientos genotóxicos como resultado de la interacción de las células basales con carcinógenos que ingresan en el organismo (Jagetia et al., 2001; Thomas et al., 2009).

**Figura 1.** Estratificación y migración de las células de la cavidad oral.



Fuente tomada de(Thomas y Fenech, 2011).

El estrato córneo o capa de células queratinizadas, es la línea de las células que están siendo constantemente arrojadas como resultado del desgaste de la superficie del tejido. Debajo de esta capa, se encuentra el estrato granuloso, y el estrato espinoso, que contiene las poblaciones de células diferenciadas, apoptóticas y necróticas. Debajo de estas capas encontramos el estrato germinativo, que contienen células basales que se dividen activamente, las cuales producen una progenie que se diferencia y mantiene el perfil, la estructura y la integridad de la membrana basal. El periodo de migración celular de capa basal hasta la capa superficial queratinizada oscila entre los 7 a 21 días (Thomas y Fenech, 2011; Tolbert et al., 1991). El monitoreo biológico en la cavidad oral, evaluado con el biomarcador de anomalías nucleares, provee de información vital acerca del estado y el riesgo de del desarrollo de enfermedades como el cáncer.

El ensayo ha sido utilizado con éxito en investigaciones que incluyen la cavidad oral, cavidad nasal, los bronquios, esófago, cuello del útero, la vejiga y el tracto urinario, debido a que el tejido epitelial proporciona una oportunidad única para

estudiar la capacidad de regeneración del tejido epitelial acorde la exposición a agentes exógenos y endógenos. Los biomarcadores de anomalías nucleares también presentes en el ensayo citómico de MN propuesto por primera vez en 1983 y continúa ganando popularidad como un biomarcador de daño genético en numerosas aplicaciones (Bonassi et al., 2011).

#### **4.5. ÍNDICE DE REPARACIÓN (IR) Y POTENCIAL PROLIFERATIVO.**

El índice de reparación es un biomarcador que permite evaluar la dinámica celular del tejido epitelial hacia la carcinogénesis en la mucosa oral (Celik et al., 2010). Las células cariorréticas y las células con yemas nucleares son consideradas estadios morfológicos previos a las células cariolíticas y la formación de micronúcleos, la relación de células indicadoras de apoptosis (CL y CR) y células indicadoras de daño al ADN (MN y BE) expresado mediante la fórmula  $IR = (CL + CR) / (MN + BE)$  son analizados para seguir la degeneración nuclear, contemplada por los efectos: clastogénicos, mutagénicos y carcinogénicos ocurridos durante el proceso degenerativo de la homeostasis del epitelio bucal (Ramirez y Saldanha, 2002).

El biomarcador de Potencial Proliferativo determinado mediante el recuento de células basales (germinativas) permite estimar alteraciones en el recambio celular del epitelio bucal (Sanchez-Siles et al., 2011; Thomas et al., 2009). La proliferación celular es fundamental para la regeneración de los tejidos estratificados, su estimulación o retardo podría ser alterado por afectado por agentes endógenos y exógenos, lesiones en el ADN, la muerte celular y por la deformación mecánica en las células germinativas. Esa multiplicación celular está regulada por factores químicos del microambiente. Un exceso de agentes estimuladores o un déficit de inhibidores producen finalmente un desequilibrio en el recambio del tejido como por ejemplo el envejecimiento prematuro que genera una delgada capa de células, y en el caso del cáncer un crecimiento incontrolado.

## 5. ANTECEDENTES

Evidencia científica muestra que el humo de cigarrillo contiene potentes compuestos iniciadores y precursores del cáncer (IARC, 2013). Por tal razón existe un interés en la comunidad médica y científica para identificar métodos de tamizaje que posibiliten evaluar estadios tempranos de la enfermedad en la población expuesta para brindar un tratamiento oportuno. Para esta revisión fue necesaria la búsqueda vertiginosa en las bases de datos como ScienceDirect (Elsevier), ProQuest, Nature Publishing e ISI Web of Science, de las investigaciones conducidas con el biomarcador de anomalías nucleares asociadas al consumo de cigarrillo y condiciones particulares como el estilo de vida.

Un gran número de estudios in vivo e in vitro han demostrado el potencial carcinogénico y los eventos citotóxicos y genotóxicos de los compuestos presentes en el humo de cigarrillo (IARC, 2004; Hecht y Hoffmann, 1988; Hecht, 2003). En las últimas décadas, el monitoreo del daño genético en las poblaciones expuestas utilizando biomarcadores se vislumbra como una herramienta útil en la prevención de enfermedades. Los micronúcleos y las anomalías nucleares se constituyen los biomarcadores más prometedores para monitorear el daño genético de poblaciones expuestas, ya sea de células epiteliales o de linfocitos.

Tolbert en 1991 decide aumentar la especificidad del ensayo de micronúcleos (MN) al incluir la evaluación por separado de otras anomalías nucleares relacionadas a citotoxicidad y genotoxicidad. El ensayo modificado se aplicó a 38 consumidores de cigarrillo por medio de un frotis bucal. El patrón de frecuencias de varias anomalías nucleares proporcionan una fuerte evidencia de un efecto citotóxico, las tasas de aumento que van desde 2 a 13. Tolbert informa que las anomalías nucleares pueden comprender mejor el efecto citotóxico de xenobióticos presentes en el cigarrillo (Tolbert et al., 1991). Estudios realizados por Nersesyan en el 2011, y Joshi en el 2011, concluyen de igual manera al investigar el efecto que produce los contenidos de alquitrán y nicotina de los cigarrillos, y masticadores de nuez de areca y tabaco sobre el epitelio bucal respectivamente; Los resultados demostraron que las frecuencias de anomalías nucleares se incrementan de manera significativa en la exposición a bajos niveles de componentes tóxicos del tabaco, lo cual sugiere que estos biomarcadores son más sensibles que los MN, que es el único parámetro que evalúan la mayoría de los estudios (Joshi et al., 2011; Nersesyan et al., 2011).

Stone en 1995, realizó un estudio en el cual registra la frecuencia de aductos en biopsias orales y células exfoliadas bucales, con la finalidad de determinar si la mucosa bucal proporcionaría una fuente alternativa de tejido para biomonitorio humano en personas fumadoras. Los resultados demostraron que los fumadores tenían niveles más altos estadísticamente significativos de daño en el ADN que las muestras obtenidas de los no fumadores ( $P < 0,001$ ). La media de aductos en los

fumadores fue muy similar para las biopsias orales ( $6,16 \times 10^{-7}$ ) y de la mucosa bucal ( $6,73 \times 10^{-7}$ ). Estos datos indican que la mucosa bucal proporciona un tejido adicional para controlar la exposición humana a genotoxinas ambientales (Stone et al., 1995).

El biomonitoreo con anomalías nucleares en el tejido de la cavidad bucal ha sido ampliamente utilizado para la vigilancia biológica de poblaciones expuestas a factores de riesgo ambientales, incluyendo el hábito de fumar. Los resultados del análisis citogenético realizado por Haveric en el 2010 en sangre periférica y células exfoliadas bucales, muestran una correlación positiva y significativa ( $p < 0,05$ ), lo que indica la consistencia y sensibilidad de ambos tejidos. Haveric en el 2010, reunió a 43 fumadores y 44 no fumadores. Los resultados revelaron también que las anomalías nucleares en los fumadores ( $p < 0,05$ ) son modulados por la duración del hábito de fumar ( $F = 5,389$ ,  $p < 0,05$ ) (Haveric et al., 2010). Hasta el momento, solo 4 estudios han reportado el efecto citotóxico y genotóxico del consumo de cigarrillo usando el espectro completo de ANs en células bucoepiteliales de individuos consumidores de cigarrillo (Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2006; Nersesyan et al., 2011; Tolbert et al., 1991). Por el contrario, los resultados negativos se registran en la mayoría de los estudios de población que utiliza la prueba de MN mediante el uso de linfocitos de sangre periférica de los fumadores (Bonassi et al., 2003). Pero en células exfoliadas de la cavidad oral, la frecuencia de MN en relación al consumo de tabaco, tienen algunos resultados contradictorios que generar incertidumbre en la comunidad científica, muchos atribuidos a los procesos metodológicos de tinción y recolección inadecuados que generan variabilidad (D'Agostini et al., 2012; Haveric et al., 2010; Nersesyan et al., 2011; Piyathilake et al., 1995; Stick and Rosin, 1983; Thomas et al., 2009b; Wu et al., 2004).

Es evidente que existen algunas fallas con el uso de biomarcadores específicos y sensibles como el ensayo citómico de micronúcleos bucales asociados con el hábito de fumar ya que, muchas investigaciones solo se limitan al biomarcador de MN, que de cierta manera solo mide el efecto crónico de la exposición en las poblaciones (Thomas et al., 2011). Igualmente, las metodologías utilizadas para especificidad de la prueba no fueron las óptimas para diferenciar ADN nuclear. Por ello se propuso en esta investigación el uso del ensayo de anomalías nucleares uno de los marcadores del ensayo citómico de Micronúcleos como biomarcador citotóxico y genotóxico que hasta la fecha ha sido poco empleado (Thomas et al., 2011).

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el daño citotóxico y genotóxico provocado por el humo de cigarrillo en una población de fumadores del departamento del Cauca mediante el biomarcador de anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal.

### **6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar la frecuencia de células binucleadas, brotes nucleares o yemas, células con cromatinas condensadas, células cariorréticas, picnóticas y cariolíticas presentes en células epiteliales de la mucosa bucal en la población objeto de estudio.

Determinar el potencial proliferativo, mediante la comparación de frecuencias de las células basales, del grupo fumador y grupo no fumador.

Determinar el índice de reparación (IR) mediante la fórmula:  $(\text{Cariolíticas (KR)} + \text{Cariorréticas (KL)}) / ((\text{Yemas nucleares (BE)} + (\text{micronúcleos (MN)}))$ .

Apreciar el efecto citotóxico y genotóxico con el tiempo e intensidad del hábito de fumar, etnicidad y edad.

## **7. MARCO METODOLÓGICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **7.1. TIPO DE ESTUDIO**

El estudio fue de tipo corte transversal analítico en una población fumadora de cigarrillos del departamento del Cauca, con la finalidad de evaluar y analizar el biomarcador de anomalías nucleares en el tejido epitelial bucal en la población expuesta y de la población referente.

### **7.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

La selección de los participantes, se realizó de manera aleatoria. Los individuos preseleccionados de acuerdo a las siguientes criterios de inclusión conocieron los principales objetivos del estudio, posteriormente se llevó a cabo la firma del consentimiento informado, aclarando que su participación fue de forma voluntaria y obtendrían total confidencialidad (Anexo 1), además se le explico que este trabajo de grado ha sido aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca quienes aprobaron los procedimientos que se lleven a cabo y verificaran que se respeten siempre los derechos de los participantes y del medio ambiente (Anexo 2). Finalmente el participante diligencio el formulario de preguntas que consta de variables de interés para la investigación (Anexo 3).

Criterios de inclusión: se tomaron individuos saludables, no expuestos ocupacionalmente a agentes químicos y rayos X en los últimos 2 años. Se seleccionaron fumadores con un mínimo de exposición de 2 años y para el grupo referente, personas que nunca habían consumido cigarrillo.

Según los criterios de inclusión y exclusión se seleccionaron un total de 80 hombres fumadores y 80 hombres no fumadores entre los 18 y 40 años de edad.

### **7.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

La toma de muestras se realizó haciendo un frotis vigoroso al interior de ambas mejillas con ayuda de un cepillo citológico estéril por un periodo de 3 minutos. Posteriormente el citocepillo fue llevado y resuspendido en un tubo FALCON estéril de 15 ml que contenía 5ml de solución buffer bucal. Para preservar las muestras de células bucales antes de ser procesadas, se agregó a cada tubo 3 ml de fijador SACCOMANNO'S. Por último el tubo fue sellado y rotulado con el código del participante(Thomas y Fenech, 2011).

### **7.4. PROCESAMIENTO DE CÉLULAS BUCALES**

El procesamiento de las muestras bucales comenzó con una primera centrifugación por 10 minutos a 1800 r.p.m, en cual se obtuvo el pellet celular.

Después de eliminar las impurezas, el pellet celular fue sometido a 20 µl de dimetilsulfoxido (DMSO) para romper el matriz extracelular y obtener células separadas o libres, este fue disuelto y resuspendido nuevamente en 5ml en la solución buffer de células bucales con ayuda de una pipeta Pasteur por 5 minutos. Este proceso se realizó 2 veces más, modificando la cantidad de dimetilsulfoxido a 30 µl y 50 µl para obtener una suspensión celular óptima. Obteniendo el último centrifugado se procedió a retirar todo el sobrenadante hasta obtener solo el pellet, que fue sometido a prefijación con 1 ml de metanol al 80% frío, para ser montado en el portaobjetos con ayuda de una pipeta, abarcando todo el área de la placa. Finalmente este extendido se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos, para ser fijada en metanol al 80% durante 20 minutos.

### **7.5. COLORACIÓN DE LAS PLACAS**

Después de 1 a 2 días de secado, las placas fueron teñidas por el método diferencial Feulgen Fast Green el cual es específico para ADN. El procedimiento de tinción se realizó sumergiendo las placas en recipientes con concentraciones de etanol al 50% y 20% por un minuto, luego se lavaron en agua MilliQ por 2 minutos, enseguida se llevaron a un recipiente con HCl 5M durante 45 minutos. Para retirar el exceso de ácido se sumergieron las placas en un recipiente con agua de chorro por 3 minutos. En seguida las placas fueron introducidas en un recipiente con colorante Shiff en un cuarto oscuro y a temperatura ambiente por 2.5 horas, rápidamente las placas se lavaron en un recipiente con agua de chorro tibia por 2 minutos y después fueron introducidas en un recipiente con agua Milli Q durante 2 minutos, para así finalmente ser introducidas en el último recipiente con colorante Fast Green donde se dejaron por un tiempo de 1 a 10 segundos y fueron lavadas de nuevo con abundante agua MilliQ para retirar el exceso del colorante. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente por un día, para luego ser fijadas con Xilol y Entellan los cuales permitieron cubrir con el cubreobjetos para la posterior lectura (Thomas y Fenech, 2011).

### **7.6. CONTEO Y CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ANOMALÍAS NUCLEARES PRESENTES EN LA MUCOSA BUCAL**

Los criterios de evaluación para las anomalías nucleares, se basaron principalmente en las descripciones hechas por Tolbert en 1991. Estos criterios están destinados para clasificar las células bucales en categorías 'normales' y las células que se consideran 'anormales', basados en las características citológicas y nucleares que son indicativos de daño en el ADN, y muerte celular (Nefić et al., 2013). Todas las placas fueron visualizadas con microscopio a 40X, y se reportaron las ANs en 1000 células por individuo (Thomas y Fenech, 2011).

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se creó una base de datos con la información contenida en las encuestas y el registro de anomalías nucleares. Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS para Windows con un nivel de significancia del 0.05. Además se realizó un análisis descriptivo de la población fumadora y no fumadora, en la que se describió las categorías del factor principal (consumo o no de cigarrillo) y se determinó la asociación con otras variables demográficas cualitativas con la prueba de  $X^2$  y la prueba de T de Student. El análisis comparativo entre el factor principal (consumo o no consumo de cigarrillo) con las variables demográficas, determinó que no hubo homogeneidad de varianzas por lo tanto el presente estudio realizó su análisis estadístico mediante pruebas no paramétricas.

Las características demográficas que no cumplieron con el criterio de apareamiento correcto, así como variables que generan sobre el efecto sinérgico (alcohol) en la frecuencia de los biomarcadores, se tuvieron en cuenta al momento de realizar el análisis estadístico con el fin de evitar los falsos positivos en la interpretación de los resultados. De esta manera, se pudo establecer que es el factor principal (hábito de fumar) quien interviene directamente con la formación de los biomarcadores genotóxicos y citotóxicos.

VARIABLES	NATURALEZA	ESCALA	RELACION	DATOS
Consumo de cigarrillo	Cualitativa	Nomina.	Independiente	Si-No
Células con yemas nucleares Células binucleadas Células con cromatina condensada Células cariorréticas Células cariolíticas Células picnóticas Índice de reparación Potencial de proliferación	Cuantitativa	Razón.	Dependiente	Frecuencia/1000 células
Dieta	Cualitativa	Ordinal		
Edad	Cuantitativa	Ordinal		
Numero de cigarrillos	Cuantitativa	Ordinal	Independiente	
Tiempo de exposición	Cuantitativa	Ordinal		
Rango de paquetes-año	Cuantitativa	Ordinal		

La prueba de U de Mann Withney complementada con la prueba de Kruskal Wallis permitió determinar el impacto del humo del cigarrillo sobre la frecuencia de anomalías nucleares ANs. La correlación de Spearman permitió determinar la asociación entre el factor principal y las anomalías nucleares con las variables presentes en el estudio como la dieta, edad, tiempo de exposición, así como las asociaciones entre biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad, índice de reparación y potencial proliferativo.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.

Las características demográficas de la población objeto de estudio se resumen en la Tabla 2. En este estudio participó una población sana conformada por 160 con una edad promedio de 26.75 años con un rango de edad entre los 18 a 40 años ( $p>0.05$ ). Todos los sujetos muestreados se reportaron mestizos de acuerdo a los patrones fenotípicos observados ( $p>0.05$ ).

El consumo de cigarrillo en la población fue en promedio de 0.4 paquetes/día (8 cigarrillos/día) con un periodo de consumo de 9.37 años. La intensidad de exposición a cigarrillo en la población tuvo un promedio de 4.14 paquetes-años y se calculó del producto de paquetes de cigarrillos fumados al día por los años de consumo. Las marcas de cigarrillo más frecuentemente consumidas fueron Marlboro (41%) y Boston (40%), mientras que Green, Piel roja y Cool fueron consumidos por el 19% de los fumadores muestreados.

Los resultados del análisis de homogeneidad de varianzas para la variable consumo de alcohol entre los grupos de estudio, indicaron que el grupo expuesto presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) de 1.3 veces mayor que la incidencia de consumo observada en el grupo referente, por esta razón ésta variable tuvo en cuenta para su posterior análisis. Por otro lado, el índice de masa corporal, el consumo de frutas y verduras, y el estrato socioeconómico en los grupos de estudio expuesto y referente fueron similares ( $p>0.05$ ).

