

**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**

JULIANA SALAZAR BENITEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN-CAUCA
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**

JULIANA SALAZAR BENÍTEZ

Trabajo de Grado para optar por el título de Bióloga

Directora
NOHELIA CAJAS SALAZAR
Doctora en Ciencias Biomédicas

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

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 OBJETIVO GENERAL	17
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
5. MARCO TEÓRICO	18
5.1 COMPONENTES DEL HUMO DEL CIGARRILLO	18
5.2 METABOLISMO DEL HUMO DEL CIGARRILLO.....	19
5.2.1 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	21
5.3 PROCESO CARCINOGENÉTICO.....	21
5.4 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	22
5.5 BIOMARCADORES	23
5.5.1 Biomarcador de exposición.....	23
5.5.2 Biomarcador de susceptibilidad	23
5.5.3 Biomarcador de efecto.....	24
5.6 BIOMARCADOR DE MICRONÚCLEOS	24
5.6.1 Mecanismos de formación de los MN.....	24
5.6.2 Biomarcador de MN como predictor de riesgo de cáncer	25
5.7 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS BUCALES	26
5.8 PROYECTO HUMN _{xL}	28
6. ANTECEDENTES.....	29
7. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
7.1 TIPO DE ESTUDIO	33
7.2 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	33
7.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE MUCOSA BUCAL.....	34
7.4 PROCESAMIENTO DE CÉLULAS BUCALES.....	34

7.5 COLORACIÓN DE LAS PLACAS	34
7.6 CONTEO Y CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MN EN LAS CÉLULAS BUCALES	35
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
8. RESULTADOS.....	37
8.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN.....	37
8.2 EFECTO DEL CONSUMO DE CIGARRILLO SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS	39
8.3 EFECTO DE LA EDAD SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS .	43
8.4 EFECTO DEL CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHOLICAS SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL...	46
8.5 EFECTO DEL INDICE DE MASA CORPORAL (IMC) SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL...	47
8.6 EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL	48
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	61
11. RECOMENDACIONES.....	62
12. BIBLIOGRAFÍA	63

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Estudios epidemiológicos de corte transversal en fumadores de cigarrillo y masticadores de tabaco, que analizaron el biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal haciendo uso de la tinción ADN específica Feulgen-Fast Green	30
Tabla 2. Estudios epidemiológicos de corte transversal en fumadores de cigarrillo y masticadores de tabaco, que analizaron el biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal haciendo uso de las tinciones ADN no específica.....	31
Tabla 3. Características demográficas y de estilo de vida de la población objeto de estudio	38
Tabla 4. Efecto del consumo de cigarrillo sobre la frecuencia de micronúcleos en células bucales	40
Tabla 5. Análisis de correlación Rho de Spearman entre la edad, el tiempo de consumo de cigarrillo y la frecuencia de Micronúcleos en 1000 células	45
Tabla 6. Efecto del consumo de alcohol sobre la frecuencia de micronúcleos en células bucales	46
Tabla 7. Efecto de la dieta sobre la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema que relaciona el consumo del cigarrillo con los procesos involucrados en el desarrollo de cáncer.....	20
Figura 2. Mecanismos de formación de los micronúcleos	25
Figura 3. Estratificación y migración de las células epiteliales de la cavidad oral..	27
Figura 4. Imagen de células diferenciadas exfoliadas del epitelio bucal con tinción Feulgen-Fast Green bajo el microscopio de luz. a) Células normales magnificadas con el objetivo 40X y b) Célula con micronúcleo magnificada con el objetivo 100X	39
Figura 5. Frecuencia de micronúcleos en 1000 células según el hábito de fumar.	41
Figura 6. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y el número de paquetes-años de consumo de cigarrillo	41
Figura 7. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y el tiempo de consumo en años.....	42
Figura 8. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y la edad de la población total	43
Figura 9. Análisis de correlación lineal entre el número MN en 1000 células del epitelio bucal y la edad del grupo referente	44
Figura 10. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y la edad del grupo expuesto	44
Figura 11. Análisis de correlación lineal entre el tiempo de consumo de cigarrillo en años y la edad del grupo expuesto	45
Figura 12. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y al índice de masa corporal.....	47

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Consentimiento informado.....	79
Anexo B. Encuesta	81

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a Dios y a la Virgen por ser mis principales guías, por darme la fortaleza para recorrer este largo camino tan significativo en mi vida personal como lo fue mi carrera de Biología, y por permitirme llegar hasta este momento tan anhelado. A mi amada hija María José Victoria Salazar, el motor de mi vida, que con su amor, viveza y alegría fue y será mi fuente de inspiración para seguir adelante como una luchadora. A dos seres que me han apoyado durante toda mi vida, mis padres María Cristina Benítez y Diego Salazar por su amor incondicional, sacrificio y entrega, mil y mil gracias; a mi hermana Adriana Salazar por ser mi cómplice, mi soporte, amiga incondicional y modelo a seguir, gracias por todo tu apoyo y por tus palabras de aliento en los momentos más difíciles. A mis tíos María Elizabeth Benítez y Apolinar Figueroa por convertirse en mis segundos padres y por acogerme como su hija, brindándome su comprensión, amor, y un espacio en su hogar. A mis profesores quienes con el mayor profesionalismo compartieron sus conocimientos y amor por la Biología. Al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética por brindarme un espacio para el desarrollo de mi trabajo de grado y por su incondicional apoyo tanto en lo académico como a nivel personal. Gracias a mis amigos y compañeros por estar siempre a mi lado apoyándome para que este sueño se hiciera realidad. Gracias a la población objeto de estudio, porque sin su participación no hubiera sido posible la realización de esta investigación.

Nota de aceptación

Directora. Ph.D Nohelia Cajas Salazar

Jurado. Ph.D Patricia Eugenia Vélez

Jurado. Mg. Nilza Velazco Palomino

Fecha de sustentación: 18 de Diciembre de 2014

RESUMEN

El consumo de cigarrillo se sigue posicionando como una de las principales causas de enfermedad y muerte prevenible a nivel mundial. Para Colombia las muertes ocasionadas por el hábito de fumar ascienden a más de 26 mil personas por año de las cuales alrededor del 28% son atribuidas solo al desarrollo de cáncer. Una estrategia promisoriosa para controlar la epidemia del cáncer producto de exposición ambiental, ocupacional y de estilo de vida, es el uso de biomarcadores de daño genotóxico que faciliten la detección temprana de los primeros estadios de la enfermedad. Los biomarcadores genéticos son ampliamente utilizados para realizar vigilancia epidemiológica a poblaciones expuestas a compuestos tóxicos, entre estos se encuentra el ensayo de micronúcleos (MN) en células exfoliadas de la mucosa bucal, método novedoso, rápido, no invasivo y sensible para evaluar el daño genético ocasionado por la exposición a xenobióticos, como los presentes en el cigarrillo y detectar de forma temprana el riesgo de desarrollar cáncer.

Considerando lo anterior, éste trabajo tuvo como objetivo evaluar la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal en una población de hombres fumadores del departamento del Cauca, como un biomarcador sensible para detectar el daño genético producido por el consumo de cigarrillo. Para lograrlo, se llevó a cabo un estudio tipo cohorte transversal analítico donde se seleccionaron 160 individuos sanos entre las edades de 18 a 40 años, distribuidos en 80 fumadores de cigarrillo y 80 referentes. Para la colección y procesamiento de las muestras se siguió la metodología propuesta por Thomas en el año 2009, la cual sugiere una tinción ADN específica Feulgen-Fast Green con la finalidad de minimizar los falsos positivos obtenidos con otras coloraciones que tiñen los cuerpos queratínicos presentes en las células bucales.

El análisis de los datos mostró una diferencia estadísticamente significativa $p=0.022$ entre la frecuencia promedio de MN en fumadores (0.406 ± 0.546) respecto a los no fumadores (0.244 ± 0.450). Además se encontró una relación lineal positiva ($p<0.001$) entre la frecuencia de micronúcleos y el número de paquetes-años de cigarrillo consumidos. El presente estudio utilizó el método de tinción específico para ADN recomendado a nivel internacional. Gracias a este método se obtuvieron datos confiables que contribuyen a determinar el verdadero efecto genotóxico producido por el consumo de cigarrillo en tejidos blanco. Por lo tanto se determinó que el ensayo de MN en células bucales es un biomarcador sensible para evaluar el daño genético y es una herramienta útil para determinar el riesgo de desarrollar cáncer de la cavidad oral. Además se motiva a la población a evitar el consumo de cigarrillo como estrategia de prevención contra el cáncer y a mejorar los hábitos de estilo de vida y alimentación para minimizar los efectos adversos sobre la salud.

Palabras clave: consumo de cigarrillo, biomarcador, MN en células del epitelio bucal, daño genotóxico

INTRODUCCIÓN

En el mundo hay alrededor de 1.3 billones de fumadores de cigarrillo y en los países en vía de desarrollo los índices de consumo continúan en ascenso (Hecht et al., 2012). El humo del cigarrillo está catalogado como la mayor fuente de exposición a químicos tóxicos, donde hasta el momento se han identificado más de 5.300 compuestos, de los cuales 70 han sido clasificados como mutagénicos y carcinogénicos para el hombre (IARC and WHO 2012). Dentro estos se destacan los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's) y las nitrosaminas (NNK), que al ser metabolizadas por el organismos se transforman en moléculas altamente reactivas capaces de unirse covalentemente al ADN para formar aductos y ocasionar lesiones primarias, que si se reparan mal o no son reparadas provocarán transformaciones en la expresión génica, como mutaciones puntuales en genes importantes en la iniciación de los procesos carcinogénicos (HHS, 2010). El hábito de fumar ha sido evaluado en diferentes estudios epidemiológicos demostrando una relación dosis-respuesta con el 90% de los casos de cáncer de pulmón, del 50 al 70% de cáncer del tracto aerodigestivo y el 30% de otros tipos de cáncer (De Flora and Bartsch, 2012). Por esta razón, el cigarrillo se ha catalogado como uno de los principales factores de riesgo involucrados en el desarrollo del cáncer, donde el 30% de las muertes por esta patología se deben a su consumo (Ministerio de Protección Social, 2010). En Colombia la situación del tabaquismo describe que son diagnosticadas anualmente 10.606 personas para esta patología (Pichon-Riviere et al., 2013). Esta problemática a nivel mundial y nacional resalta la necesidad de promover el desarrollo de estudios de biomonitorio en poblaciones con alto riesgo de desarrollar cáncer, como es el caso de los consumidores de cigarrillo, con la finalidad de formular estrategias de prevención oportunas.

Entre las estrategias más promisorias para la promoción de la salud y prevención de enfermedades como el cáncer, se encuentra el desarrollo de estudios epidemiológicos que implementen el uso de herramientas citogenéticas como los biomarcadores de efecto, que permiten identificar factores de riesgo y evaluar eventos biológicos tempranos asociados a exposición ocupacional, ambiental y de estilo de vida (Bonassi and Au, 2002). El uso de biomarcadores de efecto en los estudios de biomonitorio ha ido incrementando en los últimos años principalmente porque algunos ensayos como alteraciones cromosómicas y micronúcleos en linfocitos de sangre periférica han sido validados como predictores del riesgo de cáncer por su alta sensibilidad para evidenciar el daño genotóxico y citotóxico (Bonassi et al., 2011b; Hagmar et al., 2004), lo que los convierte en una herramienta valiosa para anticiparse al diagnóstico clínico mejorando los controles epidemiológicos de esta patología. Sin embargo en la actualidad la comunidad científica busca la manera de emplear biomarcadores de eventos genotóxicos menos invasivos para el hombre pero igual de eficientes para manifestar inestabilidad cromosómica y evidenciar los eventos iniciales de la carcinogénesis.

Por esta razón en los últimos años un gran número de laboratorios han retomado el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de tejidos epiteliales de boca, nariz y vejiga, por su gran potencial como herramienta en el biomonitorio de poblaciones humanas. Y ha nacido un marcado interés en el estudio de éste biomarcador en las células epiteliales de la mucosa bucal, por su gran capacidad para evaluar el efecto clastogénico y aneugénico producto de la exposición a xenobióticos y principalmente por ser un método mínimamente invasivo, de fácil acceso, económico, y de rápida obtención de resultados (Fenech et al., 2007). Es por esto que recientemente en un esfuerzo internacional surge el proyecto HUMN_{XL}, el cual hace uso específico del biomarcador de MN en células exfoliadas del epitelio bucal y tiene como objetivo la validación de éste biomarcador para poder ser utilizado en los estudios de biomonitorio como un predictor de riesgo de cáncer (Bonassi et al., 2011a). Para lograrlo es necesario que se desarrollen investigaciones que promuevan el uso de éste biomarcador en diferentes poblaciones bajo diferentes condiciones ambientales y de estilo de vida, con el fin de aportar en su proceso de caracterización y futura validación.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, este estudio tuvo como objetivo evaluar la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal en una población de hombres jóvenes adultos consumidores de cigarrillo del departamento del Cauca bajo las condiciones ambientales y de estilo de vida particulares. Los resultados de este estudio tienen como propósito fomentar el uso del biomarcador de MN en células del epitelio bucal en los programas de vigilancia epidemiológica, para que a futuro pueda ser implementado como una herramienta preventiva y de control, que permita detectar rápidamente los primeros eventos biológicos que conllevan al desarrollo de cáncer producto de la exposición ambiental a sustancias altamente tóxicas como las presentes en el humo de cigarrillo. Éste conocimiento, también busca motivar a las entidades gubernamentales de Colombia en general y del Cauca en particular, para diseñar estrategias de prevención y de promoción de la salud efectivas y apropiadas para alertar a la población sobre los efectos nocivos que produce el hábito de fumar y en consecuencia evitar el consumo adictivo de cigarrillo desde edades tempranas como la pubertad y la adolescencia.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de tabaco es uno de los principales problemas de salud pública y uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de cáncer (WHO, 2006). Según las estadísticas publicadas en el Atlas del Tabaco, en el año 2010 se registró un consumo global de 6.3 billones de cigarrillos, en promedio 900 cigarrillos por cada hombre, mujer y niño (Shafey et al., 2010), además se estimó un total de 800 millones de hombres adultos fumadores que habitaban principalmente en países en vía de desarrollo (Eriksen et al., 2012). En Colombia, el Estudio Nacional de Consumo de Sustancias Psicoactivas en el año 2013 determinó que el 12,9% de la población es fumadora, donde el 18.8% fueron hombres y el 7,4% mujeres (Gobierno Nacional de la Republica de Colombia, 2013). En el departamento del Cauca en el año 2008 la prevalencia de fumadores fue de 15.7%, una tasa relativamente alta teniendo en cuenta el número de habitantes y la media nacional para ese mismo año, la cual fue de 17% (MPS and DNE, 2008). Una encuesta realizada en los municipios de Santander de Quilichao, Silvia, El Bordo, El Tambo y Popayán encontró una prevalencia de consumo de cigarrillo entre el 38% y 67% con una edad de inicio para éste hábito de 12 años (Franco and Otero, 2011).

El hábito de fumar está relacionado con la aparición de distintas complicaciones como enfermedades cardiovasculares, respiratorias, defectos al nacer, el desarrollo de cáncer, entre otras (HHS, 2014; Pérez and Pinzón, 2005). Además, es la mayor causa de muerte prematura a nivel global (IARC and WHO, 2004), reduciendo aproximadamente en 10 años la esperanza de vida, de hecho, se considera que ningún otro producto de consumo es tan perjudicial para la salud del hombre y capaz de matar a casi la mitad de sus consumidores (Glynn et al., 2010; Jha and Peto, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud en total 6 millones de personas mueren al año a causa de las patologías relacionadas con el tabaquismo, de las cuales 1,8 millones son ocasionadas por el desarrollo de cáncer que junto a las enfermedades cardiovasculares, constituyen las primeras causas de muerte a nivel mundial (WHO, 2008, 2011). En Latinoamérica el hábito de fumar, es responsable de más de un millón de muertes al año y en Colombia de 72 casos a diario. La mortalidad por cáncer a causa del consumo de cigarrillo es responsable del 81% de las muertes por cáncer de pulmón, 80% por cáncer de laringe, 65% por cáncer de esófago y 62% por cáncer de boca y faringe. Además es el causante de que se diagnostiquen anualmente 29.770 nuevos casos de neoplasias malignas (Pichon-Riviere et al., 2013).

La forma más utilizada de consumo de tabaco a nivel mundial es el cigarrillo, el cual contiene nicotina, un alcaloide que genera adicción y es la razón fundamental por la cual las personas persisten en fumar, lo que permite que sea mucho más difícil abandonar este hábito, a pesar de conocer los efectos adversos que éste produce (Hecht, 2002; Oppeltz and Jatoi, 2011). A nivel toxicológico un gran número de estudios *in vivo*, *in vitro*, y epidemiológicos han demostrado que los componentes

como metales pesados, las nitrosaminas, el benzopireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el cigarrillo, poseen la capacidad de interactuar con el ADN, causando lesiones y mutaciones que favorecen un genotipo maligno (IARC, 2007; Karahalil et al., 1999),. Por esta razón ha sido clasificado en el Grupo 1A por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) en el 2001, como el único carcinógeno para el hombre que ataca el mayor número de órganos posibles, produciendo cáncer de pulmón, laringe, faringe, cavidad oral y nasal, esófago, estómago, páncreas, hígado, riñón, cérvix, vejiga, leucemia entre otros (Smith et al., 2003)

A pesar de que Colombia forma parte del primer Convenio Marco de la Organización Mundial de la Salud para el Control del Tabaco CMCT-OMS y hasta el momento se han implementado muchas de las políticas allí establecidas, como ambientes libres de humo (OMS, 2005), es el país que cuenta con el precio más bajo de la cajetilla en toda Suramérica, favoreciendo la alta demanda del consumo de cigarrillo en todos los estratos socioeconómicos (Pichon-Riviere et al., 2013; Storr et al., 2008). Adicionalmente, factores socioculturales como la influencia de padres y hermanos fumadores, la presión y motivación de amigos, entre otros, conlleva a las poblaciones jóvenes y por ende más vulnerables a iniciar tempranamente el hábito de fumar (Navarro et al., 2012), a su vez los efectos nocivos sobre la salud son asintomáticos y solo mucho tiempo después de iniciado su consumo, la enfermedad aparece en sus estados más avanzados (WHO, 2008), por esta razón, las personas no sienten la necesidad de dejar de fumar.