**Tabla 2.** Características demográficas de la población objeto de estudio.

Variables	Fumadores N (%)	No fumadores N (%)	Valor- P
Sujetos	80 (100)	80 (100)	
Edad (años)			
Media ± D.E.	26.75 ± 6.35	26.75 ± 6.33	1.000 <sup>b</sup>
Rango	(18-40)	(18-40)	
Población			
Mestiza	80 (100)	80 (100)	
Paquetes de cigarrillo-día			
Media ± D.E.	0.40 ± 0.27	0	N.A
Rango	(0.10 – 1.20)		
Tiempo de consumo de cigarrillo (años)			
Media ± D.E.	9.37 ± 6.48	0	N.A
Rango	(2-30)		
Bebidas alcohólicas			<0.001 <sup>a</sup>
Si consume	75 (93.7)	58 (72.5)	
No consume	5 (6.3)	22 (27.5)	
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )			
Media ± D.E.	23.92 ± 3.83	23.01 ± 3.29	0.063 <sup>b</sup>
Rango	(17.05-30.11)	(16.97-33.98)	
Estrato socioeconómico			
Bajo (1 y 2)	21 (26.3)	27 (33.7)	
Medio (3)	43 (53.7)	32 (40)	0.219 <sup>a</sup>
Alto (4 y 5)	16 (20)	21(26.3)	
Consumo de frutas (porciones/semana)			
No consume	11 (13.8)	3 (3.7)	0.148 <sup>a</sup>
Bajo	36 (45)	40 (50)	
Alto	33 (41.2)	37 (46.3)	
Consumo de verduras (porciones/semana)			
No consume	2 (2.5)	9 (11.3)	0.108 <sup>a</sup>
Bajo	26 (32.5)	28 (35)	
Alto	52 (65)	43 (43.7)	

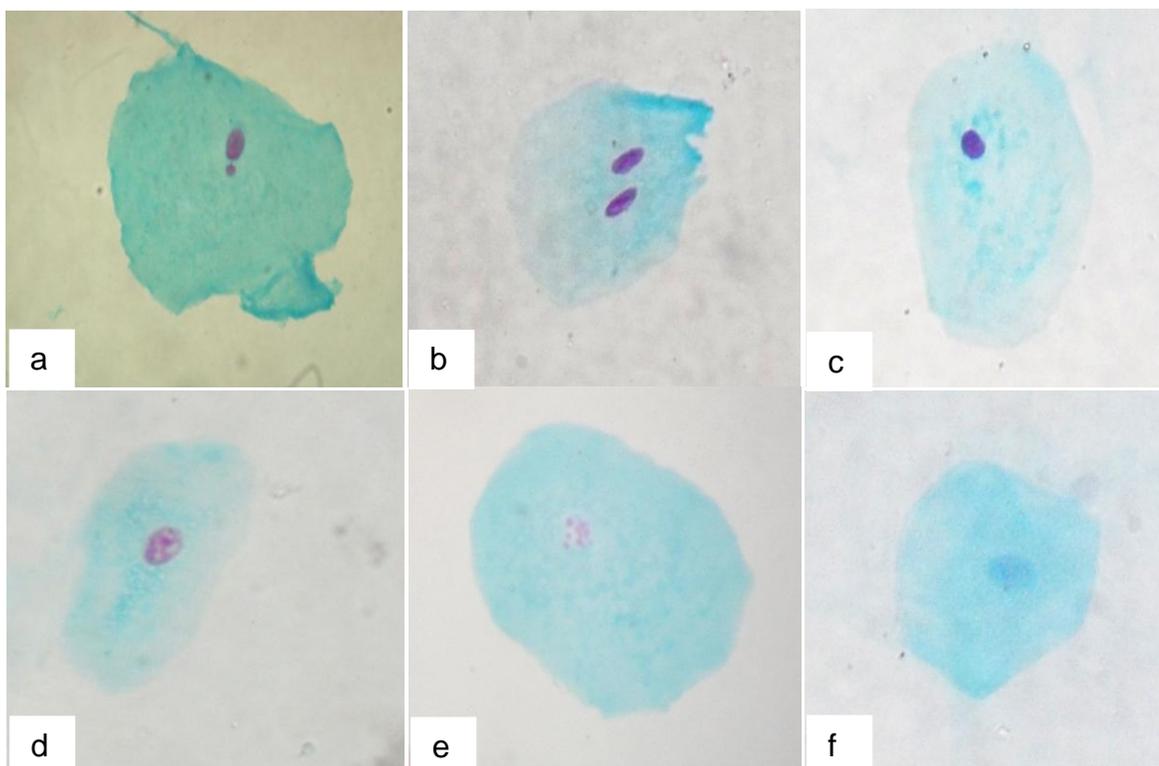
<sup>a</sup> Análisis se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado.

<sup>b</sup> Análisis se realizó mediante la prueba t de Student.

## 9.2. FRECUENCIA DE ANOMALÍAS NUCLEARES INDUCIDAS POR EL CONSUMO DE CIGARRILLO.

La Figura 2, muestra las microfotografías de los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad registrados en la población objeto de estudio.

**Figura 2.** Fotografías de las Anomalías Nucleares inducidas por el consumo de cigarrillo en fumadores del departamento del Cauca.



(a) células con yemas nucleares BE. (Biomarcadores de genotoxicidad)  
(b) células binucleadas BN, (c) células picnóticas PIC, (d) las células con cromatina condensada CC, (e) células cariorréticas CR; (f) células cariolíticas CL. (Biomarcadores de citotoxicidad). Las fotos fueron tomadas a un aumento de 100X.

En la tabla 3 se registran las frecuencias de células con diferentes tipos de anomalías nucleares (AN) en células epiteliales de la mucosa oral de fumadores y no fumadores. Los resultados demuestran que las frecuencias de células con yemas nucleares (BE), binucleadas (BN), picnóticas (PIC), cromatina condensada (CC), cariorréticas (CR) y cariolíticas (CL), fueron significativamente más altas en las células epiteliales del grupo expuesto que en las células grupo referente ( $p \geq 0.05$ ).

Para evaluar el efecto de la intensidad del consumo de cigarrillo, la población fumadora se estratificó en tres categorías según el número de paquete-año así: Bajo <2, Medio 2–4 y Alto >4 paquetes-año. Las BE indicadoras de genotoxicidad, fueron estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) en el rango alto de exposición >4 paquetes-años cuando se compara con las frecuencias registradas en el grupo referente. En cuanto a los parámetros que son indicativos de citotoxicidad, se observaron incrementos estadísticamente significativos ( $p<0.05$ ) de CC y CL en los tres rangos de exposición. Mientras que las células BN, PIC y CR presentaron incrementos significativos ( $p<0.05$ ) en el rango alto de exposición. La Figura 3, muestra el análisis de correlación entre la intensidad de consumo (paquetes-año) y las frecuencias de los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad, en la cual se pudo observar una fuerte asociación positiva ( $P<0.05$ ). El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indica que el número de paquetes-años explica en un 6.4% la variabilidad en el número promedio de BE, 7.8% en BN, 7.8% en CC, 5.6% en PIC, 4.2% en CR y 3.0% en CL.

El análisis que determinó el efecto de la marca de cigarrillo sobre la frecuencia de los diferentes biomarcadores se resume en la Tabla 4. Los resultados del análisis de frecuencias de anomalías nucleares, en la que se comparó las frecuencias de AN de las distintas marcas de cigarrillo con las AN registradas para el grupo referente indican que, el grupo de fumadores que en su preferencia consumieron cigarrillos de la marca Marlboro presentaron incrementos estadísticamente significativos ( $P<0.05$ ) en BN, CL. Mientras que los fumadores que consumieron cigarrillos de las marcas Boston y Otros presentaron incrementos estadísticamente significativos ( $P<0.05$ ) en BN, BE CC, CL y CR.

**Tabla 3.** Frecuencia de anomalías nucleares en células del epitelio bucal de fumadores y referentes.

Variable	N	Frecuencias de anomalías nucleares Media $\pm$ D.E					
		BE	BN	PIC	CC	CR	CL
Hábito							
No fumador	80	0.59 $\pm$ 0.63	0.38 $\pm$ 0.64	5.18 $\pm$ 2.13	38.01 $\pm$ 10.01	17.26 $\pm$ 5.69	45.21 $\pm$ 12.80
Fumador	80	0.82 $\pm$ 0.60	0.66 $\pm$ 0.74	5.88 $\pm$ 1.81	45.72 $\pm$ 10.79	19.97 $\pm$ 5.18	54.56 $\pm$ 12.73
Valor $P^*$		0.015	0.004	0.034	<0.001	0.002	<0.001
Nº de paquetes-año							
Bajo (< 2)	31	0.72 $\pm$ 0.64	0.48 $\pm$ 0.55	5.50 $\pm$ 1.98	45.80 $\pm$ 9.98 <sup>+</sup>	18.59 $\pm$ 4.81	54.50 $\pm$ 13.36 <sup>+</sup>
Medio (2 - 4)	20	0.69 $\pm$ 0.51	0.59 $\pm$ 0.68	5.54 $\pm$ 1.90	45.81 $\pm$ 12.19 <sup>+</sup>	20.26 $\pm$ 5.99	55.47 $\pm$ 13.23 <sup>+</sup>
Alto (> 4)	28	1.03 $\pm$ 0.59 <sup>+</sup>	0.91 $\pm$ 0.91 <sup>+</sup>	6.55 $\pm$ 1.33 <sup>+</sup>	46.31 $\pm$ 10.91 <sup>+</sup>	21.28 $\pm$ 4.72 <sup>+</sup>	55.96 $\pm$ 12.04 <sup>+</sup>
Valor $P^a$		0.015	0.010	0.022	0.001	0.005	<0.001
<i>Rho Spearman</i>		0.259	0.244	0.215	0.312	0.277	0.340
Valor $P^b$		0.001	0.002	0.006	<0.001	<0.001	<0.001

En todos los casos se muestra el promedio + D.E = desviación estándar.

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

\*El análisis se realizó mediante la prueba U Mann-Whitney.

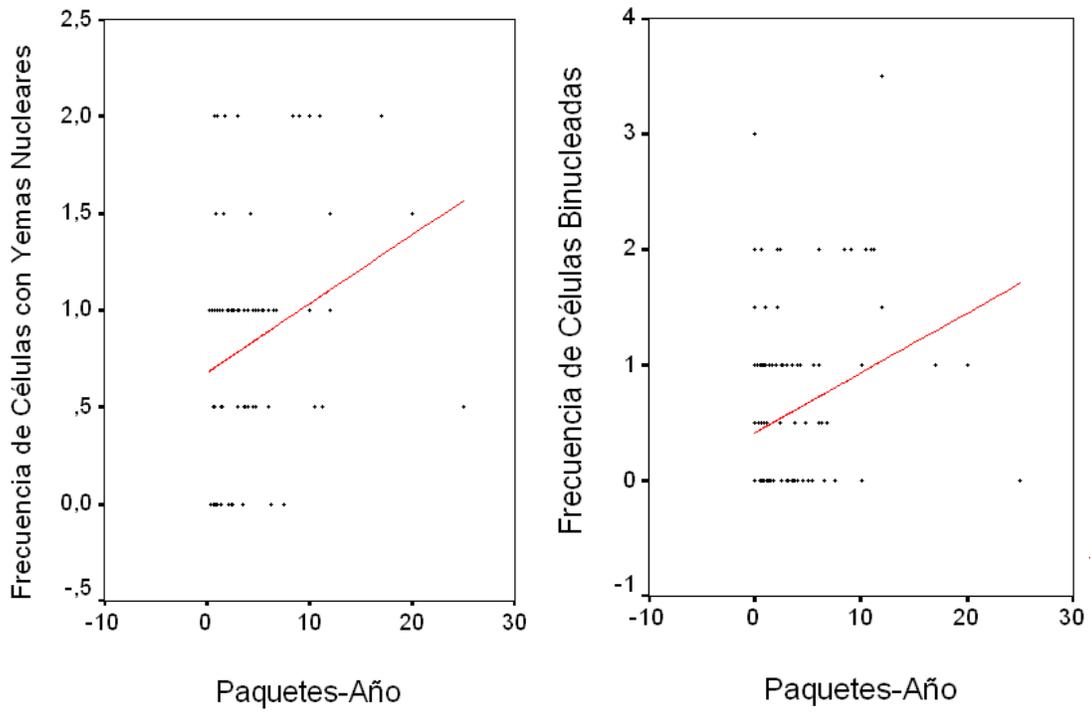
<sup>a</sup>El análisis se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis.

<sup>b</sup>El análisis se realizó mediante la prueba de Correlación Rho de Spearman para el rango de paquetes-años sin estratificar.

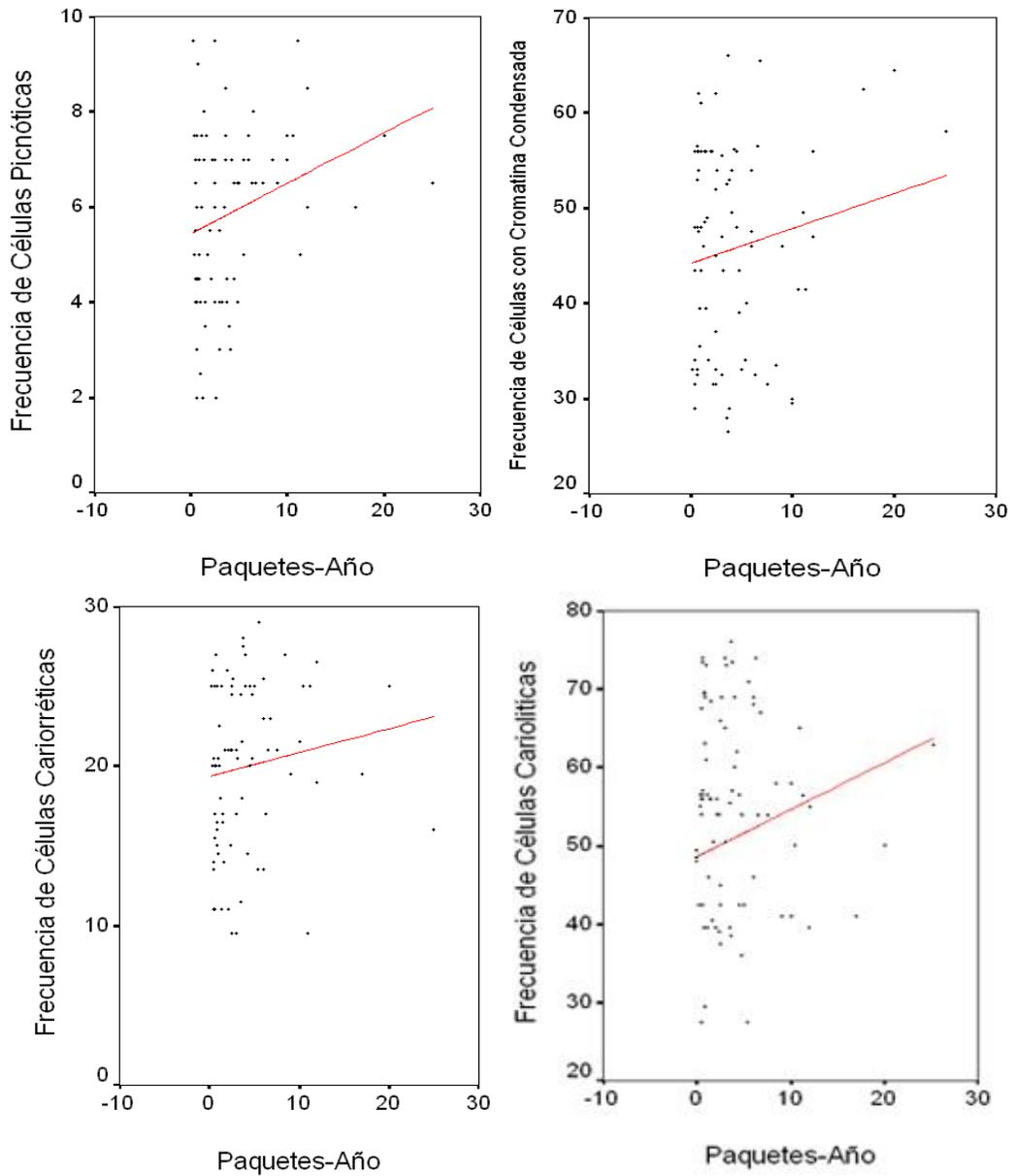
<sup>+</sup>P al nivel de 0.05 cuando se compara con la frecuencia promedio del grupo referente, el análisis se realizó mediante la prueba U Mann-Whitney

N= número de sujetos, BE= Células con yemas nucleares, BN= Células binucleadas, PIC= Células picnóticas, CC= Células con cromatina condensada, CR= Células cariorréticas, CL= Células carioplásticas.

**Figura 3:** Análisis de correlación lineal entre las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares y el número de paquetes-años.



	Yemas nucleares	Binucleadas
ECUACION LINEAL (Y)	$0.623 + 0.042X$	$0.415 + 0.052X$
$R^2$	0.064	0.078
Valor P	0.001	<0.001



	Pícnóticas	Cromatina condensada	Cariorréticas	Cariolíticas
ECUACION LINEAL (Y)	$5.27 + 0.12X$	$40.19 + 0.81X$	$18.00 + 0.29X$	$48.62 + 0.61X$
$R^2$	0.056	0.082	0.042	0.030
Valor P	0.002	<0.001	0.010	0.029

Se presenta la ecuacion lineal para cada caso donde el valor X representa la variable de paquetes-años, el coeficiente de determinacion  $R^2$  y su significancia. **Anomalias nucleares de genotoxicidad:** células con yemas nucleares BE. **Anomalias nucleares de citotoxicidad:** células binucleadas BN, células pícnóticas PIC, células con Cromatina Condensada CC, células cariorréticas CR, células cariolíticas CL. La estimacion fue reportada sobre 1000 células para cada caso.

**Tabla 4.** Frecuencia de anomalías nucleares en las células epiteliales de la mucosa oral evaluadas con la marca de cigarrillo.