Frente a lo expuesto anteriormente y las condiciones existentes en la región se hace necesario que se generen estudios de biomonitorio poblacional que involucren técnicas de fácil aplicación, que puedan ser implementados en los programas de salud pública para ayudar a detectar de forma temprana las poblaciones en riesgo de desarrollar cáncer y de esta forma contrarrestar la problemática de la epidemia del tabaco. Por esta razón es que en el presente estudio se planteó la siguiente pregunta de investigación, ¿Se presenta una diferencia significativa en la frecuencia de MN en células epiteliales de la mucosa bucal entre el grupo fumador y el grupo referente?.

2. JUSTIFICACIÓN

El consumo de cigarrillo representa unos de los principales problemas de salud pública por el número de muertes y enfermedades que produce sobre las poblaciones expuestas (IARC, 2013; (Gómez, 2009), por esta razón, se hace necesario continuar con la búsqueda de nuevas herramientas que faciliten la detección temprana de enfermedades malignas como el cáncer y que además permitan evidenciar el riesgo potencial de desarrollar patologías asociadas a su efecto carcinógeno. Es entonces, donde surge el interés por evaluar las células epiteliales de la mucosa bucal, puesto, que son la primera barrera contra todos los agentes exógenos que ingresan al organismo por las vías de inhalación o ingestión. Este tejido tiene la capacidad de absorber los compuestos presentes en el humo de cigarrillo y mediante los procesos metabólicos realizados por las enzimas citocromo P450 son biotransformados a metabolitos activos y especies reactivas de oxígeno capaces de interactuar con las macromoléculas de la célula como el ADN para provocar aductos que generan lesiones como sitios abasicos, rupturas de cadena doble y simple que son precisamente unos de los factores que favorecen la inestabilidad genómica. Por lo tanto, la evaluación de las células del epitelio bucal representa un sitio blanco apropiado para evidenciar los primeros eventos genotóxicos inducidos por compuestos con potencial carcinogénico como los presentes en el humo del cigarrillo (Holland et al., 2008).

Dadas las condiciones que anteceden, la comunidad científica ha retomado el biomarcador de micronúcleos MN en células epiteliales de la cavidad oral, en un estudio colaborativo a nivel mundial, con el fin de realizar las mejoras pertinentes para poder establecer la sensibilidad de éste biomarcador, para detectar poblaciones en riesgo por exposición ocupacional o del estilo de vida, asociados al consumo del tabaco. El número de publicaciones que hacen uso de esta técnica han aumentado mediante la realización de una serie de estudios a nivel mundial, que evalúan diferentes tipos de exposición, donde se pretende determinar la eficacia del biomarcador de MN en células bucales para predecir el riesgo de desarrollar cáncer y de esta forma lograr su validación (Bonassi et al., 2009). Sin lugar a duda el biomarcador de MN en células de la mucosa bucal es una prueba promisoría que debe tenerse en cuenta en el biomonitoreo genético de poblaciones en riesgo (Stich and Rosin, 1984).

Sin embargo, aún es necesario seguir estudiando esta herramienta, donde se identifiquen los factores de confusión que modulan la frecuencia de micronúcleos, puesto que, en ocasiones no permiten realizar de forma efectiva un adecuado análisis estadístico. Las investigaciones formalizadas hasta el momento demuestran que el cigarrillo ocasiona daño a nivel del material genético, pero en el caso del ensayo de MN en células epiteliales de la cavidad oral, existen aún algunas discrepancias en los resultados con respecto al hábito de fumar. Esto se debe a que algunos estudios realizados para este tipo de exposición no presentan la suficiente

población para incrementar la potencia de la prueba, no realizan una tinción específica para ADN y el conteo celular no es el adecuado para evidenciar la sensibilidad del biomarcador, que pueda expresar daño genético en el epitelio bucal (Fenech et al., 2011). Teniendo en cuenta estas referencias reportadas, es pertinente evaluar el biomarcador de micronúcleos en tejido epitelial de la cavidad oral, como herramienta no invasiva, de rápida obtención de resultados y de bajo costo, para analizar las células exfoliadas en personas sanas, fumadoras y, las cuales evidencian el daño que se ocasiona en las células basales; tejido madre sin diferenciar (Thomas et al., 2009)

En base a las anteriores consideraciones, el presente estudio aplicó algunas de estas recomendaciones con el fin de generar conocimiento de calidad que evidencie la sensibilidad del biomarcador para la población joven fumadora del departamento del Cauca. Sumado a esto es de gran importancia el poder determinar la influencia de factores propios del estilo de vida en la población Colombiana y su posible repercusión en la frecuencia de MN en éste tejido blanco. Por eso, se tuvo en cuenta otras variables como: la edad, el consumo de alcohol, consumo de suplementos vitamínicos y la dieta, con el fin de reconocer otros factores de riesgo o factores protectores que puedan verse involucrados en el desarrollo de micronúcleos de la cavidad oral, modulando su frecuencia (Holland et al., 2008).

Cabe agregar, que estos datos serán de gran relevancia para el departamento del Cauca, puesto que, éste estudio de MN en células exfoliadas de la mucosa bucal es pionero para la región, cuyos resultados arrojan nuevas estadísticas de daño genotóxico con respecto al consumo de cigarrillo específico, para estudios del epitelio bucal en la población Caucana. Por éste motivo, el desarrollo de esta investigación es fundamental en el proceso de generación de conocimiento que soporte las políticas de acción que se deben tomar en Colombia, haciendo referencia al consumo de cigarrillo y el desarrollo de neoplasias malignas, teniendo en cuenta que la información disponible es escasa, por lo que solo se conocen marcos referenciales para otros países.

3. HIPÓTESIS

El humo del cigarrillo es una mezcla compleja de compuestos químicos que ingresan al organismo por inhalación. Estos agentes exógenos pueden ser absorbidos por las células epiteliales de la mucosa bucal e interactuar con el material genético para inducir daño clastogénico y/o aneugénico el cual se verá expresado en las células interfásicas en forma de micronúcleos. Por lo tanto se espera que la frecuencia de micronúcleos en las células exfoliadas del epitelio bucal sea significativamente mayor en los individuos consumidores de cigarrillo comparado con el grupo no fumador (H_1), de lo contrario no habrá diferencias en la frecuencia de micronúcleos entre estos dos grupos (H_2).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal en una población de hombres jóvenes consumidores de cigarrillo del departamento del Cauca.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Establecer y comparar la frecuencia de MN entre los individuos no fumadores (grupo referente) y los fumadores de cigarrillo (grupo experimental).

Identificar la asociación de la frecuencia promedio de micronúcleos con respecto al tiempo y a la intensidad de consumo de cigarrillos de los individuos.

Determinar el efecto modulador de la edad, el índice de masa corporal, el consumo de alcohol y la dieta, sobre la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 COMPONENTES DEL HUMO DEL CIGARRILLO

La fabricación del cigarrillo utiliza como materia prima las hojas del tabaco (*Nicotiana tabacum*), éstas se secan y trituran para ser enrolladas en un papel poroso especial hasta formar un cilindro en el cual se ensambla un filtro que está compuesto por acetato de celulosa y papel. En la actualidad se utiliza menos tabaco por cigarrillo, gracias a las nuevas tecnologías que incorporan tabaco expandido (con dióxido de carbono, metano o isopentano) o tabaco reconstituido agregando amonio. Adicionalmente a las hojas de tabaco se le pueden agregar una variedad de 600 aditivos para variar su aroma y sabor. Por lo tanto la composición química del humo cigarrillo va a depender directamente de la mezcla de tabaco y de los componentes ajenos a él, como el papel del cigarrillo, el adhesivo del punto de unión, los aditivos y saborizantes, de la tinta del monograma, de la presencia o no de filtro y de su eficiencia para retener partículas tóxicas, del material plastificador del filtro y sus adhesivos. Adicionalmente los plaguicidas aplicados en los cultivos de tabaco pueden penetrar en las hojas y tallos de planta, por lo tanto los residuos gasificados de estos plaguicidas quedan presentes en el humo de cigarrillo (Borgerding and Klus, 2005; López-Antuñano, 2013).