Marca de cigarrillo	de N	frecuencias de anomalías nucleares Media $\pm$ D.E					
		BE	BN	PIC	CC	CR	CL
No consume	80	0.59 $\pm$ 0.63	0.38 $\pm$ 0.64	5.18 $\pm$ 2.13	38.01 $\pm$ 10.01	19.26 $\pm$ 5.69	45.21 $\pm$ 12.80
Marlboro	33	0.74 $\pm$ 0.60	0.57 $\pm$ 0.66	5.88 $\pm$ 1.98	44.30 $\pm$ 9.78 <sup>+</sup>	18.81 $\pm$ 5.61	51.65 $\pm$ 11.91 <sup>+</sup>
Boston	32	0.84 $\pm$ 0.60 <sup>+</sup>	0.62 $\pm$ 0.76 <sup>+</sup>	5.98 $\pm$ 1.75	48.33 $\pm$ 11.87 <sup>+</sup>	20.81 $\pm$ 4.96 <sup>+</sup>	55.92 $\pm$ 12.51 <sup>+</sup>
Otros	15	0.96 $\pm$ 0.63 <sup>+</sup>	0.93 $\pm$ 0.86 <sup>+</sup>	5.67 $\pm$ 1.61	43.26 $\pm$ 10.01 <sup>+</sup>	20.73 $\pm$ 4.41 <sup>+</sup>	58.10 $\pm$ 14.35 <sup>+</sup>
Valor <i>P</i> <sup>*</sup>		0.068	0.019	0.153	<0.001	0.007	<0.001

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

<sup>\*</sup>, El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis.

<sup>+</sup>*P* al nivel de 0.05 cuando se compara con la frecuencia promedio del grupo referente, el análisis se realizó mediante la prueba U Mann-Whitney

N= número de sujetos, BE= Células con yemas nucleares, BN= Células Binucleadas, PIC= Células Picnóticas, CC= Células con Cromatina condensada, CR= Células Cariorréticas, CL= Células Cariolíticas.

El efecto que genera el tiempo de consumo de cigarrillos sobre la inducción de anomalías nucleares se presenta en la Tabla 5. Se pudo inferir que el incremento de las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares tuvo una asociación positiva con el tiempo de consumo (Rho Spearman: BN= 0.242, BE= 0.224, CC= 0.278, CL= 0.337, CR= 0.261, PIC=0.193;  $p \leq 0.005$ ). El grupo de individuos fumadores con periodos de consumo menores a 10 años, presentó un incremento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.005$ ) en células con BN, CC, CL y CR, con respecto a las frecuencias observadas en el grupo referente. En el grupo de individuos fumadores con periodos de consumo mayores a 10 años, se observó un incremento estadísticamente significativo en todos los tipos de anomalías nucleares cuando se comparó con el promedio de anomalías reportadas para el grupo referente, además se observó un incremento estadísticamente significativo de células CC y PIC cuando se comparó con los individuos de grupo fumador con periodos de consumo menores a 10 años. La Figura 4 ilustra la asociación positiva entre los biomarcadores estudiados y el tiempo de consumo (en años).

### **9.3. EVALUACIÓN DE LA EDAD SOBRE LA FRECUENCIA DE LAS ANOMALÍAS NUCLEARES.**

El coeficiente de correlación entre la edad de los participantes y las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares, es resumido en la Tabla 6. Los resultados indican que la edad de los participantes (18 a 40 años) no influye significativamente ( $p > 0.05$ ) en la formación de los distintos tipos de anomalías nucleares. La Figura 5, ilustra la asociación lineal entre la edad y las frecuencias de células con diferentes tipos de anomalías nucleares.

**Tabla 5.** Frecuencia de anomalías nucleares en las células epiteliales de la mucosa oral evaluadas con el tiempo de consumo.

Variables	frecuencias de anomalías nucleares Media $\pm$ D.E						
	N	BE	BN	PIC	CC	CR	CL
<b>Hábito de fumar</b>							
no fumador	80	0.59 $\pm$ 0.63	0.38 $\pm$ 0.64	5.18 $\pm$ 2.13	38.01 $\pm$ 10.01	17.26 $\pm$ 5.69	45.21 $\pm$ 12.80
fumador < a 10 años	45	0.80 $\pm$ 0.58	0.53 $\pm$ 0.57	5.50 $\pm$ 1.83	48.13 $\pm$ 10.53*	19.27 $\pm$ 5.23*	55.85 $\pm$ 13.43*
fumador > a 10 años	35	0.85 $\pm$ 0.63*	0.82 $\pm$ 0.89*	6.37 $\pm$ 1.68**	42.61 $\pm$ 10.47**	20.74 $\pm$ 5.08*	52.91 $\pm$ 11.75*
Valor $-P^a$		0.050	0.009	0.017	<0.001	0.005	<0.001

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

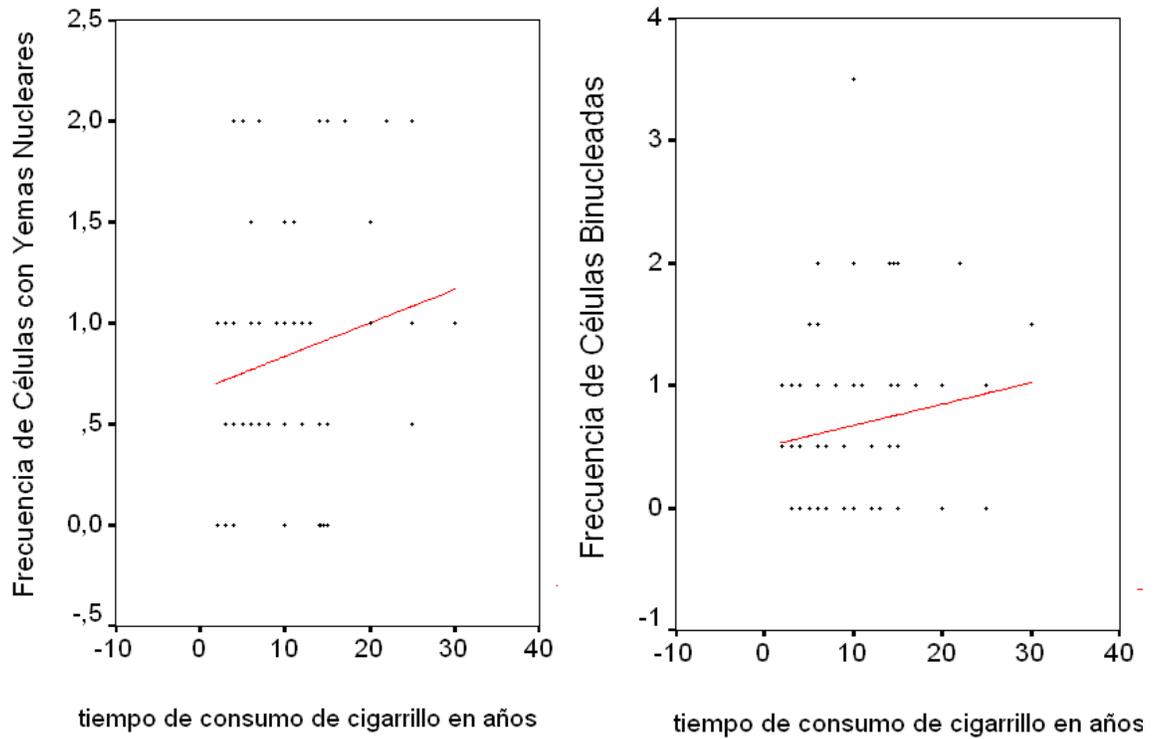
<sup>a</sup>, El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis.

\* $P < 0.05$  cuando se compara con el número promedio de la frecuencia del grupo referente. Análisis realizado mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

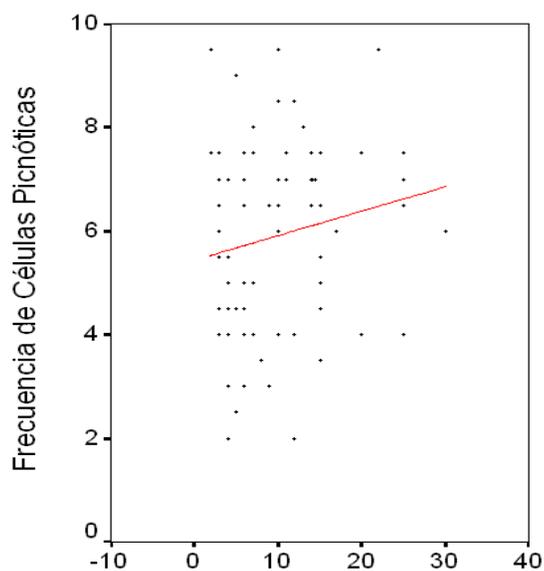
\*\* $P < 0.05$  comparado con no fumador y < 10 años de consumo, mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

N= número de sujetos, BE= Células con yemas nucleares, BN= Células Binucleadas, PIC= Células Picnóticas, CC= Células con Cromatina condensada, CR= Células Cariorréticas, CL= Células Cariolíticas.

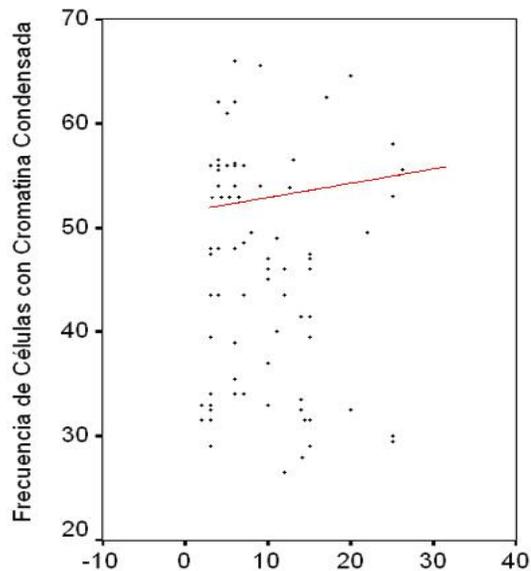
**Figura 4.** Análisis de correlación lineal entre las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares y el tiempo de consumo en años.



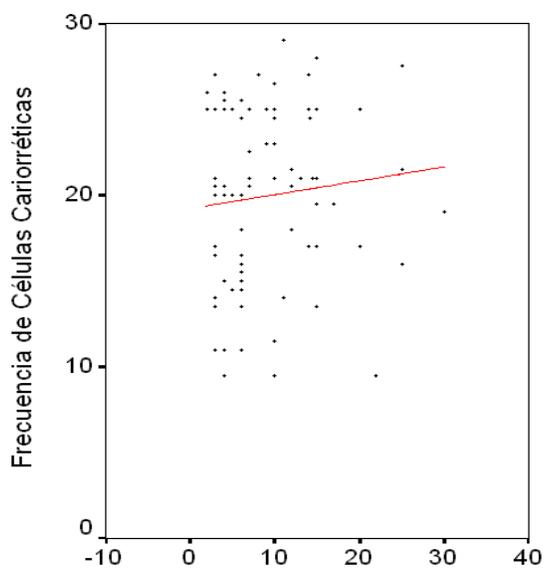
	Yemas nucleares	Binucleadas
ECUACION LINEAL (Y)	$0.612 + 0.020X$	$0.409 + 0.023X$
$R^2$	0.032	0.023
Valor P	0.006	0.005



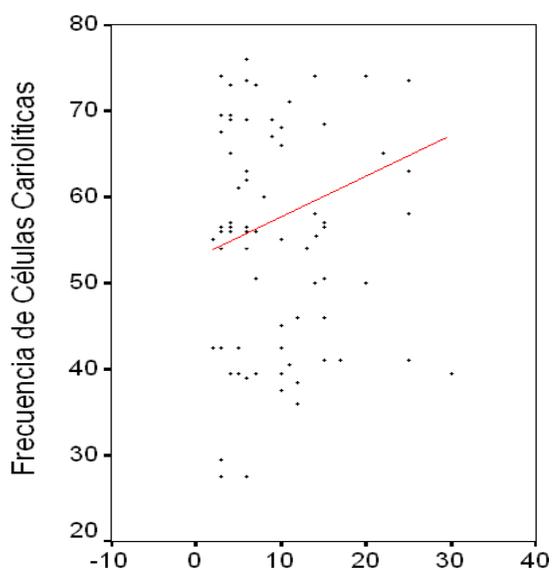
tiempo de consumo de cigarrillo en años



tiempo de consumo de cigarrillo en años



tiempo de consumo de cigarrillo en años



tiempo de consumo de cigarrillo en años

	PIC	CC	CR	CL
ECUACION LINEAL (Y)	$5.24 + 0.06X$	$40.20 + 0.35X$	$17.73 + 0.18X$	$47.48 + 0.51X$
R <sup>2</sup>	0.040	0.044	0.048	0.061
Valor P	0.011	0.008	0.005	0.002

Se presenta la ecuacion lineal para cada caso donde el valor X representa la variable de paquetes-año, el coeficiente de determinacion R<sup>2</sup> y su significancia. **Anomalias nucleares de genotoxicidad:** células binucleadas BN, células con yemas nucleares BE. **Anomalias nucleares de citotoxicidad:** células con Cromatina Condensada CC, células cariolíticas CL, células cariorrecticas CR, células picnóticas PIC. La estimacion curvilínea fue reportada sobre 1000 células para cada caso.

**Tabla 6.** Coeficiente de correlación entre la edad y la frecuencia de ANs en células del epitelio bucal.

Variables	N	BE	BN	PIC	CC	CR	CL
Edad (Años)							
Población	160	-0.053	-0.016	0.001	-0.085	0.011	-0.003
No fumador	80	-0.130	-0.132	-0.115	-0.001	-0.111	0.016
Fumador	80	0.140	0.100	0.124	0.130	0.126	-0.52

Todo el análisis fue realizado en un promedio de 1000 células para cada biomarcador.

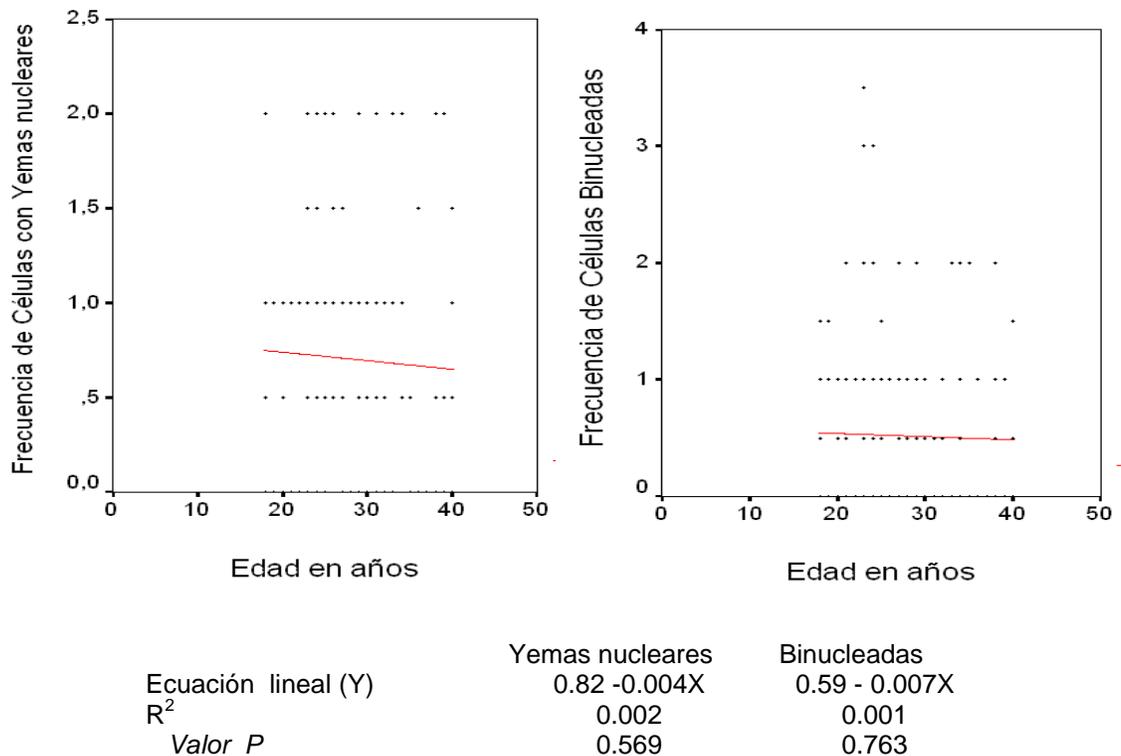
El análisis se realizó con la prueba de Correlación Rho de Spearman

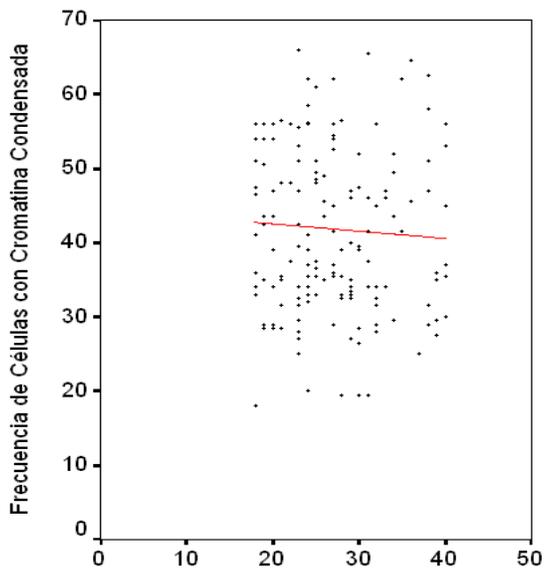
\* La correlación es significativa al nivel 0,05

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01

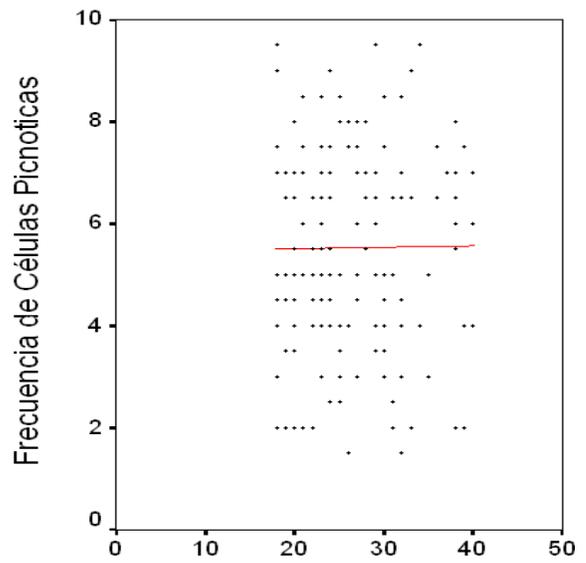
N= Población, BN= Células Binucleadas, BE= Células con yemas nucleares, CC= Células con Cromatina condensada, CL= Células Cariolíticas CR= Células Cariorréticas, PIC= Células Picnóticas.

**Figura 5.** Análisis de correlación lineal entre las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares y la edad.

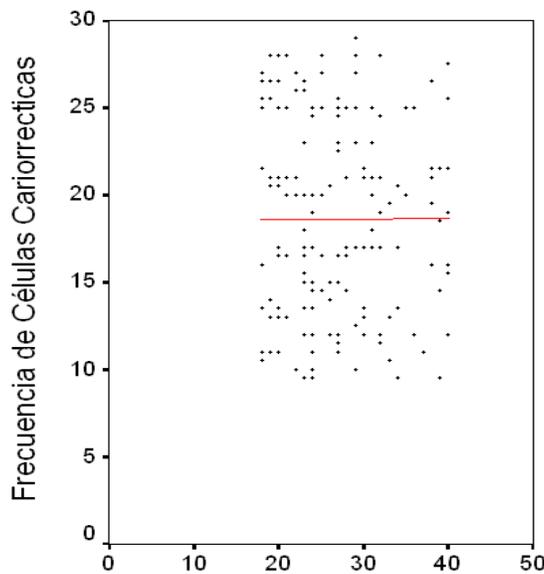




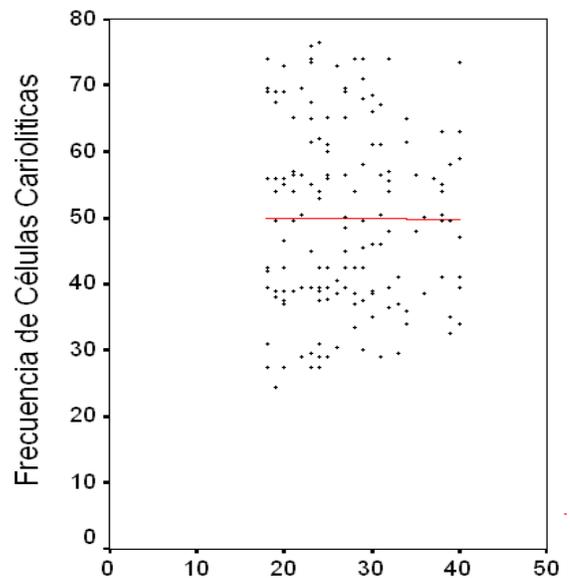
Edad en años



Edad en años



Edad en años



Edad en años

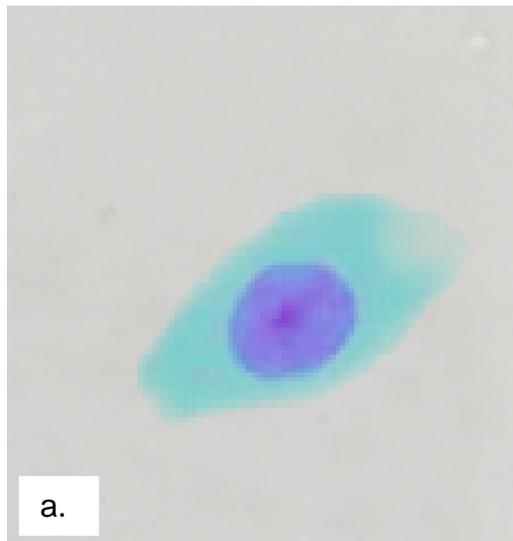
	Picnóticas	Cromatina Condensada	Cariorrécticas	Cariolíticas
ECUACION LINEAL (Y)	$5.45 + 0.00X$	$44.50 - 0.09X$	$18.56 + 0.00X$	$50.13 - 0.009X$
R <sup>2</sup>	0.000	0.003	0.000	0.000
Valor P	<0.001	0.003	<0.001	<0.001

Se presenta la ecuacion lineal para cada caso donde el valor X representa la variable edad en años, el coeficiente de determinacion R<sup>2</sup> y su significancia. **Anomalias nucleares de genotoxicidad:** células con yemas nucleares BE. **Anomalias nucleares de citotoxicidad:** células binucleadas BN, células picnoticas PIC, células con Cromatina Condensada CC, células cariorrécticas CR, células cariolíticas CL. La estimacion curvilínea fue reportada sobre 1000 células para cada caso.

#### 9.4. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL PROLIFERATIVO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL DE LOS PARTICIPANTES.

La evaluación del potencial proliferativo presentada en la Tabla 7, se determinó mediante el análisis comparativo de la frecuencia de células basales de la mucosa bucal del grupo expuesto y el grupo referente (Figura 6). Los resultados indicaron que el consumo de cigarrillo disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) el potencial proliferativo del tejido epitelial. Al analizar el efecto de la intensidad de consumo de cigarrillo sobre el potencial proliferativo, se observó una disminución en la frecuencia de células basales para los 3 rangos de paquetes-años siendo significativo para los rangos con 2-4 y  $> 4$  paquetes-años. El análisis de correlación Rho Spearman indica una asociación inversa ( $p < 0.05$ ) entre los marcadores de proliferación (células basales) y la intensidad de consumo.

**Figura 6.** Fotografía de las células basales del epitelio bucal de los participantes.



a. célula basal o germinativa. La imagen fue tomada a un aumento de 100X.

**Tabla 7.** Impacto del consumo de cigarrillo en el potencial proliferativo del epitelio bucal.

Variable	N	Potencial proliferativo
		Células basales Media $\pm$ D.E
<b>Hábito</b>		
No fumador	80	5.60 $\pm$ 1.76
Fumador	80	4.94 $\pm$ 1.48
<i>P</i> – valor*		0.030
<b>Rango de paquetes-año</b>		
<2	31	5.23 $\pm$ 1.40
2 – 4	21	5.19 $\pm$ 1.47 <sup>+</sup>
> 4	28	4.66 $\pm$ 1.57 <sup>+</sup>
<i>P</i> – valor <sup>a</sup>		0.043
Rho Spearman		-0.194
<i>P</i> – valor <sup>b</sup>		0.014

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

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

<sup>a</sup>El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis.

<sup>b</sup>El análisis se realizó con la prueba de Correlación Rho de Spearman.

<sup>+</sup>*P* al nivel de 0.05 cuando se compara con la frecuencia promedio del grupo referente, el análisis se realizó mediante la prueba U Mann-Whitney

N= número de sujetos.

## 9.5. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.

El índice de reparación (IR) de las células buco-epiteliales de la población objeto de estudio, fue determinado mediante la fórmula IR descrita anteriormente y sus resultados se resumen en la Tabla 8. Para este propósito, se utilizaron los datos de frecuencias de micronúcleos (MN) evaluados en la misma población por Salazar (2014), en el trabajo de grado titulado: "Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa bucal, como un biomarcador de daño genético en una población fumadora del departamento del Cauca" (resultados no publicados)(Salazar, 2014). Los resultados indican que el IR de las células buco-epiteliales del grupo fumador es menor al IR encontrada en el grupo no fumador (IR de fumador 42.24  $\pm$  18.62, IR de no fumador 40.48  $\pm$  20.00). El análisis de asociación entre la intensidad de consumo y el IR ilustrado en la figura 7, mostró un incremento del 18% en el rango bajo de exposición, seguida de una disminución estadísticamente significativa del 26% del IR, en el rango alto de exposición >4 paquetes-año, cuando se comparó con el promedio del grupo referente (Correlación Rho de Spearman (-0,160) ( $p=0,04$ ) coeficiente de determinación  $R^2= 5.5\%$ ).

**Tabla 8.** Efecto del consumo de cigarrillo sobre el índice de reparación de las células buco-epiteliales de los participantes.

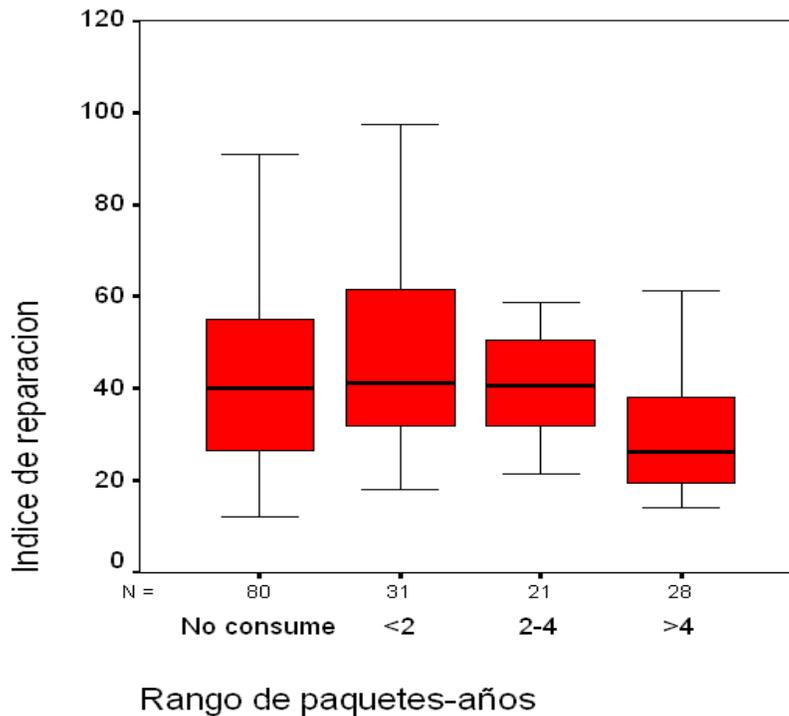
Variable	N	Índice de reparación Media $\pm$ DS.
No fumador	80	42.24 $\pm$ 18.62
Fumador	80	40.48 $\pm$ 20.00
Rango de paquetes-año		
< 2	31	48.03 $\pm$ 23.92
2 – 4	21	41.91 $\pm$ 13.85
> 4	28	31.04 $\pm$ 19.28 <sup>+</sup>

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

\*El análisis se realizó con la prueba de Correlación Rho de Spearman

<sup>+</sup>P al nivel de 0.05 cuando se compara con la frecuencia promedio del grupo referente, el análisis se realizó mediante la prueba U Mann-Whitney

**Figura 7.** Gráfico del impacto de fumar cigarrillos sobre el índice de reparación en las células exfoliadas de los de los participantes.



Las cajas representan el promedio del IR para cada rango del índice de paquetes-año

## 9.6. DETERMINACIÓN DE LAS CORRELACIONES ENTRE LOS BIOMARCADORES USADOS EN EL ENSAYO.

Los parámetros de genotoxicidad BE y BN, y los parámetros de citotoxicidad PIC, CC, CR y CL son dependientes. En la Tabla 9, los resultados de las correlaciones indicaron que existe una fuerte asociación positiva entre los biomarcadores de genotoxicidad BN Y BE y una asociación positiva entre los biomarcadores de citotoxicidad. En cuanto a las correlaciones entre el índice de reparación y las diferentes anomalías nucleares, se observó asociaciones inversas ( $p < 0.05$ ) para los biomarcadores de genotoxicidad y asociaciones positivas ( $p < 0.05$ ) para los biomarcadores de citotoxicidad (excepto PIC). Las células picnóticas mostraron gran asociación del comportamiento de los biomarcadores de genotoxicidad. El potencial proliferativo se asoció negativamente con los diferentes tipos de anomalías nucleares.

**Tabla 9.** Coeficiente de correlación entre los biomarcadores de genotoxicidad, citotoxicidad, índice de reparación y potencial proliferativo.

Variable	BE	BN	PIC	CC	CR	CL	IR	PP
BE		<b>0.269**</b>	0.121	0.090	-0.071	-0.079	<b>-0.828**</b>	-0.015
BN			0.169	0.095	0.021	-0.030	<b>-0.219**</b>	0.011
PIC				0.016	0.070	0.086	-0.059	-0.059
CC					0.030	<b>0.181*</b>	0.040	-0.115
CR						<b>0.239**</b>	<b>0.175*</b>	<b>-0.176*</b>
CL							<b>0.237*</b>	<b>-0.200*</b>
IR								0.075
PP								

Todo el análisis fue realizado en un promedio de 1000 células para cada biomarcador.

El análisis se realizó con la prueba de Correlación Rho de Spearman

\* La correlación es significativa al nivel 0,05

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01

BN= Células Binucleadas, BE= Células con yemas nucleares, CC= Células con Cromatina condensada, CL= Células Cariolíticas CR= Células Cariorréticas, PIC= Células Picnóticas, IR índice de reparación, PP potencial proliferativo.

### **9.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONSUMO DE ALCOHOL, Y LA DIETA, SOBRE LA MODULACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LAS ANOMALÍAS NUCLEARES.**

La evaluación del efecto del consumo de alcohol se resume en la Tabla 10. Los resultados indican que el consumo de alcohol genera un efecto aditivo al daño producido por el consumo de cigarrillo. El análisis de asociación entre el consumo de cigarrillo y el consumo de alcohol no se observó incremento estadístico de ANs entre el grupo de individuos que consumen bebidas alcohólicas respecto al grupo de individuos que no consumen cigarrillo ni alcohol, sin embargo se indicó que el consumo combinado de éstos incrementa la frecuencia promedio de CC, ( $p < 0.05$ ) siendo este más alto al promedio observado del grupo de individuos que solo consumen cigarrillo. En cuanto a los parámetros genotóxicos no se observaron diferencias estadísticamente significativas producidas por el consumo combinado de alcohol y cigarrillo.

El análisis de frecuencias de ANs y la ingesta de frutas y verduras presentadas en las Tablas 11 y 12, no evidenciaron efectos moduladores significativos involucrados en la disminución o el incremento de la frecuencia de las AN al comparar el grupo expuesto con el referente. Sin embargo se observó una disminución no significativa de células cariorréticas, cariolíticas y células con cromatina condensada en el grupo de individuos fumadores cuando incrementa la ingesta de verduras. Para las demás variables como el índice de masa corporal, la actividad física, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual indica estas variables no influyen significativamente sobre las frecuencias de los parámetros citotóxicos y genotóxicos en la población estudiada.

**Tabla 10.** Efecto del consumo de alcohol y cigarrillo en la frecuencia de anomalías nucleares.

Variables	frecuencias de anomalías nucleares Media $\pm$ D.E						
	N	BE	BN	PIC	CC	CR	CL
Cigarrillo (-) / Alcohol (-)	22	0.77 $\pm$ 0.64	0.56 $\pm$ 0.96	5.81 $\pm$ 2.44	40.31 $\pm$ 10.72	16.50 $\pm$ 6.33	45.57 $\pm$ 13.01
Cigarrillo (+) / Alcohol (-)	5	1.20 $\pm$ 0.57	0.90 $\pm$ 0.74	6.00 $\pm$ 1.54	43.90 $\pm$ 11.23*	23.50 $\pm$ 4.76*	52.30 $\pm$ 11.15*
Cigarrillo (-) / Alcohol (+)	58	0.52 $\pm$ 0.61	0.31 $\pm$ 0.46	4.94 $\pm$ 1.97	37.14 $\pm$ 9.69	17.55 $\pm$ 5.45	45.07 $\pm$ 12.83
Cigarrillo (+) / Alcohol (+)	75	0.80 $\pm$ 0.60	0.64 $\pm$ 0.74	5.87 $\pm$ 1.83	46.04 $\pm$ 10.77**	23.74 $\pm$ 5.15*	54.72 $\pm$ 12.88*
Valor $-P^a$		0.013	0.023	0.058	<0.001	0.006	<0.001

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

+ consume, - No consume

<sup>a</sup>, El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis.

\* $P < 0.05$  cuando se compara con el número promedio de la frecuencia del grupo referente. Análisis realizado mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

+  $P < 0.05$  cuando se compara con el número promedio de la frecuencia del grupo fumador (+). Análisis realizado mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

N= número de sujetos, BE= Células con yemas nucleares, BN= Células Binucleadas, PIC= Células Picnóticas, CC= Células con Cromatina condensada, CR= Células Cariorréticas, CL= Células Cariolíticas.

**Tabla 11.** Evaluación del efecto modulador de la dieta sobre la frecuencia de anomalías nucleares BE y BN.

Variables	Grupo no fumadores <sup>a</sup>			Grupo fumadores <sup>a</sup>		
	N	BE <sup>b</sup> Media ± D.E	BN <sup>b</sup> Media ± D.E	N	BE <sup>b</sup> Media ± D.E	BN <sup>b</sup> Media ± D.E
<b>Consumo de frutas (porción semanal)</b>						
No consume	3	0.66 ± 0.57	0.33 ± 0.57	11	0.59 ± 0.66	0.54 ± 0.65
Bajo (<6)	40	0.63 ± 0.66	0.31 ± 0.58	36	0.84 ± 0.64	0.75 ± 0.61
Alto (≥6)	37	0.54 ± 0.61	0.45 ± 0.72	33	0.60 ± 0.89	0.60 ± 0.89
<b>Consumo de verduras (porción semanal)</b>						
No consume	2	0.50 ± 0.70	0.75 ± 0.35	9	0.77 ± 0.44	0.88 ± 1.08
Bajo (1-6)	26	0.65 ± 0.62	0.19 ± 0.37	28	0.76 ± 0.65	0.71 ± 0.67
Alto (≥14)	52	0.56 ± 0.64	0.46 ± 0.73	48	0.74 ± 0.60	0.58 ± 0.71
<b>Consumo de frutas + verduras (porción semanal)</b>						
No consume	0	0	0	3	0.50 ± 0.50	0.50 ± 0.50
Bajo	50	0.66 ± 0.66	0.30 ± 0.55	57	0.80 ± 0.61	0.67 ± 0.72
Alto	30	0.48 ± 0.56	0.51 ± 0.77	20	0.92 ± 0.59	0.65 ± 0.85

En todos los casos se muestra el promedio + DS = desviación estándar.