Las hojas del tabaco contienen muchos químicos alcaloides, uno de los principales es la nicotina que se encuentra en altas concentraciones en la planta. Actualmente los cigarrillos contienen en promedio de 10 a 15 mg de nicotina, de los cuales solo el 10% es absorbido sistémicamente por el organismo, de 1 a 2 mg/cigarrillo. (Benowitz and Henningfield, 2013). La nicotina después del proceso de combustión se encuentra en un estado no protonado volátil, lo que le confiere la habilidad para atravesar fácilmente la membrana celular hasta llegar a los pulmones donde su pH le facilita su rápida absorción, para luego dirigirse al sistema circulatorio hasta llegar al cerebro. Parte estructural de la molécula de la nicotina es similar a la acetilcolina un importante neurotransmisor cerebral, por lo tanto ésta se une de igual forma a los receptores nicotínicos colinérgicos provocando que las neuronas liberen grandes cantidades de dopamina. Sin embargo a largo plazo la exposición prolongada a la nicotina no genera la misma estimulación ya que las neuronas reaccionan de forma menos inmediata por lo que la necesidad de fumar se hace cada vez mayor. Por esta razón la nicotina es considerado el principal factor de adicción y dependencia en el humo del cigarrillo (Benowitz, 2010).

Además de la nicotina, el humo de cigarrillo contiene una mezcla compleja de más de 5.300 compuestos químicos los cuales se reparten en dos grandes fases: la particulada y la gaseosa. En la primera fase más conocida como el alquitrán se destacan compuestos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, los fenoles, cresoles, catecoles, carbazoles, el benzo(a)pireno, anilinas, naftalina, tolueno, "brea", hidracina, trazas de metales pesados como el cadmio, cromo, níquel,

arsénico y productos radioactivos como el polonio 210, entre otros. En la fase gaseosa se encuentran el nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, los acetaldehídos, formaldehídos, amonio, acroleínas, óxido de nitrógeno, nitrosaminas, hidracinas, propano, piridina, butano, cloruro de vinilo entre otros (Pasupathi et al., 2009; Talhout et al., 2011). Existe suficiente evidencia que indica que más de 70 de estos compuestos han sido clasificados en el Grupo 1 por ser altamente mutagénicos y carcinogénicos para el hombre (IARC, 2002; IARC and WHO, 2012), además se ha determinado que por cada cigarrillo fumado ingresan al organismo entre 1 a 3 mg de carcinógenos (Borgerding and Klus, 2005). Uno de los carcinógenos que más se destacan son las N-nitrosaminas específicas del tabaco [TSNAs], las cuales son derivados de la nicotina después del proceso de combustión. Estas incluyen las NNK, N-nitrosornicotina [NNN], N-nitrosoanabasina [NAB], N-nitrosoanatabina [NAT], entre otras y son reconocidas como altamente carcinogénicas para los seres humanos porque intervienen específicamente en los procesos tumorgénicos (IARC, 2007; Xue et al., 2014).

5.2 METABOLISMO DEL HUMO DEL CIGARRILLO

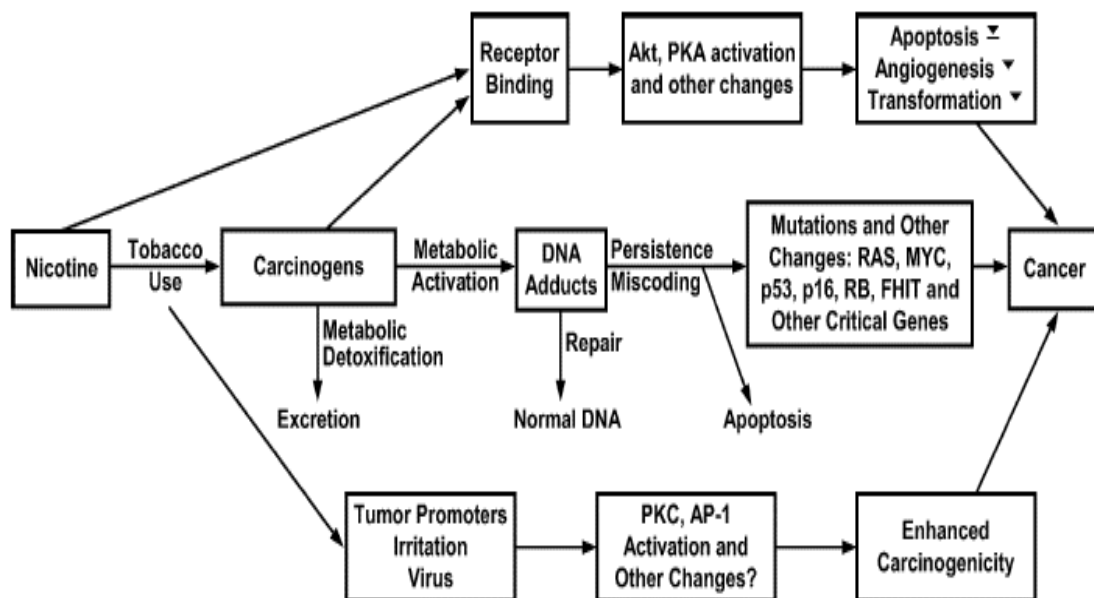
La gran mayoría de los xenobioticos presentes en el humo del cigarrillo son metabolizados en el hígado, sin embargo se ha demostrado que las células pulmonares y las células epiteliales de la cavidad oral también tienen la capacidad para desempeñar procesos metabólicos (Nagaraj et al., 2006; Ruiz et al., 2004; Schlage et al., 2014).

Como se dijo anteriormente el humo del cigarrillo está compuesto por una gran cantidad de químicos tóxicos los cuales ingresan al organismo por inhalación en estado gaseoso. Cuando estos compuestos llegan a las vías respiratorias y son absorbidos por la célula, se comportan como sustratos para las enzimas metabólicas, tales como las presentes en la supefamilia citocromo P450 (CYP) de la fase I y fase II y las enzimas epóxido hidrolasas, glutatión transferasas, UDP-glucuronil transferasas, sulfotransferasas entre otras. Estas se encargan de catalizar su conversión a compuestos más solubles en agua para facilitar el proceso de detoxificación y excreción. Sin embargo un gran número de estos xenobióticos sufren transformaciones que resultan en la formación de moléculas intermediarias como las especies reactivas de oxígeno (EROs) que pueden llegar a ser mucho más reactivas que las iniciales. Por lo tanto estos metabolitos reactivos son capaces de unirse covalentemente a los sitios nucleofílicos del material genético, como los átomos de nitrógeno y oxígeno de las bases nitrogenadas, para formar aductos en ADN. Estas lesiones pueden ser corregidas por los diferentes mecanismos de reparación, pero si el error de codificación persiste, la célula puede tomar dos caminos, inducir la muerte celular (apoptosis) o continuar en las fases del ciclo celular, de ser así al momento de llevarse a cabo el proceso de replicación, las ADN polimerasas catalizarán la inserción de una base equivocada opuesta al aducto.

Esto resulta en mutaciones permanentes en genes críticos que promueven el fenotipo maligno, como la inactivación de los genes supresores de tumor p53 y la activación de oncogenes tales como KRAS, genes involucrados directamente en el desarrollo de neoplasias malignas (ver figura 1) (Hecht, 2012; Wogan et al., 2004).

Adicionalmente compuestos como la nicotina y las nitrosaminas específicas del tabaco [TSNAs], pueden unirse directamente a ciertos receptores, conduciendo a la activación de los factores reguladores celulares como los AKT, resultando en una disminución de los procesos apoptóticos y un incremento en la angiogénesis y la transformación celular. Estos eventos modulan los procesos carcinogénicos aumentando los efectos de los carcinógenos y la formación de aductos en el ADN. Sumado a esto, diferentes agentes promotores de tumor y co-carcinógenos, en conjunto con la presencia de virus o irritaciones (ej. Cavidad oral), pueden intervenir con otros factores ocasionando cambios que incrementan la carcinogenicidad (ver figura 1) (Wogan et al., 2004).

Figura 1. Esquema de los diferentes procesos celulares que desencadenan el desarrollo de cáncer producto de la exposición al humo del tabaco.