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

El análisis se realizó mediante la prueba estadística de U-Mann Whitney

<sup>a</sup>El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis (inter-grupos)

<sup>b</sup>El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis (entre fumadores y no fumadores)

BE= Células con yemas nucleares, BN= Células binucleadas.

**Tabla 12.** Evaluación del efecto modulador de la dieta sobre la frecuencia de anomalías nucleares PIC, CC, CR y CL.

Variables	Grupo no fumadores <sup>A</sup>				Grupo fumadores <sup>A</sup>					
	N	PIC <sup>B</sup> Media ± D.E	CC <sup>B</sup> Media ± D.E	CR <sup>B</sup> Media ± D.E	CL <sup>B</sup> Media ± D.E	N	PIC <sup>B</sup> Media ± D.E	CC <sup>B</sup> Media ± D.E	CR <sup>B</sup> Media ± D.E	CL <sup>B</sup> Media ± D.E
Consumo de frutas (semanal)										
No consume	3	7.50 ± 1.80	31.16 ± 5.20	13.50 ± 1,50	45.33 ± 17.06	11	6.04 ± 1.69	41.31 ± 14.05	21.45 ± 5.42	52.40 ± 12.40
Bajo (1-6)	40	5.28 ± 2.25	39.41 ± 9.12	17.31 ± 5,83	44.06 ± 11.45	36	5.87 ± 1.94	42.92 ± 10.40	19.70 ± 4.95	53.63 ± 11.95
Alto (≥14)	37	4.87 ± 1.94	37.06 ± 11.02	17.51 ± 5,73	46.44 ± 14.08	33	5.83 ± 1.74	45.87 ± 9.97	19.77 ± 5.42	56.60 ± 13.72
Consumo de verduras (semanal)										
No consume	2	4.50 ± 0.70	24.25 ± 6.01	11.50 ± 2.12	34.00 ± 7.07	9	6.27 ± 2.01	46.16 ± 9.72	24.33 ± 5.64	57.11 ± 10.62
Bajo (1-6)	26	4.86 ± 2.27	39.67 ± 8,79	18.15 ± 6.72	43.54 ± 13.55	28	5.41 ± 1.62	45.44 ± 10.13	18.58 ± 4.51	56.05 ± 11.61
Alto (≥14)	52	5.36 ± 2.10	37.72 ± 10.38	17.03 ± 5.11	46.47 ± 12.44	48	6.10 ± 1.86	45.03 ± 11.54	17.96 ± 5.10	53.07 ± 13.84
Consumo de frutas + verduras (semanal)										
No consume	0	0	0	0	0	3	6.00 ± 1.32	39.33 ± 14.57	21.33 ± 9.07	51.03 ± 8.09
Bajo	50	5.24 ± 2.29	38.84 ± 9,21	17,16 ± 6,07	44,14 ± 12,46	57	5.77 ± 1.86	45.38 ± 10.74	20.29 ± 4.94	54.16 ± 12.49
Alto	30	5.08 ± 1.86	36.65 ± 11,26	17,43 ± 5,08	46,99 ± 13,36	20	6.17 ± 1.76	47.65 ± 10.55	18.85 ± 5.38	56.12 ± 14.24

En todos los casos se muestra el promedio + DS = desviación estándar.

Todos los promedios son reportados sobre 1000 células.

El análisis se realizó mediante la prueba estadística de U-Mann Whitney

<sup>a</sup>El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis (inter-grupos)

<sup>b</sup>El análisis se realizó con la prueba de Kruskal Wallis (entre no fumadores y fumadores)

\*,  $P < 0.05$

PIC= Células picnóticas, CC= Células con cromatina condensada, CR= Células cariorrécticas, CL= Células cariolíticas.

## 10. DISCUSIÓN

El consumo de cigarrillo se constituye como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial; debido a que este contiene una variedad de sustancias mutagénicas y carcinogénicas que están directamente relacionadas con la aparición de 29 enfermedades, de las cuales 10 son diferentes tipos de cáncer (Eriksen et al., 2012; IARC, 2013; WHO, 2012). A pesar de este conocimiento, el número de muertes asociadas a este hábito no ha disminuido, debido en gran parte a la falta de implementación de estrategias clínicas que permitan identificar fumadores con alto riesgo de desarrollar enfermedades o de detectarlas en sus etapas tempranas. Por lo tanto, es importante continuar con la búsqueda de métodos novedosos, que permitan identificar eventos tempranos de enfermedad asociado a su efecto carcinogénico.

El ensayo citómico en células epiteliales es una prueba que incluye biomarcadores de eventos genotóxicos (MN y BE) y citotóxicos (BN, CC, PIC, CR y CL). Este biomonitoreo permite determinar el nivel de daño citotóxico y genotóxico por exposición a agentes ambientales que podrían conducir el desarrollo de cáncer como es el caso del humo de cigarrillo, haciendo posible detectar poblaciones con mayor riesgo para la salud (Bonassi et al., 2011; Holland et al., 2008). Sin embargo, la gran mayoría de estudios reportados, solo han evaluado el efecto genotóxico mediante el biomarcador de micronúcleos, haciéndose necesario evaluar los efectos citotóxicos originados por exposición al humo de cigarrillo (Bolognesi et al., 2013; Bonassi et al., 2011; Ceppi et al., 2010; Nersesyan et al., 2011). En este estudio se determinó la frecuencia de células con brotes nucleares, binucleadas, cromatina condensada, picnóticas, cariorréticas y cariolíticas bajo condiciones demográficas y de exposición de un grupo de fumadores del departamento del Cauca.

El epitelio, es uno de tejidos que se encuentra en mayor contacto con agentes potencialmente peligrosos (cancerígenos), y al estar en constante división es más vulnerable a lesiones producidas en el ADN, de hecho, se ha establecido que más del 90% de las neoplasias malignas son de origen epitelial (Holland et al., 2008). En el presente estudio, el uso del epitelio de la cavidad bucal como tejido blanco, ofrece una aproximación ideal y sensible que facilita la detección de los eventos citotóxicos y genotóxicos tempranos, debido a que en la boca se observan cambios celulares indicativos de enfermedad producidos por xenobióticos que ingresan por vía de inhalación y/o absorción (Ceppi et al., 2010; Holland et al., 2008; Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013). La recolección de células epiteliales se realiza de forma sencilla, rápida y económica (Tolbert *et al.*, 1992). Por lo tanto, dicho tejido se establece como zona apropiada para la evaluación de daño en el material genético, la inestabilidad cromosómica y la muerte celular provocado por el consumo de cigarrillo.

La exposición crónica de sustancias tóxicas como las presentes en el humo de cigarrillo sobre el epitelio bucal, conduce a un aumento de la queratinización celular con la síntesis de cuerpos de queratohialina (Casartelli et al., 1997; Nersesyan et al., 2006; Orellana-Bustos et al., 2004). Estos cuerpos citoplasmáticos redondos no contienen ADN, y pueden ser clasificados erróneamente como cuerpos extra-nucleares cuando no se usan tinciones ADN específicas (Nersesyan, Kundi et al. 2006). Por este motivo, la tinción específica para ADN Feulgen Fast Green fue usada en el presente estudio, debido a que su aplicación ha demostrado ser el método más confiable para determinar el registro de células indicadoras de citotoxicidad y genotoxicidad (Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009).

Otra ventaja del presente estudio es el empleo de una población de 160 individuos de los cuales 80 son fumadores de cigarrillo y 80 son no fumadores. Este número poblacional excede el número de individuos recomendados por Ceppi de 130 para el uso del ensayo citómico (Ceppi, 2010). Esta investigación presenta un tamaño de muestra superior al utilizado por otros estudios que han evaluado al humo de cigarrillo con biomarcadores del ensayo de anomalías nucleares como el de Tolbert (1991) con 53 individuos, Nersesyan (2006) con 30 individuos, Nersesyan (2011) con 103 y Nefić (2013) con 83. Luego los datos obtenidos en este estudio presentan mayor poder estadístico y proporcionan mayor confiabilidad.

La edad promedio calculada en la presente investigación fue 26.34 años, la cual es inferior a la edad promedio de estudios reportados por Nersesyan 2006 con 57 años, Nersesyan 2011 con 36 años, Naderi 2012 con 37 años y el de Bohrer (2011) con 43, en la evaluación de los efectos cito-genéticos del consumo de cigarrillo en células exfoliadas del epitelio bucal. La estimación de los efectos citotóxicos y genotóxicos en poblaciones jóvenes, permite tener un conocimiento temprano del riesgo que representa esta exposición para el futuro (Nefić et al., 2013) De hecho, en Colombia el consumo de cigarrillo en jóvenes es un fenómeno cada vez más común y en consecuencia, se espera en los próximos años un incremento en la incidencia de enfermedades asociadas a edades más tempranas (Eriksen et al., 2012; Mackay et al., 2006; MPS and DNE, 2008; WHO, 2012). Por esta razón el presente estudio podría aportar información relevante del perfil de riesgo a enfermedades que tienen los fumadores jóvenes por consumo de cigarrillo, además podría ser interesante a la hora de diseñar políticas estratégicas de educación y prevención para disminuir la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas observadas en poblaciones adultas.

La población objeto de estudio tuvo un promedio de consumo de 8 cigarrillos/día con una intensidad de 4.14 paquetes-años, el cual es bajo en comparación a otros estudios reportados que han evaluado los eventos citotóxicos y genotóxicos originados por consumo de cigarrillo en células exfoliadas del epitelio bucal (Bonassi et al., 2003; D'Agostini et al., 2012; Gabriel et al., 2006; Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2006; Nersesyan et al., 2011; Tolbert et al., 1991; Tomiyama et

al., 2010), luego, los resultados aquí obtenidos aportan conocimiento de efectos nocivos a bajas dosis en tejidos blanco que hasta el momento no han sido evaluadas.

En el presente estudio se determinó las frecuencias de los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad de los individuos del grupo referente, las cuales son frecuencias basales de daño en la célula y en el ADN. La frecuencia basal de células con yemas nucleares (BE) y células binucleadas (BN) registradas en este estudio fue de 0.59 y 0.38, los cuales son menores a los rangos presentados por Bonassi en un meta-análisis del proyecto HUMNxl, que reporta valores basales de 1,36 para células con BE y 3,04 para células BN en 1000 células (Bonassi et al., 2011). Estas diferencias radican principalmente a que: todas las frecuencias obtenidas en este meta-análisis son de diferentes laboratorios alrededor del mundo y por lo tanto los estudios varían en metodologías de recolección de la muestra, procesado, tinción, número poblacional y etnia, los cuales pueden influenciar en el registro de las frecuencias de los distintos tipos de anomalías nucleares. Estudios en los que se ha evaluado el ensayo de anomalías nucleares con tinciones ADN específicas, se observó una frecuencia basal de células con BE que va desde 0 hasta 2.17 y 0 hasta 2.12 para BN, las cuales coinciden con las frecuencias obtenidas en el presente estudio (Celik et al., 2010; Ceppi et al., 2010; Diler y Ergene, 2010; Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2011; Rafiq Khan y Sudha, 2012) En cuanto a los parámetros indicadores de muerte celular, la frecuencia basal obtenida en esta investigación fue de 38.01 para cromatina condensada (CC), 5.18 para picnóticas (PIC), 17.26 para cariorrécticas (CR) y 45.21 para cariolíticas (CL), los cuales se acercan a las frecuencias basales establecidas por Nersesyan (2006), Nersesyan (2011), Tolbert (1992), Celik (2010) y Ceppi (2010) con valores que van desde 17 hasta 39 para CC, de 0 hasta 8 para PIC, de 10 hasta 20 para CR y de 10 hasta 47 para CL, lo cual indica que la población referente no presentó efectos significativos por exposición a agentes tóxicos que puedan alterar la frecuencia de los biomarcadores.

Los resultados obtenidos, demuestran que las frecuencias de células con yemas nucleares (BE), binucleadas (BN), picnóticas (PIC), cromatina condensada (CC), cariorrécticas (CR) y cariolíticas (CL), fueron significativamente más altas en las células epiteliales del grupo fumador con respecto a las observadas en el grupo no fumador ( $p \geq 0.05$ ). El incremento de las ANs se atribuye principalmente a efectos aneugénicos y/o clastogénicos generados por los compuestos mutágenos y carcinógenos presentes en el humo de cigarrillo (Du et al., 2012; Fenech et al., 2011; IARC, 2013; Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2011; Tolbert et al., 1991). Estos compuestos, interactúan de manera directa con las células basales germinativas del epitelio oral (Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009), o son llevadas al tracto respiratorio por inhalación del material particulado, de ahí absorbidas y transportadas por medio del torrente sanguíneo hasta el tejido conectivo adyacente a la capa basal del epitelio oral, donde pueden producir alteraciones en su material genético (Ceppi et al., 2010). La biotransformación del

benzo [a] pireno (BaP), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), N'-nitrosornicotina (NNN) 4-aminobifenilo 1,3-butadieno y el benceno entre otros compuestos tóxicos, por las enzimas citocromo P-450 (Ding y Kaminsky, 2003; Hecht, 1998, 1999), forman metabolitos activos que al ser oxidados, generan especies reactivas de oxígeno EROs altamente genotóxicas (Hecht, 1999; Hecht, 2003). Las EROs por su característica electrofílica se unen covalentemente al ADN (Guengerich, 2001; Jalas et al., 2005) ocasionando lesiones primarias como rupturas de cadena doble y/o sencilla (Hecht, 1998) que al no ser reparadas o ser mal reparadas, producen pérdida de información genética, siendo esto precisamente uno de los factores que favorece la inestabilidad genómica, y conduce al aumento de la frecuencia de anomalías nucleares como las observadas en el ensayo citómico (Domínguez Odio et al., 2006; Tolbert et al., 1991).

La frecuencia promedio de células con BE en fumadores fue 1.3 veces mayor a la observada en el grupo no fumador. Incluso, esta frecuencia aumentó hasta 2 veces en el grupo de fumadores con rango de exposición > 4 paquetes-años. El aumento en el número de células con yemas nucleares (BE) es indicador de daño genético, eliminación de complejos de reparación del ADN y amplificación genómica (Dutra et al., 2010; Thomas et al., 2009). Por otro lado, se observó que el grupo fumador presentó un aumento en la frecuencia de células BN 2 veces mayor a la frecuencia promedio observada del grupo no fumador. Además, se observa que esta frecuencia aumenta hasta 3 veces en el grupo de fumadores con el rango de exposición > 4 paquetes - años. Las células binucleadas (BN) marcadores de citotoxicidad, son indicadores de fallas en la citocinesis celular, así como la causa de una frecuencia elevada de aneuploidías como consecuencia del desequilibrio y la mala segregación de los cromosomas durante la división celular (Shi and King, 2005; Thomas et al., 2008; Thomas et al., 2009).

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los reportados por otros estudios, quienes encontraron incrementos estadísticamente significativos de BE y BN en el grupo fumador con respecto al grupo no fumador (Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2006; Nersesyan et al., 2011; Tolbert et al., 1991). Como se mencionó anteriormente, los estudios reportados que evaluaron la inestabilidad genómica asociada al consumo de cigarrillo en células bucoepiteliales, generalmente han sido realizados mediante el análisis de micronúcleos (Thomas et al., 2009), y han producido resultados inconsistentes (Nersesyan et al., 2006). No obstante, un número significativo de estudios han indicado que los compuestos presentes en el humo de cigarrillo incrementan la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal (Bonassi et al., 2011; Çelik et al., 2003; Konopacka, 2003; Salazar, 2014; Sarto et al., 1987; Sudha et al., 2011; Wu et al., 2004). En una reciente investigación con la misma población objeto de estudio, se observó en el grupo fumador con exposición > 4 paquetes-año, un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la frecuencia de micronúcleos (MN) 3 veces mayor a la frecuencia observada en grupo no fumador (Salazar, 2014). Este es un resultado que indica

que BE y BN son criterios de valoración igual de sensibles a las células con MN al momento de reflejar la inestabilidad genómica de células expuestas al humo de cigarrillo (8 cigarrillos/día). Este es el primer estudio en el que se estudia el efecto del humo de cigarrillo en células del epitelio bucal de jóvenes expuestos a bajas dosis de cigarrillo con ANs, por lo tanto sería interesante conducir más estudios en los que se evalúe el efecto citotóxico y genotóxico del consumo de cigarrillo en individuos jóvenes, con el fin de corroborar los resultados aquí obtenidos, ya que hasta el momento solo se ha observado resultados significativos en individuos con exposiciones altas mayores a 40 cigarrillos/día (Fenech et al., 2011; Nersesyan et al., 2011; Thomas et al., 2011).

Al comparar las frecuencias de células indicadoras de muerte celular en el grupo expuesto y en el grupo referente, se observó que las frecuencias más altas de CC, PIC, CR y CL, se encontraron en la población expuesta a humo de cigarrillo, además se observó que estas frecuencias aumentan con el incremento de la intensidad de exposición (Tabla 3). Las células lesionadas por el ataque de los diferentes compuestos tóxicos, genotóxicos y algunos radicales libres (EROs) derivados del metabolismo de compuestos presentes en el humo de cigarrillo por las enzimas citocromo P450, conllevan a daños citogenéticos que generalmente finalizan en procesos apoptóticos (Huang et al., 2009; Kamboj y Mahajan, 2007; Thomas y Fenech, 2009). Se especula que los incrementos en las frecuencias de CC, CL, CR y P se deben posiblemente a profundas perturbaciones del ambiente celular, específicamente relacionadas a la integridad y estabilidad del genoma. De hecho se ha observado que metales presentes del humo de cigarrillo (plomo, cadmio, hierro, zinc y cromo) consiguen imitar metales esenciales y de esta manera podrían acceder a macromoléculas blanco, modulando procesos celulares debido a la elevada capacidad que poseen estos compuestos iónicos para inactivar proteínas involucradas en la replicación, transcripción y reparación del ADN, y así producir respuestas apoptóticas (Alexandrov et al., 2005; Fojtová and Kovařík, 2000; Garnier et al., 2006). El cadmio (Cd), un metal presente en 5 µg en el plasma sanguíneo de un fumador promedio (IARC, 2012), es captado por el hígado donde forma complejos con pequeños péptidos como el glutatión (GSH) (Cd-GSH) o con proteínas de bajo peso molecular como la metalotioneína (MT) (Cd-MT) y es secretado en la bilis y/o es liberado en la circulación de forma activa, de esta manera consigue entrar a las células y por su alta toxicidad activa vías apoptóticas por medio de cascadas de proteasas denominadas caspasas involucradas en la degradación del ADN en fragmentos nucleosomales imposibles de reparar. El cadmio también podría actuar inhibiendo la producción glutatiónes (GSH) por su similitud al radio iónico del potasio. La baja producción de estos antioxidantes resulta en estrés oxidativo, causando modificaciones oxidativas en lípidos, proteínas y el ADN que se ve reflejado en el aumento de las respuestas apoptóticas (Dominguez Odio et al., 2006; Martínez Flores et al., 2013; Pryor y Stone, 1993).

Por otra parte, se ha observado que el modo y el resultado de la señalización de la muerte celular inducida por la exposición al humo de cigarrillo son altamente dependientes de la intensidad de la exposición a compuestos presentes en el humo del cigarrillo. Las bajas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos y benceno inducen la activación de las caspasas apoptóticas, mientras que la exposiciones más altas generalmente encontrados en fumadores pesados interrumpe la señalización de genes supresores de tumores asociados a la apoptosis (Messner et al., 2012), lo que resulta en la transformación neoplásica de células epiteliales humanas especialmente en el tracto aero-digestivo (Du et al., 2012; Imirzalioglu et al., 2005).

El patrón de aumento de CC, CR y CL proporciona una fuerte evidencia de las propiedades apoptóticas inducidas por los compuestos presentes en el humo de cigarrillo (Tabla 3). Analizando los marcadores de muerte celular inducidos por la intensidad de exposición, se observó que en los fumadores con exposición < 2 paquetes-años y 2-4 paquetes-años presentaron incrementos significativos de células con CC, CR y CL del 20%, 11%, 21% y 20%, 17%, 22%, mientras que el grupo de fumadores con >4 paquetes-años presentaron incrementos significativos de células con PIC, CC, CR y CL del 6%, 21%, 23% y 23% cuando se comparó con el promedio observado en el grupo referente. El incremento semejante de los biomarcadores de muerte celular, puede ser explicado considerando que las células CC son una etapa apoptótica temprana y pre-formadora de eventos de apoptosis tardíos como CR y CL (Bolognesi et al., 2013). Aunque las ANs indicadoras de toxicidad tienen un mecanismo de formación aún desconocido, es bien sabido que los procesos de inducción están relacionados con la necrosis y la apoptosis. (Bolognesi et al., 2013; Bonassi et al., 2011; Tolbert et al., 1991). Estos hallazgos concuerdan con los resultados reportados en otros estudios, que muestran que las frecuencias de células indicadoras de muerte celular CC, CL, CR y P se incrementan por la exposición al humo de cigarrillo (Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2011; Tolbert et al., 1991).

Los incrementos en las frecuencias de las diferentes ANs registradas en la presente investigación, indica que los efectos tóxicos y la muerte celular inducida por la exposición al humo de cigarrillo se ejercen desde los niveles bajos e incrementan significativamente con el aumento de la intensidad de la exposición. En cuanto a la reducida frecuencia de células indicadoras de genotoxicidad en los niveles bajos de exposición observados en el presente estudio (< 2 paquetes-años y 2-4 paquetes-años), una posible explicación puede ser la eliminación adaptativa de células con daño en el ADN por la activación de procesos apoptóticos. La anterior comparación resalta la importancia de identificar todo el espectro de anomalías citológicas y nucleares empleadas en el ensayo citómico, aunque laborioso, permite asociar la exposición con los mecanismos de citotoxicidad y genotoxicidad.

Hasta el momento, solo 4 estudios han reportado el efecto citotóxico y genotóxico del consumo de cigarrillo usando el espectro completo de ANs en células bucoepiteliales de individuos consumidores de cigarrillo, y sus resultados coinciden con el resultados observados en el presente estudio (Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2006; Nersesyan et al., 2011; Tolbert et al., 1991). De esta manera se confirma la asociación entre el consumo de cigarrillo y el incremento en la frecuencia de ANs, y se demuestra además que el consumo "leve" de cigarrillos también puede producir daño citogenético y pone de manifiesto el riesgo que representa el tabaquismo como factor etiológico para la salud de la población, en particular para los jóvenes.

Así mismo estos resultados coinciden con estudios reportados que incluyen al hábito de fumar como covariable de exposición y muestran el efecto sinérgico con otros tóxicos ocupacionales. Diler (2010) en una investigación con trabajadores de una fábrica de calcita, observó que había diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las frecuencias de MN y ANs entre fumadores y no fumadores. De la misma forma, Celik (2003), Khan (2012), Celik (2010), Diler and Ergene (2010), Sellappa (2010) y Celik (2007) observaron en estudios de biomonitorio citogenético, con asistentes de la estación de gasolina, mecánicos de automóviles y en individuos fumadores expuestos a plaguicidas respectivamente, que el hábito de fumar cigarrillos es uno de los factores que influyen en el aumento de la tasa de MN y ANs. Contrario a los anteriores estudios mencionados, Çelik (2013) no observó efectos aditivos del consumo de cigarrillos en una población constructora de vías (Çelik et al., 2013), cabe resaltar, que este estudio reporta que el consumo de cigarrillo fue esporádico, la cual podría estar involucrada en la baja asociación con los efectos citogenéticos reportados.

En este estudio se determinó la asociación entre el número de ANs presentes en las células del epitelio bucal y el tiempo de consumo de cigarrillo. El incremento significativo de células con BE y BN solo fue presente en el grupo individuos con periodos de consumo mayor a 10 años, mientras que los incrementos de las células apoptóticas CC, CR y CL se observó en los grupos de individuos con tiempos consumo menor y mayores a 10 años cuando se comparó con el promedio de ANs del grupo control. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indica que los años de consumo explican en un 3% y 2 % la variabilidad en el número promedio de células con BE y BN, la cual es baja y explicaría que los efectos clastogénicos no son acumulativos debido a la dinámica de recambio característico de las células epiteliales, por tanto son aplacados por el incremento de eventos apoptóticos. Existe evidencia de que muchos de los elementos presentes en el humo de cigarrillo como los metales pesados cobre, cadmio arsénico plomo y algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos como las NNK y las NKK específicas del tabaco son bioacumulados en tejidos adiposos a través de los años (IARC, 2004). Sugerimos que además del daño producido por los compuestos carcinogénicos en su momento, la liberación de estos tóxicos bioacumulados podrían contribuir a los procesos degenerativos de las células

básales y como tal del tejido epitelial. Estos resultados son coherentes a los resultados reportados por Naderi et al., 2012 y Zamani et al., 2011 quienes encontraron incrementos en células indicadoras de genotoxicidad en individuos con más de 10 años de consumo.

Adicionalmente los resultados de este estudio, muestran un efecto citotóxico del cigarrillo dependiente de la marca consumida. En una reciente investigación se observó que el consumo de cigarrillo induce MN y otras anomalías nucleares (BN, BE, CC, PIC, CR y CL), y que estos efectos dependerían de los tipos de cigarrillos consumidos, sus contenidos de alquitrán y nicotina (Nersesyan et al., 2011). Por lo tanto, sería interesante determinar en próximos estudios las concentraciones de los carcinógenos presentes en los diferentes tipos de cigarrillos asociados a los metabolitos presentes en sangre, con el fin de estimar si las diferencias en las concentraciones y los metabolitos de compuestos químicos de las diferentes marcas de cigarrillos, son las causantes de la modulación de los efectos tóxicos.

Estudios sobre los mecanismos de toxicidad de componentes individuales del cigarrillo muestran que la nicotina puede tener efectos protectores sobre el ADN (Costan y Bara, 2008), de hecho, se observó una disminución de la inducción de mutaciones en experimentos con moscas de la fruta (Costan y Bara, 2008) y con *Caenorhabditis elegans* (Sobkowiak y Lesicki, 2009). Igualmente, se observó una disminución del 75% en el daño al ADN en un estudio con ratas después de la administración intra-peritoneal de nicotina en dosis de 0,3mg/kg de peso corporal (Barros et al., 2007). Varios mecanismos pueden ser responsables de los efectos protectores de alcaloide sobre el ADN, incluyendo propiedades antioxidantes que podrían disminuir los eventos tóxicos (Liu et al., 2003; Obata et al., 2002; Soto-Otero et al., 2002). Sin embargo, las especies reactivas del oxígeno (EROs) derivadas del metabolismo y los componentes específicos nicotínicos presentes en el humo del cigarrillo (excepto el alcaloide), están directamente implicadas en la inducción de daño en el ADN (Schuller, 2009; Valavanidis et al., 2009). De hecho Weber (1974), observó que altas concentraciones de N-nitrosaminas específicas del tabaco NNK y NNN inhibe la acción protectora de la nicotina (Weber et al., 1974). Ya varios estudios han demostrado que las altas concentraciones de compuestos presentes en el humo de cigarrillo como los hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP y el benceno incrementan considerablemente las frecuencias de células con MN y AN en células del epitelio bucal en poblaciones de mecánicos y constructores de carreteras (Çelik et al., 2013; Gadhia et al., 2010; Piccardo et al., 2010; Rafiq Khan y Sudha, 2012). Por lo tanto la cantidad y concentración de los diferentes productos carcinógenos presentes en el humo de cigarrillo, son probablemente los responsables de la modulación de los daños citogenéticos observados (IARC, 2013).

En cuanto al Potencial Proliferativo determinado mediante la frecuencia de células basales ( tabla 7), se evidenció una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del 11% en

el grupo fumador con respecto a la frecuencia observada en el grupo referente, además, se observó una correlación negativa entre la intensidad de exposición y el número de células basales. Los estudios *invitro* en los que se ha evaluado la actividad proliferativa de células epiteliales pulmonares, gingivales y bucales asociados a componentes presentes en el humo de cigarrillo, son consistentes con nuestros hallazgos y permiten inferir que compuestos presentes en el humo de cigarrillo inhiben la actividad proliferativa y de diferenciación de las células epiteliales a través de una vía de la apoptosis/necrosis (Carnevali et al., 1998; IARC, 2013; Nakamura et al., 1995; Semlali et al., 2011). La acroleína y acetaldehído componentes volátiles del humo del cigarrillo son perjudiciales para la supervivencia, fijación y la proliferación de fibroblastos gingivales y por ende del tejido conectivo del epitelio oral (Cattaneo et al., 2000). Es interesante que la modulación en la proliferación por exposición al cigarrillo puede ocurrir incluso en ausencia de citotoxicidad y puede ser consecuencia de la alteración de las vías bioquímicas seleccionadas (Rennard et al., 2006), como por ejemplo, favorecer la disminución paulatina de colágeno requerido para procesos de reparación y regeneración de tejidos (Laurent, 1982; Romero Frabasile, 2012). También se ha observado que la cantidad del alcaloide altera la actividad proliferativa. Las bajas concentraciones aumentan la proliferación celular mientras que las concentraciones altas como las presentes en el plasma sanguíneo de un fumador promedio, probablemente debido a sus efectos tóxicos, tienden a disminuir el efecto proliferativo en las células epiteliales (Merne et al., 2004). De este modo, el presente estudio apoya la anterior conclusión de que las concentraciones de compuestos presentes en el cigarrillo pueden tener efectos tóxicos que aumentan con una exposición prolongada, y son determinantes en la actividad proliferativa, y perturbación en la diferenciación con el aumento de la muerte celular de las células del epitelio oral. De esta manera, la exposición prolongada al humo de cigarrillo sobre el epitelio oral, inducirá un desequilibrio en la proliferación, que llevaría a la inestabilidad en la estructura de éste, dejando las células germinales desprovistas de la protección, lo cual incidirá directamente en el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer.

El índice de reparación (IR) identificado en el presente estudio puede reflejar la dinámica del epitelio bucal hacia la carcinogénesis por exposición ocupacional o ambiental de xenobióticos, y fue calculado mediante la proporción de células indicadoras de genotoxicidad y las células indicadoras de muerte celular (Celik et al., 2010; Ramirez y Saldanha, 2002). La dinámica del epitelio bucal refleja una disminución en el IR del 4.16% del grupo fumador respecto al IR observado en el grupo no fumador. Comparando el IR entre los rangos de exposición, se observó un incremento del 18 % en el IR en el rango bajo de exposición comparado con el grupo control. En contraste, los rangos de exposición > 2 paquetes-año y > 4 paquetes-año, mostraron descensos en el IR del 2 %y 26% respectivamente cuando se comparó con el IR del grupo control. El incremento en el índice de reparación de las células el epitelio bucal de los participantes expuestos a dosis relativamente bajas (<2 paquetes-año) podría ser comprendido por la activación

de defensas antioxidantes, proteasas que eliminan proteínas oxidadas, enzimas que reparan el ADN dañado, la apoptosis y las respuestas inmunitarias que eliminan las células somáticas dañadas que operan constantemente para reducir al mínimo el potencial tóxico de los subproductos del metabolismo oxidativo normal y de xenobióticos ambientales (Harfouche y Martin, 2010). No obstante, las células del epitelio oral han mostrado tener una capacidad de reparación de ADN limitada (Dhillon et al., 2004; Holland et al., 2008), por lo tanto, las células epiteliales toman como estrategia adaptativa contra los efectos genotóxicos la ruta de apoptosis, reflejada en el incremento significativo de células CC, PIC, CR Y CL en el rango bajo y medio de exposición (Çelik et al., 2010; Diler y Çelik, 2011). El incremento de BE y BN generado por el aumento en la intensidad de exposición podría ser consecuencia del descenso del IR, la exposición de sustancias carcinogénicas y mutagénicas podrían disminuir la actividad enzimática reparadora derivando eventos de daños genotóxicos observados en el rango de exposición > 4 paquetes-año.

Se han identificado varios mecanismos por los cuales el humo de cigarrillo puede atenuar y silenciar los mecanismos reparadores, los cuales incluyen la disminución de la proliferación, la contracción del colágeno por la disminución de la fibronectina, la remodelación de la matriz intra y extra celular, el estrés oxidativo y las alteraciones genéticas encontradas en los genes supresores de tumores como p53, ras, y PL6 inducidas por los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en células epiteliales de pulmón en humanos (Aoshiba and Nagai, 2003; Pfeifer, 1997; Rennard et al., 2006; Wang et al., 2001). Resulta interesante entonces, conducir estudios mecanísticos para determinar el silenciamiento de la capacidad de reparación en células del epitelio bucal expuesto a humo de cigarrillo a dosis bajas con el fin corroborar nuestros resultados.

Los resultados descritos anteriormente coinciden con los resultados obtenidos por Çelik (2010) y Diler y Çelik (2011), en su estudio con células de la mucosa oral en una población de pintores y una población fabricante de tela para alfombra (fumadora y no fumadora), demostrando que la capacidad reparadora tiende a disminuir en función al aumento de la exposición. Del mismo modo, Ramírez (2002), observó que el índice de reparación es menor en los pacientes alcohólicos con carcinomas orales comparado con el grupo control, indicando una relación inversa entre el daño genético y la apoptosis (Ramirez and Saldanha, 2002). Luego, la estabilidad celular y la estructura del tejido epitelial oral se verá reducida por el incremento de la muerte y los efectos genotóxicos de la exposición al humo de cigarrillo (Rohr et al., 2013). El cálculo del IR, además de proporcionar una medida del comportamiento de los cambios nucleares y celulares, presenta un nuevo enfoque en la evaluación de riesgo adicional que indica la relación entre el tejido y la exposición (Celik et al., 2010).

Este estudio también permitió realizar correlaciones entre todos los biomarcadores empleados para establecer una posible asociación en su formación. En el presente

se encontró correlación positiva entre los biomarcadores de BE y BN. Como se mencionó anteriormente la aparición de células BE está asociada a daño genético y eliminación del material genético amplificado que de cierta posibilita la inestabilidad citoquinética con la formación de células binucleadas especialmente en las exposiciones crónicas (Calderon-Ezquerro, 2010). De la misma manera, se observaron asociaciones positivas entre biomarcadores de citotoxicidad CC, CR, CL (excepto PIC). Este resultado puede ser explicado considerando que las células CC son una etapa apoptótica temprana y pre-formadora de eventos de apoptosis tardíos como CR, CL y se presentan como vía de eliminación de células dañadas en exposiciones bajas para disminuir la incidencia de enfermedades u otros efectos deletéreos (Bolognesi et al., 2013). En cuanto a la relación al índice de reparación con las diferentes ANs se determinó una correlación negativa para biomarcadores de genotoxicidad y asociaciones positivas para biomarcadores de muerte celular. Estos resultados indican que uno de los mecanismos de reparación celular y de vigilancia biológica, es la eliminación del material genético dañado mediante de las vías apoptóticas. Igualmente se evidenció que el potencial proliferativo no se correlacionó con los biomarcadores indicadores de citotoxicidad y genotoxicidad. Se han descrito numerosos factores que inhiben el proliferación celular incluyendo la nicotina, Cambios morfológicos y estructurales, en donde muchos de ellos podrían estar determinadas por el estrés oxidativo generado por los compuestos presentes en el humo de cigarrillo, desencadenando apoptosis en células germinativas (Merne, 2004). Los resultados observados en el presente estudio concuerdan con los resultados presentados por Diler and Çelik, (2011), Diler and Ergene, (2010) y Nersesyan (2011), en la asociación de los diferentes tipos de ANs encontradas en poblaciones expuestas a humo de cigarrillo.

Las frecuencias observadas de las anomalías nucleares del grupo expuesto, no presentaron diferencias significativas respecto a la edad grupo del referente, por lo tanto no se considera la edad como un factor de confusión. De forma similar, algunas investigaciones no detectaron modulación de las frecuencias de ANs con edades similares a las presentadas en el presente estudio con rangos entre los 18 a 40 años de edad (Nefić et al., 2013; Nersesyan et al., 2011; Tolbert et al., 1991). Bonassi en el 2011 en su meta-análisis del proyecto HUMNxl observó un incremento de las frecuencias de los biomarcadores genotóxicos, solo en el grupo los individuos mayores a 40 años, e infiere que, en edades inferiores a los 40 años, los fenómenos que inciden en la formación de daño genético, se ven reducidos posiblemente por la eficaz función que cumplen las enzimas de reparación del ADN y del metabolismo celular (Bohr y Michael Anson, 1995; Bonassi et al., 2011; Randerath et al., 1992).