Fuente: (Wogan et al., 2004)

5.2.1 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas altamente reactivas debido a los electrones no apareados en su última capa de valencia, en estos se incluyen los radicales libres, iones de oxígeno y peróxidos. Las moléculas más reconocidas son los radicales; hidroxilo (HO), anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales alcoxilo (RO) entre otros. Estas especies se generan de forma habitual en el organismo, mediante los procesos del metabolismo basal, respiración celular, los ciclos de oxidación microsomales y durante los procesos inflamatorios. Sin embargo diferentes factores exógenos como los presentes en el humo del cigarrillo pueden sufrir ciclos de óxido-reducción que incrementan esta generación natural produciendo un desequilibrio entre la cantidad de moléculas oxidantes frente a las antioxidantes. Por lo tanto los organismos que se encuentran sometidos de forma continua a la producción excesiva de EROs, pierden la homeostasis celular, lo que genera estrés oxidativo. Éste desequilibrio provoca consecuencias negativas sobre la salud como: envejecimiento celular, enfermedades neurodegenerativas, desarrollo de cáncer entre otras (Klaunig et al., 2011; Kryston et al., 2011).

Los daños más comúnmente ocasionados por las EROs y su relación con el desarrollo de cáncer son: rupturas de cadena, modificaciones oxidativas de las bases, sitiosapurínicos y apirimidínicos, deleciones, pérdida de expresión o síntesis de proteínas, activación de genes oncogenes y desactivación de genes supresores de tumor, represión de genes que codifican factores reguladores de transcripción entre otros. Se calcula que el humo de cigarrillo contiene una intensidad de radicales libres de 10^{14} en la fase particulada y 10^{15} en la fase gaseosa (Pasupathi et al., 2009). Por lo tanto el humo del cigarrillo es uno de los principales factores que promueven el desequilibrio de las reacciones redox. Uno de los daños más conocido producto del estrés oxidativo es el aducto 8 dehydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), el cual incrementa su tasa de formación en un 35 a 50 % en personas fumadoras. (Reuter et al., 2010; Ziech et al., 2010; Ziech et al., 2011). Además, se ha demostrado que los radicales libres producidos durante la auto-oxidación de los polifenoles en la saliva de los fumadores, son cruciales para la iniciación y promoción del cáncer oral, faringe, laringe y esófago. Por lo tanto se ha observado que el humo del cigarrillo genera oxidación del glutatión (GSH; un antioxidante común conocida para proteger contra el daño de ROS), disminuye los niveles de los antioxidantes en sangre y aumenta la liberación de radicales superóxido (Ziech et al., 2011).

5.3 PROCESO CARCINOGENÉTICO

Las lesiones y daños antes mencionados, producto del metabolismo y de la interacción de las especies reactivas de oxígeno presentes en el humo del cigarrillo

con el material genético, son los primeros eventos y el factor iniciador en los procesos carcinogénicos. Por lo tanto si estas lesiones primarias no son reparadas, pasan a ser mutaciones que inicialmente provocan una elevada capacidad de proliferación celular. Este proceso continúa con la expansión clonal selectiva, más conocida como la etapa de promoción, donde un promotor estimula el crecimiento de las células que ya están iniciadas. Este aumento descontrolado de células puede ocasionar que se acumulen innumerables alteraciones genéticas ocasionando más malignidad (conversión), promoviendo el ciclo para dividirse con más rapidez y por lo tanto acumular más mutaciones. De esta forma, las células desarrollan características mucho más agresivas, hasta formar el tumor maligno (progresión), el cual, si no es tratado a tiempo, puede alcanzar a invadir otros tejidos por fuera del tumor iniciando el proceso metastásico (Karin Klimo et al., 2010; Oliveira et al., 2007). Muchas de las especies reactivas de oxígeno intervienen y promueven el proceso carcinogénico en sus tres etapas. Se ha encontrado que el estrés oxidativo puede modular el potencial redox de la célula y modificar su expresión génica y por lo tanto participa en la fase de promoción de tumores (Klaunig et al., 2011).

Es por esto que el humo de cigarrillo es el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversos tipos de cáncer, principalmente con los diferentes tipos histopatológicos de cáncer de pulmón, existiendo evidencias consistentes que indican su causalidad hasta en un 87% de los casos (Hecht, 2002). Además el hábito de fumar también se ha asociado con el desarrollo de cáncer de la cavidad oral y su riesgo se incrementa cuando este se combina con el consumo de alcohol, produciendo un efecto aditivo para esta patología (Ogden, 2005). Del mismo modo se relaciona con cáncer de laringe, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, cáncer de esófago, estómago, hígado, páncreas, vejiga, ceno, cervix, carcinomas renales, cáncer colorectal, leucemia mieloide entre otros (Hecht, 2003).

5.4 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

El paso de la epidemiología clásica a la epidemiología molecular hizo posible la verificación de teorías antes planteadas con respecto a la relación ambiente-hombre-enfermedad. La epidemiología molecular combina las herramientas de la epidemiología clásica, como las historias de casos, cuestionarios y vigilancia de la exposición, con las técnicas sensibles de laboratorio a nivel biológico, molecular y genético. El desarrollo tecnológico y la implementación de biomarcadores en la epidemiología molecular, hicieron posible la evaluación de enfermedades multifactoriales como el cáncer para poder definir su etiología y entender los mecanismos mediante los cuales los individuos llegaban a desarrollar esta patología. Mediante pruebas moleculares y citogenéticas los científicos lograron enfrentarse al reto de reconocer los posibles factores de riesgo que se enmarcan en el desarrollo de las neoplasias, con el fin de mejorar la calidad de vida de las

poblaciones vulnerables, realizando diagnósticos mucho más tempranos, y mejores alternativas de tratamientos (Collins, 1998; Spitz and Bondy, 2010).

Sumado a esto la epidemiología molecular no solo se encarga de definir los factores que implican un riesgo para determinada población, sino que además permite identificar la susceptibilidad genética a nivel individual y poblacional y los mecanismos que intervienen en la inducción de la enfermedad. Por lo tanto los biomarcadores permiten estudiar las interacciones entre exposición ambiental, ocupacional, de estilo de vida y la susceptibilidad genética con el fin de esclarecer los sucesos del cáncer humano y de esta forma contribuir a la formulación y diseño de estrategias de prevención que alerten a las poblaciones en riesgo de desarrollar cáncer (Perera and Weinstein, 2000).

5.5 BIOMARCADORES

Los biomarcadores han sido definidos como cambios a nivel celular, molecular, bioquímico, fisiológico o morfológico, que pueden ser medidos en diferentes sistemas o muestras biológicas y son aplicados a un gran número de estudio. Estos son capaces de evaluar la interacción entre un sistema biológico y el medio ambiente ya sea físico, químico o biológico, por lo tanto juegan un papel importante en la detección temprana de factores que representan riesgo para la salud del hombre (Manno et al., 2010). Los biomarcadores, dependiendo de su significancia toxicológica se han clasificado en tres categorías:

5.5.1 Biomarcador de exposición. Permiten medir la exposición a diferentes agentes exógenos para determinar su biodisponibilidad y evaluar el potencial de éstos sobre la salud de los organismos. Estos biomarcadores son sensitivos y específicos para un tipo de exposición, se valora la dosis interna determinando el agente o subproductos de biotransformación en medios biológicos (Aitio and Kallio, 1999). Existen dos tipos de biomarcadores de exposición: Los que miden cuantitativamente el químico o agente y sus metabolitos en algún fluido biológico, o los que miden el cambio bioquímico temprano reversible en un fluido biológico que refleje la exposición (Lowry, 1995).

5.5.2 Biomarcador de susceptibilidad. Es un indicador de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica. Mediante análisis moleculares se pueden determinar los cambios genéticos que le confieren a un individuo una ventaja o desventaja al exponerse a diferentes factores ambientales, ocupacionales o de estilo de vida. Cuando estos cambios se presentan en más del 1% de la población se denominan genes polimórficos. En la mayoría de los casos se evalúan genes que intervienen en diferentes procesos metabólicos, de reparación del ADN, en la activación o desactivación de oncogenes y protooncogenes. Un claro ejemplo de este

biomarcador son los polimorfismo en los genes encargados de la activación química y detoxificación (GSTM1,GSTT1) dependiendo si el gen es homocigoto o heterocigoto, podrá expresarse o no para cumplir su función (Norppa, 2004b).

5.5.3 Biomarcador de efecto. Son indicadores biológicos en respuesta a una exposición, muestran los efectos tempranos producidos en los organismos los cuales pueden generar consecuencias negativas sobre la salud (Bonassi and Au, 2002). Estos biomarcadores son sensibles para evaluar un tipo de daño puntual, los más destacados son los biomarcadores citogenéticos los cuales son ampliamente utilizados en el biomonitoreo de poblaciones a nivel biológico, con la finalidad de identificar los daños ocasionados en el material genético (ADN) por exposición a agentes exógenos. Los biomarcadores que han sido ampliamente usados hasta la fecha son el test de alteraciones cromosómicas (AC), la prueba de micronúcleos (MN) y (HPRT) en células somáticas (Tucker and Preston, 1996). El test de micronúcleos ha sido uno de los biomarcadores más utilizados en el biomonitoreo poblacional, ya que permite identificar los compuestos que son potencialmente mutagénicos y/o carcinogénicos para el hombre, y de esta forma explica la formación de los procesos de que llevan al desarrollo de cáncer (Fenech, 2002a) .

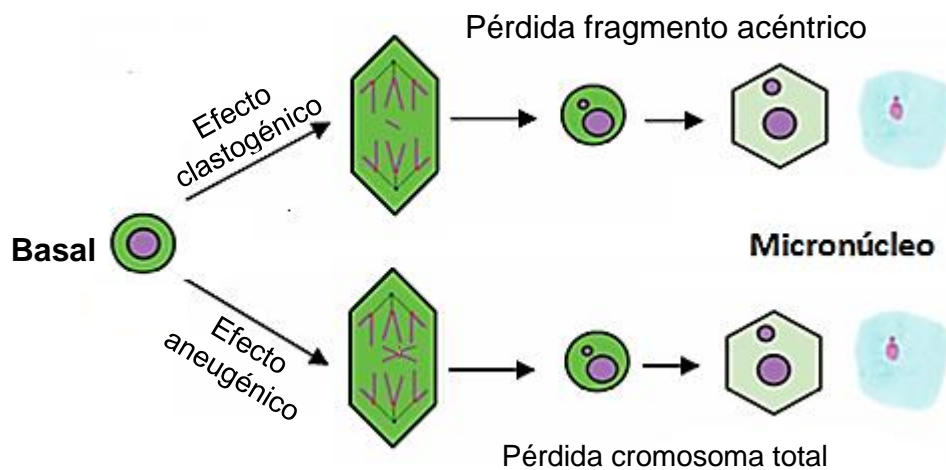
5.6 BIOMARCADOR DE MICRONÚCLEOS

Los micronúcleos (MN) están formados por fragmentos acéntricos o cromosomas rezagados dentro del citoplasma, que al momento de la formación del núcleo madre quedan excluidos de éste, pero de igual forma son encapsulados por membrana nuclear, lo que lo hace morfológicamente idéntico e indistinguible del núcleo principal, exceptuando su notable tamaño reducido que corresponde a la tercera o dieciseisava parte del núcleo principal. La formación de micronúcleos es un evento natural que ocurre con poca frecuencia en las células, sin embargo diferentes factores externos o propios del organismo pueden incrementar los niveles basales (Bonassi et al., 2007; Fenech, 2006; Tucker and Preston, 1996). Con ayuda del microscopio de luz y una tinción adecuada los MN pueden observarse como núcleos accesorios en células interfásicas permitiendo por medio de su conteo medir la interacción y el efecto nocivo de la exposición crónica a diferentes compuestos que incrementan su número, lo que se interpreta como un mayor riesgo de enfermedad como por ejemplo el desarrollo de cáncer (Murgia et al., 2008). Los micronúcleos se puede observar en casi cualquier tipo de célula, y por esta razón existen muchas variaciones del ensayo (Tucker and Preston, 1996).

5.6.1 Mecanismos de formación de los MN. Durante la división celular, el material genético contenido en el núcleo se replica y divide equitativamente para dar lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso puede ser entorpecido por estrés oxidativo, exposición a clastógenos o anéugenos, defectos genéticos en los puntos de chequeo del ciclo celular, la ineficiente reparación de lesiones, o el mal

funcionamiento de los procesos metabólicos y de detoxificación. Los agentes aneugénicos actúan directamente inhibiendo la polimerización de la proteína que forma los microtúbulos del huso acromático denominada tubulina, lo cual repercute en la migración de los cromosomas hacia los polos en la telofase y por tanto en la formación de células aneuploides (ver figura 2). Es decir, que puede quedar uno o más cromosomas rezagados a la hora de la repartición del material genético en las células hijas, por tanto la información genética queda incompleta y la célula será incapaz de cumplir sus funciones de forma correcta. Por otra parte existen agentes clastogénicos que actúan directamente sobre la cromatina, ocasionando rupturas cromosómicas o cromatídicas las cuales generan fragmentos acéntricos de cromosomas (sin centrómero), que de igual forma, al momento de la segregación las células hijas tendrán como resultado el material genético incompleto (ver figura 2) (Bonassi et al., 2007).

Figura 2. Mecanismos de formación de los micronúcleos



Fuente: (Salazar, 2014)

5.6.2 Biomarcador de MN como predictor de riesgo de cáncer. En los últimos años las publicaciones que hacen uso del biomarcador de MN en linfocitos de sangre periférica incrementaron notoriamente, principalmente en los estudios de biomonitorio poblacional. Este notable interés de la comunidad científica hizo posible la consolidación del Programa Internacional de Micronúcleos Humanos (HUMN), un proyecto colaborativo a nivel internacional de más de treinta laboratorios que surgió con el objetivo de identificar las variables metodológicas que influyen la frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos humanos, para minimizar los factores de confusión del ensayo y proponer un protocolo estándar

(Fenech et al., 2007). De esta forma se pudo realizar un estudio prospectivo por parte de los laboratorios implicados, con 6.718 sujetos, provenientes de 10 países, donde se encontró un incremento significativo en la incidencia de diferentes tipos de cáncer para los sujetos en los grupos con una frecuencia media y alta de micronúcleos. Este hallazgo permitió finalmente validar el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica como un biomarcador para predecir el riesgo de desarrollar cáncer (Bonassi et al., 2007). Además numerosos estudios encontraron una elevada frecuencia de MN en pacientes que presentaban diferentes tipos de cáncer y que e incluso se encontraba una disminución significativa después de recibir tratamiento contra el cáncer (Bonassi et al., 2011b). Adicionalmente, estudios realizados en individuos con enfermedades congénitas propensas al cáncer como síndrome de Bloom y ataxia-talangiectasia, mostraron altos índices de MN. Existen muchas evidencias que soportan la relación de los agentes carcinogénicos con el aumento de MN tanto en animales como en humanos, por ejemplo, el benceno, el tabaco, los pesticidas entre otros. También se ha asociado la frecuencia de MN con la concentración de vitaminas y folato en sangre, donde sus deficiencias, sumadas a malos hábitos y una genética desfavorable, se relacionan con el desarrollo de cáncer. Todos estos descubrimientos sin lugar a duda dejan en claro la relación causal entre un aumento de la frecuencia de MN y el cáncer (Fenech et al., 2003; Fenech et al., 1999; Murgia et al., 2008).

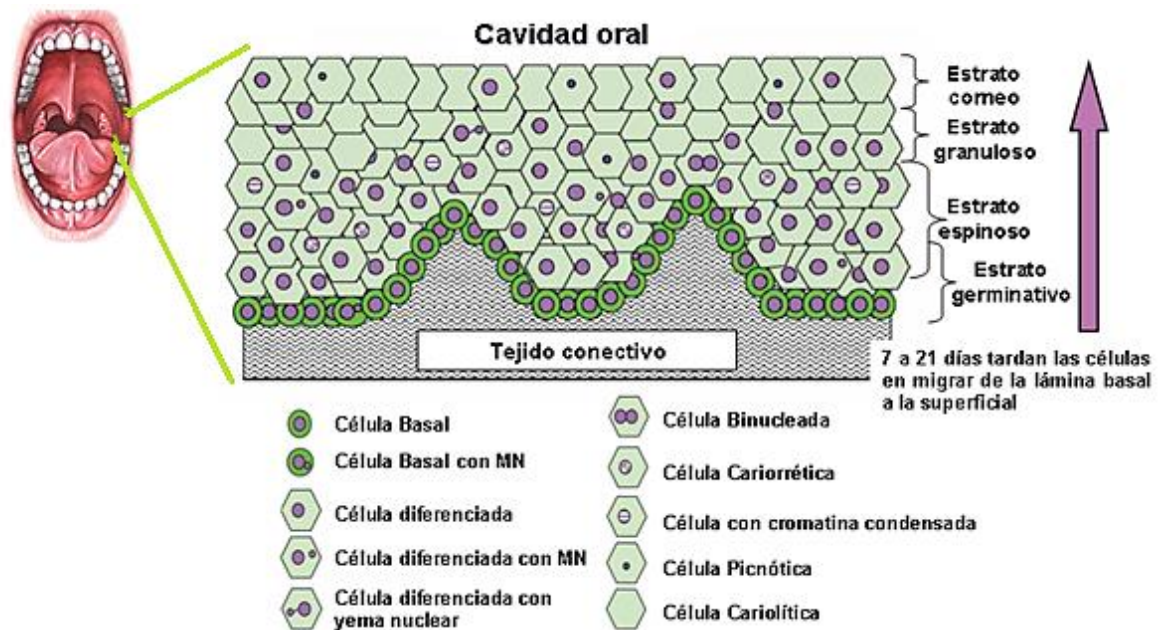
5.7 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS BUCALES