El efecto del consumo de alcohol, en la formación de anomalías nucleares se ha estudiado en varias investigaciones en relación al hábito de fumar y los resultados son controversiales, ya que es difícil de evaluar sus efectos individuales. Los resultados observados en el este estudio (tabla 8) no evidenciaron efectos

modulaciones en la frecuencia de ANs entre el grupo de individuos que consumen alcohol con respecto grupo no consumidor. Sin embargo, se observó incrementos de ANs especialmente con biomarcadores de apoptosis como CC, CL y CR en el grupo de individuos que consumen alcohol y cigarrillo con respecto al grupo de individuos que no consume alcohol ni cigarrillo. Cabe mencionar que la población que reportó una ingesta de bebidas alcohólicas presenta un consumo esporádico de 1 hasta dos veces al mes, por tanto consideramos que los valores observados representan específicamente a los efectos tóxicos generados por el humo de cigarrillo. Estos resultados concuerdan con los reportados por el proyecto HUMN<sub>xl</sub>, en el cual no se encontró asociación entre el consumo de alcohol y el aumento de las frecuencias de ANs en el epitelio bucal de 5424 individuos (Bonassi et al., 2011). Contrario a lo observado, algunos investigadores encontraron un efecto sinérgico entre un consumo de alcohol recurrente y fumar cigarrillos, sobre la formación de micronúcleos y anomalías nucleares en células del epitelio bucal (Bohrer et al., 2011; Oliveira et al., 2012; Rafiq Khan y Sudha, 2012; Reis et al., 2006; Stick y Rosin, 1983). Existen varios mecanismos por los cuales el alcohol puede tener influencia en la mucosa oral, entre estas se encuentran el aumento de la penetración carcinogénica de compuestos presentes en el cigarrillo a través de la mucosa oral, mediante el aumento de solubilidad o tal vez aumento de la permeabilidad de la mucosa oral (Lieber, 1993; Wight y Ogden, 1998). El alcohol en grandes cantidades también podría presentar una asociación con la carcinogénesis a través del aumento de la actividad metabólica del hígado, lo que podría activar carcinógenos de humo de cigarrillo, que actuarían a través del metabolismo del tejido diana (Haq et al., 2009; La Vecchia et al., 1997; Warnakulasuriya et al., 2005).

En el presente estudio la evaluación moduladora de la dieta sobre la formación de células metanucleadas, reportaron una tendencia inversa aunque no significativa, posiblemente se debe a que la población de estudio reportó un nivel mínimo de ingesta de verduras, frutas y legumbres, lo que no permitió tener la suficiente variabilidad para establecer diferencias entre los grupos. Sin embargo, la literatura ofrece suficiente evidencia sobre la capacidad de los fito-nutrientes para mantener la estabilidad del material genético, en donde una mayor ingesta de vitaminas, antioxidantes, carotenoides, isotiocianatos, vegetales, fruta, y el ejercicio físico se han asociado con una disminución del riesgo de cáncer (Linseisen et al., 2007). Se ha demostrado en algunos estudios que los compuestos bioactivos tales como los flavonoides y carotenoides pueden proteger contra el estrés oxidativo, que además, favorece los procesos de detoxificación de carcinógenos, reparación de lesiones de ADN y apoptosis (IARC, 2013). Los isotiocianatos pueden inhibir la bioactivación de procarcinógenos se encuentran en el humo del cigarrillo, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos y 4-metilnitrosamino -1 - (3-piridil)-1-butanona (Hecht, 2000). Los isotiocianatos también pueden aumentar la excreción de metabolitos cancerígenos antes de que puedan dañar ADN (Gasper y col., 2005). De hecho, Varios estudios reportan la asociación inversa entre el incremento de las ANs y la ingesta de fito-nutrientes en individuos consumidores

de cigarrillo (Bonassi et al., 2011; Gabriel et al., 2006). La falta de fito-nutrientes esenciales, el estrés oxidativo, incluyendo daño en el ADN, oxidación de los lípidos, proteínas y azúcares, contribuye a los cambios celulares y subcelulares que pueden estar tan asociados con enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer (Kažimírová et al., 2004), de hecho, se ha observado que en el plasma sanguíneo y la mucosa bucal, el folato y vitamina B12 son menores en fumadores que en no fumadores, incidiendo directamente en la inestabilidad celular y aumento del daño genético (Piyathilake et al., 1995). Igualmente estudios realizados por Fenech demostraron que la baja ingesta de calcio, folato, ácido nicotínico, vitamina E, retinol y beta-caroteno está directamente relacionada con el riesgo a elevados aumentos de la inestabilidad del genoma (Fenech, 2008), incluso, se han observado efectos quimopreventivos de antioxidantes (vitamina E,  $\beta$ -caroteno, vitamina C y ginseng rojo) sobre el ADN oxidado en una población fumadora (Lee et al., 1998). De esta manera, es importante realizar estudios que incluyan grupo de individuos con altas ingestas de fito-nutrientes para así poder establecer comparaciones que determinen la modulación en la formación de los biomarcador presentes sobre el epitelio oral.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran la alta sensibilidad del biomarcador de anomalías nucleares para detectar los efectos citotóxicos, genotóxicos, en una población de fumadores jóvenes con bajo consumo de cigarrillo. Por este motivo el ensayo de ANs en células exfoliadas del epitelio bucal se considera como técnica eficiente y económica que permite realizar un óptimo monitoreo poblacional. Además, este tipo de investigaciones en su conjunto resultan interesantes no sólo por abordar el tema de la exposición a productos químicos desde el punto de vista genotóxico y citotóxico, sino porque muestra evidencia sobre los efectos que pueden inducir algunos químicos sobre la integridad genómica, la proliferación, diferenciación y reparación en los tejidos involucrados, por lo que advierte la necesidad de reforzar las acciones dirigidas a promover la formulación de modelos efectivos en las estrategias preventivas y de tratamientos que permitan la disminución de la epidemia de enfermedades en poblaciones jóvenes generados por el cigarrillo, así como fomentar estudios citogenéticos de seguimiento.

## 11. CONCLUSIONES

Las frecuencias de células picnóticas, cariolíticas, cariorréticas, células con cromatina condensada, yemas nucleares y células binucleadas indicadoras de citotoxicidad y genotoxicidad en células exfoliadas del epitelio bucal, fueron estadísticamente más altas en el grupo de fumadores con respecto al grupo no fumador. Además, se encontró una asociación positiva estadísticamente significativa entre el número de anomalías nucleares y los años de consumo de cigarrillo. Por lo tanto, los resultados de este estudio demuestran la alta sensibilidad del ensayo de anomalías nucleares en células del epitelio bucal para detectar los efectos citotóxicos y genotóxicos, así como de los mecanismos que conducen a esta toxicidad.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la exposición al humo del cigarrillo induce lesiones citotóxicas de carácter irreversible en células del epitelio bucal, compatibles con procesos apoptóticos que podrían estar ocurriendo también en las vías respiratorias bronquiales o pulmonares. También, se observó que el consumo de cigarrillo disminuye la actividad proliferativa del tejido epitelial bucal.

Así mismo los resultados indican que el valor del índice de reparación (IR) de las células buco-epiteliales del grupo fumador es menor al valor del IR del grupo no fumador. Estos resultados sugieren que la exposición al humo de cigarrillo sobre el epitelio oral disminuye los mecanismos protectores y toma como estrategia adaptativa la ruta de apoptosis para eliminar del material genómico afectado.

En este estudio la cito-genotoxicidad promovida por el consumo de cigarrillo no está correlacionada con la edad, la ingesta de fito-nutrientes y el consumo de bebidas alcohólicas. Debido a las características de la población (edad <40 años y baja ingesta de fito-nutrientes).

El ensayo de anomalías nucleares basado en la identificación de marcadores de daño genético y muerte celular, proporciona un método eficaz para medir efectos tóxicos y genotóxicos. Este ensayo es podría útil para identificar poblaciones con mayor riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con el consumo de cigarrillo. También las características de aplicación y obtención de la muestra hacen que este ensayo pueda ser empleado como herramienta en futuros programas de vigilancia epidemiológica.

## 12.RECOMENDACIONES

Es importante realizar otros estudios de biomonitoreo poblacional que incluyan individuos jóvenes expuestos al humo de cigarrillo, debido a que en la literatura existen pocos estudios que evalúen en tejidos blancos de fácil obtención el riesgo potencial al desarrollo de enfermedades asociadas al consumo de cigarrillo. Algunas de las recomendaciones son:

1. Establecer los niveles de concentración de compuestos presentes en las diferentes marcas de cigarrillos para identificar si la diferencia de concentraciones de alquitrán y nicotina o el tipo de cigarrillo pueden modular o no las frecuencias de las anomalías nucleares.
2. Se recomienda también la utilización de metodologías complementarias como la hibridación por fluorescencia in situ (FISH) para identificar si las ANs indicadoras de genotoxicidad son inducidas a través de procesos aneugénicos y/o clastogénicos.
3. Ampliar el rango de consumo de fito-nutrientes para obtener mayor variabilidad con el fin de establecer el efecto modular de la frecuencia de anomalías nucleares.
4. En cuanto a la utilización del ensayo utilizado según los resultados obtenidos, se recomienda emplear todo el espectro de anomalías completas, aunque es más laborioso permite obtener el perfil general de citotoxicidad y genotoxicidad asociado a xenobióticos ambientales y ocupacionales.

## BIBLIOGRAFIA

- Alexandrov, P.N., Zhao, Y., Pogue, A.I., Tarr, M.A., Kruck, T.P., Percy, M.E., Cui, J.G., and Lukiw, W.J. (2005). Synergistic effects of iron and aluminum on stress-related gene expression in primary human neural cells. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 8, 117-127; discussion 209-115.
- American Cancer Society (2010). *Cancer Facts and Figures 2010* (Atlanta, American Cancer Society).
- Amin, S., Desai, D., Hecht, S.S., and Hoffmann, D. (1996). Synthesis of Tobacco-Specific N-Nitrosamines and Their Metabolites and Results of Related Bioassays. *Critical Reviews in Toxicology* 26, 139-147.
- Aoshiba, K., and Nagai, A. (2003). Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. *Tobacco induced diseases* 1, 219-226.
- Arboleda-Moreno, Y., Hoyos, L., Carvajal, S., and Sierra-Torres, C. (2004). Genotoxicity from exposure to cigarettes in young smokers in Colombia. *Revista panamericana de salud pública* 15, 367-372.
- Ayarde Romero, B., Cuti, M., Ascarrunz González, M.E., and Tirado Bustillos, N. (2008). Efecto genotóxico del consumo de tabaco en estudiantes de la Facultad de Medicina de la UMSA que habitan en la altura. *BIOFARBO* 16, 67.
- Barros, D.M., Galhardi, F.G., Ferreira, J., Guterres, L.B., Dickel, O., Geracitano, L.A., Izquierdo, I., and Monserrat, J.M. (2007). The benefits and drawbacks of nicotine exposure in the cortex and hippocampus of old rats. *Neurotoxicology* 28, 562-568.
- Bloching, M., Hofmann, A., Lautenschläger, C., Berghaus, A., and Grummt, T. (2000). Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral oncology* 36, 550-555.
- Bohr, V.A., and Michael Anson, R. (1995). DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutation Research/DNAging* 338, 25-34.
- Bohrer, P.L., Paiva, R., Da Silva, I., and Rados, P. (2011). Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta cytologica* 49, 265-272.
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyanyan, A., Thomas, P., and Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*.

Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., and Zeiger, E. (2011a). The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN-XL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 728, 88-97.

Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkilä, P., Wanders, S., Wilhardt, P., and Hansteen, I.-L. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer research* 60, 1619-1625.

Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.-p., Chang, W.P., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Zeiger, E., and Fenech, M. (2003a). Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 543, 155-166.

Carnevali, S., Nakamura, Y., Mio, T., Liu, X., Takigawa, K., Romberger, D., Spurzem, J., and Rennard, S. (1998). Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 274, L591-L598.

Casartelli, G., Monteghirfo, S., De Ferrari, M., Bonatti, S., Scala, M., Toma, S., Margarino, G., and Abbondandolo, A. (1997). Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa. *Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology* 19, 475.

Cattaneo, V., Cetta, G., Rota, C., Vezzoni, F., Rota, M., Gallanti, A., Boratto, R., and Poggi, P. (2000). Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology* 71, 425-432.

Çelik, A., Çavaş, T., and Ergene-Gözükara, S. (2003). Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis* 18, 417-421.

Celik, A., Diler, S.B., and Eke, D. (2010). Assessment of Genetic Damage in Buccal Epithelium Cells of Painters: Micronucleus, Nuclear Changes, and Repair Index. *DNA and Cell Biology* 29, 277-284.

Çelik, A., Yildirim, S., Ekinçi, S.Y., and Taşdelen, B. (2013). Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and environmental safety* 92, 265-270.

Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., and Bonassi, S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705, 11-19.

Costan, E., and Bara, C.I. (2008). Effects of treatment with different concentrations of nicotin solution, on a back-mutated *Drosophila melanogaster* population. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec II a Genetica si Biologie Moleculara* 9.

D'Agostini, F., Calcagno, E., Micale, R.T., La Maestra, S., De Flora, S., and Cingano, L. (2012). Cytogenetic analysis of gingival epithelial cells, as related to smoking habits and occurrence of periodontal disease. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.

Danadevi, K., Rozati, R., Banu, B.S., and Grover, P. (2004). Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis* 19, 35-41.

DeMarini, D.M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567, 447-474.

Dhillon, V.S., Thomas, P., and Fenech, M. (2004). Comparison of DNA damage and repair following radiation challenge in buccal cells and lymphocytes using single-cell gel electrophoresis. *International Journal of Radiation Biology* 80, 517-528.

Diler, S.B., and Çelik, A. (2011). Cytogenetic biomonitoring of carpet fabric workers using micronucleus frequency, nuclear changes, and the calculation of risk assessment by repair index in exfoliated mucosa cells. *DNA and Cell Biology* 30, 821-827.

Diler, S.B., and Ergene, S. (2010). Nuclear anomalies in the buccal cells of calcite factory workers. *Genetics and Molecular Biology* 33, 374-378.

Ding, X., and Kaminsky, L.S. (2003). HUMAN EXTRAHEPATIC CYTOCHROMES P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts\*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43, 149-173.

Djordjevic, M.V., Sigountos, C.W., Brunnemann, K.D., and Hoffmann, D. (1991). Formation of 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butyric acid in vitro and in mainstream cigarette smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 209-213.

Domínguez Odio, A., Rojas Vázquez, E.I., Romero García, L.I., Rodríguez Tito, J.C., and Pérez Andres, I. (2006). Lesiones genéticas y citológicas inducidas por la exposición a químicos en centros de trabajo. *Salud de los Trabajadores* 14, 51-59.

Du, H., Sun, J., Chen, Z., Nie, J., Tong, J., and Li, J. (2012). Cigarette Smoke-Induced Failure of Apoptosis Resulting in Enhanced Neoplastic Transformation in Human Bronchial Epithelial Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 75, 707-720.

Dutra, A., Pak, E., Wincovitch, S., John, K., Poirier, M., and Olivero, O. (2010). Nuclear bud formation: a novel manifestation of Zidovudine genotoxicity. *Cytogenetic and genome research* 128, 105-110.

El-Zein, R.A., Fenech, M., Lopez, M.S., Spitz, M.R., and Etzel, C.J. (2008). Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17, 1111-1119.

Eriksen, M., Mackay, J., and Ross, H. (2012). *El Atlas del tabaco*. Sociedad Americana contra el Cáncer Cuarta edición p. cm.

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protocols* 2, 1084-1104.

Fenech, M. (2008). Genome health nutrigenomics and nutrigenetics—diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1365-1370.

Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., and Bonassi, S. (2011). The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis* 26, 239.

Fojtová, M., and Kovařík, A. (2000). Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant, cell & environment* 23, 531-537.

Gabriel, H.E., Crott, J.W., Ghandour, H., Dallal, G.E., Choi, S.-W., Keyes, M.K., Jang, H., Liu, Z., Nadeau, M., and Johnston, A. (2006). Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *The American journal of clinical nutrition* 83, 835-841.

Gadhia, P.K., Thumbar, R.P., and Kevadiya, B. (2010). Cytome Assay of Buccal Epithelium for Bio-monitoring Genotoxic Assessment of Benzene Exposure among Petrol Pump Attendants. *Int J Hum Genet* 10, 239-245.

Garnier, L., SIMON-PLAS, F., Thuleau, P., AGNEL, J.P., BLEIN, J.P., Ranjeva, R., and MONTILLET, J.L. (2006). Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, cell & environment* 29, 1956-1969.

Guengerich, F.P. (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14, 611-650.

Haq, M.W., Batool, M., Ahsan, S.H., and Qureshi, N.R. (2009). Alcohol use in mouthwash and possible oral health concerns. *Alcohol*.

Harfouche, G., and Martin, M.T. (2010). Response of normal stem cells to ionizing radiation: A balance between homeostasis and genomic stability. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704, 167-174.

Harris, J.K., Luke, D.A., Zuckerman, R.B., and Shelton, S.C. (2009). Forty Years of Secondhand Smoke Research: The Gap Between Discovery and Delivery. *American Journal of Preventive Medicine* 36, 538-548.

Haveric, A., Haveric, S., and Ibrulj, S. (2010). Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods* 20, 260-266.

Hecht, S.S. (1998). Biochemistry, Biology, and Carcinogenicity of Tobacco-Specific N-Nitrosamines†. *Chemical Research in Toxicology* 11, 559-603.

Hecht, S.S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 1194-1210.

Hecht, S.S. (2003a). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer* 3, 733-744.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., and Fenech, M. (2008a). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659, 93-108.

Huang, P., Huang, B., Weng, H., Nakayama, K., and Morimoto, K. (2009). Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Preventive medicine* 48, 383-388.

Huang, R.Y., and Chen, G.G. (2011). Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 158-169.

IARC (1986). IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Tobacco Smoking Vol. 38.

IARC (2002). Tobacco Smoke and Involuntary Smoking (International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation), pp. 12.

IARC (2004). Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monographs 83.