El ensayo de MN en humanos además de ser valorado en linfocitos de sangre periférica puede evaluarse en eritrocitos, en células epiteliales exfoliadas, nasales, bucales, cervicales uroteliales, también en muestras de esputo y algunas biopsias, algunos de estos métodos puede resultar más invasivo que otros pero todos dejan dilucidar la utilidad en la detección de daño genético producto de exposiciones ambientales, ocupacionales o de estilo de vida (Holland et al., 2008). Este ensayo fue desarrollado por Stich y Rosin (1982), quienes ejecutaron la técnica con éxito proponiendo éste biomarcador como un nuevo enfoque para determinar los efectos genotóxicos en tejidos diana para numerosos carcinógenos. El biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal es recientemente uno de los más utilizados a nivel de monitoreo poblacional (Thomas et al., 2009), porque es un método mínimamente invasivo y de rápida obtención de resultados debido a que las células epiteliales de la cavidad bucal se encuentra en constante división y no necesario que sean inducidas para entrar en ciclo de división celular ex vivo. Este tejido se renueva constantemente porque sus células van migrando desde las capas basales hasta se exfoliadas por lo tanto estas células reflejarán el daño que está ocurriendo en las capas basales (células madre) (Bonassi et al., 2011a; Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009; Tolbert et al., 1992)

El tejido epitelial de la cavidad oral es una barrera que se expone a diario a un gran número de compuestos que ponen en riesgo la estabilidad del genoma, como el consumo de cigarrillo, alcohol, sustancias psicoactivas, el uso prolongado de medicamentos, una mala alimentación, exposición a gases, infecciones por virus y bacterias, entre otros, los cuales logran interactuar con la célula y generar alteraciones como los micronúcleos. Esto implica que la cavidad oral es un órgano blanco que tiene la capacidad de activar pro carcinógenos para ser transformados en sus especies reactivas las cuales son las que finalmente interactúan con el material genético desencadenando descontroles de crecimiento y acumulación de malignidad que facilitan los procesos carcinogénicos que culminan con la formación de tumores (Holland et al., 2008; Kashiyap and Reddy, 2012).

El tejido de la cavidad oral presenta una estructura que comprende 3 grandes estratos básicos: el tejido conectivo o lámina propia, el estrato germinativo, y la población de células maduras. En la capa basal o estrato germinativo se encuentran las células madre capaces de transformarse en células epiteliales, y es aquí donde se expresa el daño genético (rupturas cromosómicas o pérdida de cromosomas) el cual se manifiesta en la formación del MN durante la división nuclear. Las células progenitoras con o sin MN se van a diferenciar, formando el estrato espinoso, granuloso y corneo que finalmente será cubierto por una superficie de queratina que lo protege, para así luego ser exfoliadas. Este proceso de transformación puede tardar entre 7 a 21 días (Holland et al., 2008) (ver figura 3).

Figura 3. Estratificación y migración de las células de la cavidad oral



Fuente: modificado de (Thomas et al., 2009)

Estas células además pueden sufrir otro tipo de transformaciones degenerativas, como necrosis, apoptosis, condensación de la cromatina, pérdida completa del material nuclear (células cariolíticas), núcleo fragmentado (células cariorréticas) o células picnóticas. En algunos casos pueden presentarse también células binucleadas por bloqueos en la división celular y puentes nucleoplásmicos indicadores de amplificación génica (ver figura 3). Todos estos biomarcadores de daño genético y muerte celular pueden ser analizados utilizando la misma metodología propuesta para evaluar los MN y proporcionan una evaluación mucho más completa del efecto citotóxico y citostático (Holland et al., 2008)

5.8 PROYECTO HUMN_{XL}

El proyecto de micronúcleos humanos en células exfoliadas de la mucosa bucal (HUMN_{XL}), surge como una rama del proyecto HUMN evaluado en linfocitos de sangre periférica, en consenso con varios laboratorios, los cuales consideraron pertinente involucrarse en el proceso de desarrollo de este biomarcador para poder analizar poblaciones en riesgo. Este proyecto de igual forma reúne un incansable equipo con la única meta de lograr la validación del biomarcador en células epiteliales de la mucosa bucal como un predictor de riesgo de cáncer. Este proceso podrá lograrse cuando se identifiquen los factores de confusión que modulan la frecuencia de MN. Por lo tanto el proyecto HUMN_{XL} se embarca en un largo camino, que en poco tiempo ha logrado dimensionar la potencia de la prueba, su efectividad, sensibilidad, sus bajos costos e indudablemente su fácil accesibilidad debida a la no invasividad (Fenech et al., 2011).

Éste proyecto pretende explorar la variabilidad del ensayo entre laboratorios, en el conteo de MN, y diferencias intra e interindividuales comparando por medio de reportes hechos por cada laboratorio las diferencias entre los protocolos los cuales podían evidenciar un foco de confusión a la hora de realizar el conteo de MN, como por ejemplo tinciones no específicas para DNA. De esta forma se pretende llegar a un consenso donde se plantee el protocolo más favorable para la técnica, que logre resolver las falencias antes presentadas. Culminada esta etapa se tendrán en cuenta los análisis estadísticos realizados por cada laboratorio para definir los factores de confusión como, edad, género, consumo de alcohol y cigarrillo, ingesta dietaria entre otros y su influencia sobre la frecuencia de MN para que a la hora de realizar un estudio sean tomadas en cuenta todas las variables involucradas en la modulación del promedio de MN (Ceppi et al., 2010).

6. ANTECEDENTES

Hasta el momento, son numerosas las investigaciones que se han encargado de evidenciar el efecto del consumo de tabaco en cualquiera de sus presentaciones y su nocividad para la salud humana (HHS, 2010, 2014; IARC, 2007; IARC and WHO, 2004, 2012; Shafey et al., 2010; WHO, 2011). Principalmente estudios *in vitro*, *in vivo* y epidemiológicos han focalizados sus esfuerzos para demostrar la íntima relación entre el consumo de cigarrillo y el desarrollo de cáncer (DeMarini, 2004; Hecht, 2006; Kufe et al., 2003; Vineis et al., 2004). Los biomarcadores citogenéticos como Alteraciones Cromosómicas (AC), Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y Micronúcleos (MN), han sido ampliamente utilizados para este propósito y han logrado establecer que el hábito de fumar produce daños y mutaciones a nivel del material genético, por tal razón se han adoptado como una herramienta útil para el monitoreo de poblaciones en riesgo a desarrollar enfermedades relacionadas con este tipo de lesiones, como el cáncer (Bonassi et al., 2003; Norppa, 2004a). En la actualidad se retoma el biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal para evaluar el efecto del consumo de cigarrillo y otros productos derivados del tabaco. Sin embargo, los resultados encontrados hasta el momento a nivel internacional son contradictorios, algunos autores coinciden con un incremento significativo en la frecuencia de MN bucales en fumadores, otros establecen un efecto solo a niveles elevados de consumo de cigarrillo y unos no han evidenciado diferencia estadísticamente significativa al comparar fumadores y referentes (ver tabla 1). Otros estudios han evaluado este mismo biomarcador en fumadores empleando tinciones no específicas para ADN encontrando todos un incremento en la frecuencia de MN (ver tabla 2). Estas inconsistencias en los resultados no han permitido establecer la eficacia del biomarcador para demostrar el efecto genotóxico producido por el tabaquismo. Adicionalmente para Colombia, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada a la fecha, no existen publicaciones que relacionen el biomarcador de MN en células de la mucosa bucal con el hábito de fumar, sin embargo este tipo de exposición si ha sido evaluada mediante otros biomarcadores de efecto. Por ejemplo el biomonitorio realizado mediante el ensayo de MN en linfocitos de sangre periférica en una población joven fumadora de la ciudad de Barranquilla, donde se estableció que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo fumador y el referente, pero al categorizar por intensidad de consumo se encontró que los consumidores de más de 7.5 paq-años si tuvieron un incremento significativo en comparación con los demás grupos (Rico et al., 2010). El segundo estudio se llevó a cabo en una población joven del departamento del Cauca, donde se demostró el efecto genotóxico del consumo de cigarrillo mediante el ensayo de alteraciones cromosómicas (Arboleda et al., 2004).