IARC (2013). A Review of Human Carcinogens Part E: Personal Habits and Indoor Combustions. World Health Organization 100E.

Imirzalioglu, P., Uckan, S., Alaaddinoğlu, E.E., Haberal, A., and Uckan, D. (2005). Cigarette Smoking and Apoptosis. *Journal of Periodontology* 76, 737-739.

Jagetia, G.C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D., and Vidyasagar, M.S. (2001). Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491, 9-16.

Jalas, J.R., Hecht, S.S., and Murphy, S.E. (2005). Cytochrome P450 Enzymes as Catalysts of Metabolism of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a Tobacco Specific Carcinogen. *Chemical Research in Toxicology* 18, 95-110.

Joshi, M.S., Verma, Y., Gautam, A.K., Parmar, G., Lakkad, B.C., and Kumar, S. (2011). Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Archives of Oral Biology* 56, 63-67.

K. Rajkokila, S.S.a.M.V.U. (2010). Nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of petrol station attendants in Tamilnadu, South India. *Journal of Medical Genetics and Genomics* Vol. 2, 18-22.

Kamboj, M., and Mahajan, S. (2007). Micronucleus—an upcoming marker of genotoxic damage. *Clinical oral investigations* 11, 121-126.

Kažimírová, A., Barančoková, M., Volkovová, K., Staruchová, M., Krajčovičová-Kudláčková, M., Wsóllová, L., Collins, A., and Dušinská, M. (2004). Does a vegetarian diet influence genomic stability? *Eur J Nutr* 43, 32-38.

Konopacka, M. (2003). Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. *Neoplasma* 50, 380.

La Vecchia, C., Tavani, A., Franceschi, S., Levi, F., Corrao, G., and Negri, E. (1997). Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral oncology* 33, 302-312.

Laurent, G.J. (1982). Rates of collagen synthesis in lung, skin and muscle obtained in vivo by a simplified method using [3H] proline. *Biochem J* 206, 535-544.

Lee, B.M., Lee, S.K., and Kim, H.S. (1998). Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -carotene and red ginseng). *Cancer Letters* 132, 219-227.

Lieber, C.S. (1993). Herman Award Lecture, 1993: a personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *The American journal of clinical nutrition* 58, 430-442.

Liu, Q., Tao, Y., and Zhao, B. (2003). ESR study on scavenging effect of nicotine on free radicals. *Applied Magnetic Resonance* 24, 105-112.

Mackay, J., Jemal, A., Lee, N.C., and Parkin, D.M. (2006). *The Cancer Atlas, I.A.f.R.o.C. CDC, World Health Organisation, International Union Against Cancer* ed.

Martínez Flores, K., Souza Arroyo, V., Bucio Ortiz, L., Gómez Quiroz, L.E., and Gutiérrez Ruiz, M.C. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta toxicológica argentina* 21, 33-49.

Massano, J., Regateiro, F.S., Januário, G., and Ferreira, A. (2006). Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 102, 67-76.

McErlean, A., and Ginsberg, M.S. (2011). Epidemiology of Lung Cancer. *Seminars in Roentgenology* 46, 173-177.

Merne, M., Heikinheimo, K., Saloniemi, I., and Syrjänen, S. (2004). Effects of snuff extract on epithelial growth and differentiation in vitro. *Oral oncology* 40, 6-12.

Messner, B., Frotschnig, S., Steinacher-Nigisch, A., Winter, B., Eichmair, E., Gebetsberger, J., Schwaiger, S., Ploner, C., Laufer, G., and Bernhard, D. (2012).

Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. *Cell death & disease* 3, e424.

MPS, and DNE (2008). Estudio Nacional de sustancias psicoactivas en Colombia 2008 (Bogotá, Ministerio de Protección Social, Dirección Nacional de Estupefacientes, Oficinas de las Naciones Unidas contra la Droga y Delito, Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas, Organización de los Estados Americanos, Embajada de los Estados Unidos en Colombia), pp. 149.

MPS, M.d.p.s. (2011). Gobierno Nacional, sociedades científicas y sociedad civil unidos para fomentar hábitos de vida saludable. *Boletín de Prensa* No 283

Nakamura, Y., Romberger, D.J., Tate, L., Ertl, R.F., Kawamoto, M., Adachi, Y., Mio, T., Sisson, J.H., Spurzem, J.R., and Rennard, S.I. (1995). Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 151, 1497-1503.

Nefić, H., Mušanović, J., Kurteshi, K., Prutina, E., and Turcalo, E. (2013). The effects of sex, age and cigarette smoking on micronucleus and degenerative nuclear alteration frequencies in human buccal cells of healthy Bosnian subjects. 2013 3.

Nersesyan, A., Kundi, M., Atefie, K., Schulte-Hermann, R., and Knasmüller, S. (2006). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15, 1835-1840.

Nersesyan, A., Muradyan, R., Kundi, M., and Knasmueller, S. (2011). Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis* 26, 295-301.

NIDA (2010). Cigarettes and Other Tobacco Products. <http://drugabusegov>, 1-6.

NIDA (2011). Tobacco Addiction. disponible en internet <http://www.drugabusegov/publications/topics-in-brief/tobacco-addiction>.

Obata, T., Aomine, M., Inada, T., and Kinemuchi, H. (2002). Nicotine suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Neuroscience letters* 330, 122-124.

Obe, G., and Herha, J. (1978). Chromosomal aberrations in heavy smokers. *Hum Genet* 41, 259-263.

Oliveira, L.U., Lima, C.F., Salgado, M.A., Balducci, I., and Almeida, J.D. (2012). Comparative study of oral mucosa micronuclei in smokers and alcoholic smokers. *Anal Quant Cytol Histol* 34, 9-14.

Orellana-Bustos, A., Espinoza-Santander, I., Franco-Martínez, M., Lobos-James-Freyre, N., and Ortega-Pinto, A. (2004). Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Medicina oral*:

organo oficial de la Sociedad Espanola de Medicina Oral y de la Academia Iberoamericana de Patologia y Medicina Bucal 9, 197.

Pasupathi, P., Bakthavathsalam, G., Rao, Y., and Farook, J. (2009). Cigarette smoking--Effect of metabolic health risk: A review. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 3, 120-127.

Pfeifer, G. (1997). How does cigarette smoke induce cancer? Research Project Awards. Piccardo, M.T., Stella, A., and Valerio, F. (2010). Is the smokers exposure to environmental tobacco smoke negligible. *Environ Health* 9.

Pieraccini, G., Furlanetto, S., Orlandini, S., Bartolucci, G., Giannini, I., Pinzauti, S., and Moneti, G. (2008). Identification and determination of mainstream and sidestream smoke components in different brands and types of cigarettes by means of solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1180, 138-150.

Piyathilake, C.J., Macaluso, M., Hine, R.J., Vinter, D.W., Richards, E.W., and Krumdieck, C.L. (1995b). Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency, and occurrence of micronuclei in epithelial cells of the buccal mucosa. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 4, 751-758.

Pryor, W.A., and Stone, K. (1993). Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences* 686, 12-27.

Rafiq Khan, M., and Sudha, S. (2012). Evaluation of Genotoxicity in Automobile Mechanics Occupationally Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 5, 87-92.

Ramirez, A., and Saldanha, P.H. (2002). Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 1, 246-260.

Randerath, K., Li, D., Nath, R., and Randerath, E. (1992). Exogenous and endogenous DNA modifications as monitored by <sup>32</sup>P-postlabeling: Relationships to cancer and aging. *Experimental gerontology* 27, 533-549.

Reis, S.R.d.A., Espírito Santo, A.R.d., Andrade, M.G.S., and Sadigursky, M. (2006). Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Brazilian Oral Research* 20, 97-102.

Rennard, S.I., Togo, S., and Holz, O. (2006). Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3, 703.

Rodgman, A., and Perfetti, T.A. (2009). The chemical components identified in tobacco and tobacco smoke prior to 1954: a chronology of classical chemistry. *Beiträge zur Tabakforschung international* 23, 277-333.

Rohr, P., da Silva, J., da Silva, F.R., Sarmiento, M., Porto, C., Debastiani, R., dos Santos, C.E., Dias, J.F., and Kvitko, K. (2013). Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay. *Environmental and molecular mutagenesis* 54, 65-71.

Romero Frabasile, A. (2012). Efecto del condensado de humo de cigarrillo sobre la remodelación de matrices tridimensionales de colágeno pobladas por fibroblastos gingivales humanos.

Rubin, P.J.P.W. (2003). *Oncologia Clinica Elsevier, España (8va edición)*, pp. 823.

Salazar, J. (2014). Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa bucal, como un biomarcador de daño genético en una población fumadora del departamento del Cauca.

Samet, J.M. (2009). La epidemia mundial del tabaquismo, I.f.G.T.C.a.D.o. *Epidemiology*, ed.

Sanchez-Siles, M., Ros-Llor, I., Camacho-Alonso, F., and Lopez-Jornet, P. (2011). A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Archives of oral biology* 56, 1148-1153.

Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R., and Levis, A. (1987). The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 2, 11-17.

Schuller, H.M. (2009). Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nature reviews Cancer* 9, 195-205.

Sellappa, S., Sadhanandhan, B., Francis, A., and Vasudevan, S.G. (2010). Evaluation of genotoxicity in petrol station workers in South India using micronucleus assay. *Industrial health* 48, 852-856.

Semlali, A., Chakir, J., Goulet, J.P., Chmielewski, W., and Rouabhia, M. (2011). Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *Journal of Periodontal Research* 46, 533-541.

Shafey, O., Eriksen, M., Ross, H., and Mackay, J. (2010). *The Tobacco Atlas*, B.H. Group, ed. (EE.UU, American Cancer Society).

Shi, Q., and King, R.W. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, 1038-1042.

Smith, C., Perfetti, T., Garg, R., and Hansch, C. (2003). IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values. *Food and Chemical Toxicology* 41, 807-817.

Sobkowiak, R., and Lesicki, A. (2009). Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. *Drug and Chemical Toxicology* 32, 252-257.

Society, A.C. (2005). *Cancer Facts and Figures*. Cancer Facts and Figures 2005, pag-22.

Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochemical pharmacology* 64, 125-135.

Stick, H.F., and Rosin, M.P. (1983). Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *International Journal of Cancer* 31, 305-308.

Stich, H., and Rosin, M. (1984). Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer letters* 22, 241-253.

Stone, J.G., Jones, N.J., McGregor, A.D., and Waters, R. (1995). Development of a Human Biomonitoring Assay Using Buccal Mucosa: Comparison of Smoking-related DNA Adducts in Mucosa versus Biopsies. *Cancer Research* 55, 1267-1270.

Storr, C., Cheng, H., Posada-Villa, J., Aguilar-Gaxiola, S., and Anthony, J. (2008). Adult smokers in Colombia: Who isn't giving it up? *Addictive behaviors* 33, 412-421.

Sudha, S., Kripa, S.K., Shibily, P., Shyn, J., and Balachandar, V. (2011). Biomonitoring of genotoxic effects among shielded manual metal arc welders. *Asian Pac J Cancer Prev* 12, 1041-1044.

Thomas, P., and Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 682, 235.

Thomas, P., and Fenech, M. (2011). Buccal micronucleus cytome assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 682, 235.

Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T., and Fenech, M. (2008). The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 638, 37-47.

Thomas, P., Wu, J., Dhillon, V., and Fenech, M. (2011). Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 26, 69.

Tolbert, P.E., Shy, C.M., and Allen, J.W. (1992b). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. *Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects Including Methodology* 271, 69-77.

Torres-Bugarín, O., and Ramos-Ibarra, M.L. (2013). Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology* 31, 650-657.

U.S. Department of Health and Human Services (2004). *The Health Consequences of Smoking*. Office on Smoking and Health Washington DC 20402. ISBN 0-16-051576-2

U.S. Department of Health and Human Services (2010). *How tobacco smoke causes disease: The biology and behavioral basis for smoking-attributable disease*. In A report of the Surgeon General (Atlanta,GA, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health).

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., and Fiotakis, K. (2009). Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *International journal of environmental research and public health* 6, 445-462.

Vuyyuri, S.B., Ishaq, M., Kuppala, D., Grover, P., and Ahuja, Y. (2006). Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic. *Environmental and molecular mutagenesis* 47, 562-570.

Wang, H., Liu, X., Umino, T., Skold, C.M., Zhu, Y., Kohyama, T., Spurzem, J.R., Romberger, D.J., and Rennard, S.I. (2001). Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 25, 772-779.

Warnakulasuriya, S., Sutherland, G., and Scully, C. (2005). Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral oncology* 41, 244.

WHO (2007). *Salud Bucodental*. World Health Organisation Nota informativa N°318.

WHO (2009). *Report on the global tobacco epidemic, 2009*.

WHO (2011). *Third WHO Report on the Global Tobacco Epidemic*. World Health Organization.

WHO (2012). *Mortality attributable to tobacco*. WHO global report 290, 391.

Wight, A., and Ogden, G. (1998). Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer—a review. *Oral oncology* 34, 441-447.

Wogan, G., Hecht, S., Felton, J., Conney, A., and Loeb, L. (2004). *Environmental and chemical carcinogenesis* (Elsevier).

Wu, P.-A., Loh, C.-H., Hsieh, L.-L., Liu, T.-Y., Chen, C.-J., and Liou, S.-H. (2004a). Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutation research* 562, 27.

## ANEXO 1: CONCENTIMIENTO INFORMADO

Entiendo que se me ha pedido que participe voluntariamente como sujeto en una investigación llamada **“BIOMONITOREO EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL A PARTIR DE ANOMALÍAS NUCLEARES, PARA DETERMINAR EL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL CONSUMO DE CIGARRILLO EN UNA POBLACIÓN DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA”** trabajo de grado realizado por Gilmar Delgado Burbano estudiante de Biología quien se encuentra bajo la dirección de la Ph.D. Noelia Cajas Salazar docente del Laboratorio de Toxicología Genética y citogenética, Facultad de Ciencias Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca, Popayán.

**PROPÓSITO:** Determinar el daño genético ocasionado por el consumo de cigarrillo, por medio del biomarcador de anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa bucal en una población joven y sana del departamento del Cauca con el fin de establecer el efecto citotóxico, genotóxico y la sensibilidad del biomarcador para evaluar el riesgo de desarrollar cáncer de la cavidad oral debida a este hábito y para definir como su frecuencia es modulada por otros factores del estilo de vida.

**BENEFICIOS A LA SOCIEDAD:** Este estudio aportara información acerca del riesgo que representa la exposición al cigarrillo en órganos específicos como lo es la cavidad oral a nivel de desequilibrio genético, con el fin de establecer un posible biomarcador temprano que permita cuantificar y predecir el riesgo de esta población para desarrollar cáncer oral y de esta forma poder contribuir con datos relevantes en la formulación de estrategias de prevención, en el control de poblaciones expuestas mediante biomonitoreo y en la detección temprana de esta neoplasia para mejorar las alternativas de tratamientos.

**NUMERO DE PARTICIPANTES:** El número aproximado será de 160 individuos.

**PROCEDIMIENTOS:** Si decido participar voluntariamente en el estudio una vez haya firmado el consentimiento informado, entiendo que:

- 1) Completaré un cuestionario sobre estilo de vida y estado de salud, facilitando información como teléfono y dirección que podrá ser utilizada para contactarme si existe la necesidad en el futuro.
- 2) Permitiré que se me tomen una muestra de mucosa bucal haciendo uso de un cepillo citológico estéril para la extracción de las células epiteliales exfoliadas, las cuales serán montadas en portaobjetos para realizar la prueba citogenética de Micronúcleos.
- 3) El trabajo de grado ha sido aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca quienes aprobarán los procedimientos que se lleven a cabo y verificarán que se respeten siempre los derechos de los participantes y del medio ambiente.
- 4) La información del cuestionario y todas las muestras serán identificadas con un código único para proteger mi identidad y datos personales. Esta información será



### ANEXO 3: ENTREVISTA

## BIOMONITOREO EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL A PARTIR DE ANOMALÍAS NUCLEARES, PARA DETERMINAR EL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL CONSUMO DE CIGARRILLO EN UNA POBLACIÓN DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

### I. INFORMACION PERSONAL

Nombres y Apellidos					
Dirección y tiempo en el lugar			Teléfono y móvil		
Fecha y lugar de nacimiento				Edad	
Estado civil	Casado		Soltero		Otros
Oficio y nivel de educación					

### II. INFORMACION SOBRE ESTADO DE SALUD

¿Ha sufrido de problemas respiratorios?	¿De qué tipo?
¿Ha sufrido de alguna enfermedad importante?	¿Cuál?
1. Hepatitis	2. Herpes

Consumo algún tipo de medicamento ¿Cuál y por cuánto tiempo?	
Consumo algún suplemento vitamínico ¿Cual y por cuánto tiempo?	
¿En los últimos 2 años ha sido expuesto a irradiación?	¿Cada cuanto visita al odontólogo?

### III. INFORMACIÓN QUE HACE REFERENCIA A SU EMPLEO ACTUAL

Ha estado expuesto ocupacionalmente a agentes químicos	
¿Cuál?	Tiempo de exposición

### IV. INFORMACION SOBRE EL HABITO DE FUMAR ACTUAL

Consumo/cigarrillo	Marque con X	Cigarrillos/día					No sabe
		<10	10-20	20-40	40-60	>60	
1. Fumador							
2. No fumador							
Tiempo que lleva fumando (meses)			Marca y tipo (filtro)				
¿Exposición ambiental al cigarrillo?			Lugar		Tiempo		

### V. INFORMACION SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL

<b>Tipo</b>	<b>Frecuencia/mes</b>
-------------	-----------------------

## VI.HABITOS ALIMENTICIOS

Alimentos ricos en betacarotenos Frutas y verduras de color naranja, amarillo y verde oscuro Acelga, espinaca, espárragos, albaca	Frecuencia/semana
Alimentos ricos en vitamina B12 Hígado, riñón, leche y sus derivados, huevos, y cereales, pescado, y carnes	Frecuencia/semana
Alimentos ricos en folato Lechuga, brócoli, tomate, aguacate, plátano, naranja, legumbres	Frecuencia/semana

## VII. ANTECEDENTES FAMILIARES

<b>Trastorno</b>	<b>Descripción</b>	
Malformaciones de nacimiento	Familiar	Tipo
Cáncer hereditario	Familiar	Tipo