Tabla 1. Estudios epidemiológicos de corte transversal en fumadores de cigarrillo y masticadores de tabaco, que analizaron el biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal haciendo uso de la tinción ADN específica Feulgen-Fast Green

Referencia	Biomarcador	Estudio	N	Tinción	Resultados
(Stich and Rosin, 1983)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Consumo de cigarrillo y alcohol 30 cig/día	Fum=36 Ref=15	Feulgen	Incremento no significativo para el hábito de fumar pero si para la variable combinada fumar+alcohol
(Sarto et al., 1987)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo y cigarro	Fum=25 Ref=25	Feulgen	La frecuencia de MN en células bucales fue estadísticamente significativa en fumadores cuando se comparó con el grupo referente
(Piyathilake et al., 1995)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo 20 paq/años Deficiencia de vitaminas	Fum=39 Ref=60	Feulgen negativo	Frecuencia de MN aumento significativamente en fumadores
(Konopacka, 2003)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo al menos 10 al día	Fum=50 Ref=70	Feulgen	Frecuencia de MN aumento significativamente fumadores
(Wu et al., 2004)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo <20 cig/día >20 cig/día Masticadores de areca	Fum=32 Mast=25 Masfum=24 Ref=60	Feulgen	No relación significativa para los fumadores de <20cig/día, relación significativa para los fumadores de >20cig/día Los fumadores y masticadores presentaron la frecuencia de MN más alta
(Bohrer et al., 2005)	MN en células epiteliales en piso, labio y borde de la lengua	Cigarrillo ≥10 cig/día por más de 10 años o >20 cig/día por al menos un año Alcohol 1 vaso todos los días	Fum=28 Fumalc=19 Ref=21	Feulgen	Si hubo un incremento en los tres sitios pero no fue significativo
(Nersesyan et al., 2011)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo >20 paq/años evaluó cuatro tipos de cigarrillo	Fumadores ULF=18 LF=25 RF=25 SF=15 Ref=20	Feulgen	Solo se encontró un incremento significativo para los fumadores de cigarrillos sin filtro.
(Zamani et al., 2011)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas MN en células epiteliales de vejiga MN en linfocitos de sangre periférica	Cigarrillo >de 1 paq/día Tiempo de consumo >5 años >5paq/años	Fum=15 Ref=15	Feulgen	Incremento significativo de MN en células epiteliales bucales de vejiga y en linfocitos en fumadores con respecto al grupo referente

(Naderi et al., 2012)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo Tiempo de consumo >10 años <10 años	Fumadores >10 años=26 <10 años=14 Ref=23	Feulgen	Significativo cuando se compararon los dos grupos de fumadores con el grupo referente
(Chandrasekar et al., 2014)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas y en linfocitos de sangre periférica Alteraciones cromosómicas Ensayo cometa Análisis de polimorfismos genéticos	Cigarrillo, cigarrillo bidi y masticadores de tabaco. Tiempo de consumo 5 a 10 años >10 años Media de consumo 10 cig/día	Fum=58 Mast=91 Masfu=34 Ref=183	Feulgen	Incremento significativo en fumadores para MN en células bucales y sangre periférica cuando se comparó con el grupo control Significativo incremento en el largo de la cola cuando se comparó con el grupo control

Fum, fumadores; Mast, masticadores de tabaco; Masfu, masticadores de tabaco y fumadores; ULF, fumadores de cigarrillo con filtro ultra-ligero; LF, fumadores de cigarrillo con filtro ligero; RF, fumadores de cigarrillo con filtro regular; SF, fumadores de cigarrillo sin filtro; Ref, referentes.

Tabla 2. Estudios epidemiológicos de corte transversal en fumadores de cigarrillo y masticadores de tabaco, que analizaron el biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal haciendo uso de las tinciones ADN no específica.

Referencia	Biomarcador	Estudio	N	Tinción	Resultados
(Ayarde et al., 2008)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Consumo de cigarrillo y altura sobre el nivel del mar	Fum=77 Exfum=15 Ref=108	Giemsa	Se encontró un incremento para la frecuencia de MN en células bucales
(Palaskar and Jindal, 2010)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo Fumar todos los días >80 paq/año Tiempo >5 años Masticadores de tabaco >4 paq/día	Fum=15 Mast=15 Ref=15	Papanicolau - May Grünwald Giemsa	Incremento significativo para la frecuencia de MN en fumadores y masticadores cuando se comparó con el grupo referente
(Bansal et al., 2012)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo ≥20 cig/día Tiempo >5 años Masticadores ≥5 paq/día Tiempo >5 años	Fum=25 Mast=25 Ref=25	Papanicolau	Incremento significativo para la frecuencia de MN en fumadores y masticadores cuando se comparó con el grupo referente

(Jindal et al., 2013)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas AgNORs	Cigarrillo bidi 5-20 cig/día Consumo de alcohol 50-500ml/día Tiempo 5-10 años	Fum=25 Alco=25 Alcfum=25 Ref=25	Naranja de acridina AgNORs	Solo se encontró un incremento significativo para la frecuencia de MN en fumadores y para la variable combinada fumadores+alcohol comparado con el grupo referente. La media de AgNORs fue significativamente mayor solo en la variable combinada cuando se comparó con fumadores y consumidores de alcohol
(Nefić et al., 2013)	MN y anomalías en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo Media 17 cig/día Tiempo Media 7 años	Fum=60 Ref=60	Acetorceina 2%	Incremento significativo para la frecuencia de MN, puentes nucleares células picnoticas, cariolíticas y cariorreticas en células bucales cuando se comparó con el grupo referente.
(Caplash et al., 2013)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Consumo de cigarrillo, bidi y masticadores de tabaco	Fum=26 Mast=28 Mastfu=11 Ref=50	May Grünwald Giemsa	Incremento significativo para la frecuencia de MN en células bucales al comparar fumadores tanto de cigarrillo como bidi con el grupo referente.
(Sharma et al., 2013)	Anomalías nucleares en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Consumo de cigarrillo, alcohol y masticadores de tabaco	Fum=100 Alco=100 Mast=100 Alcfum=100 Alcmas=100 Mastfu=100 Almafu=100 Ref=100	Papanicolau	Se encontró un incremento significativo para la frecuencia de MN y otras anomalías nucleares en relación a todos los hábitos cuando se comparó con el grupo control
(Kamath et al., 2014)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Cigarrillo <5 cig/día 5-10 cig/día <10 cig/día Tiempo <5 años 5-10 años >10 años	Fum=50 Ref=50	Papanicolau	Incremento estadísticamente significativo para la frecuencia de MN bucales en el grupo fumador con respecto al grupo referente. Los fumadores de más de 10 cig/día tuvieron una mayor frecuencia de MN en comparación al resto de categorías al igual que el grupo que fumó por un tiempo entre 5 y 10 años
(Pradeep et al., 2014)	MN en células epiteliales bucales cara interna de las mejillas	Consumo de cigarrillo, masticadores de bete-quad y fumadores, masticadores de tabaco	Fum=45 Mast=45 Mastfu=45 Ref=45	Giemsa	La frecuencia de MN fue significativamente mayor para los tres grupos de consumo de tabaco cuando se comparó con el grupo referente

Fum, fumadores; Exfum, exfumadores; Mast, masticadores de tabaco; Masfu, masticadores de tabaco y fumadores; Alco, consumidores de alcohol; Alcfum, fumadores y consumidores de alcohol; Alcmas, masticadores de tabaco y consumidores de alcohol; Almafu, consumidores de alcohol, fumadores y masticadores de tabaco; Ref, referentes.

7. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio se llevó a cabo empleando un monitoreo genético observacional de tipo corte transversal analítico, en una población fumadora de cigarrillo del departamento del Cauca y su respectivo grupo control. Se analizó la frecuencia de MN presentes en las células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal, con el fin de establecer la sensibilidad del biomarcador para expresar el efecto genotóxico producto de este tipo de exposición en esta población bajo sus condiciones particulares.

7.2 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

Inicialmente, se realizó una motivación personalizada a cada uno de los individuos que conformaron la población objeto de estudio, argumentando el propósito de la investigación, sus objetivos, metodología y su importancia en la prevención de enfermedades asociadas al consumo de cigarrillo específicamente el desarrollo de cáncer. Una vez finalizada ésta etapa, los sujetos procedieron a firmar el consentimiento informado en el cual se declaró de manera formal que participarían de forma voluntaria y que tienen conocimiento del estudio y el procedimiento de recolección de la muestra (ver anexo A). Concluida esta fase, el grupo de estudio respondió una amplia encuesta que enfatizó en características puntuales como historia personal, problemas de salud a nivel personal y familiar, variables relacionadas con el hábito de fumar, como el tiempo de consumo (años), número de cigarrillos consumidos por día, tipo y marca del cigarrillo, consumo de alcohol, tipo y frecuencia, hábitos alimenticios, entre otras especificaciones (ver anexo B).

Para este estudio fue incluida una población de 160 individuos con las siguientes características: hombres jóvenes adultos entre los 18 y 40 años de edad, distribuidos en dos grandes grupos de 80 fumadores y 80 no fumadores. Se tuvieron en cuenta como criterios de inclusión: que todos los individuos fueran sanos; que el grupo de fumadores tuviera un tiempo mínimo de consumo de 2 años y que el grupo referente nunca hubiera consumido cigarrillo. Ninguno de los participantes debió estar expuesto a otro tipo de agentes como el consumo de sustancias psicoactivas, agentes químicos y radiaciones de forma ocupacional, y en los últimos 2 años no haber estado expuestos a rayos x; el consumo de alcohol se tuvo en cuenta a la hora de hacer el análisis estadístico, sabiendo que este posee un efecto aditivo con respecto al cigarrillo y que sería muy difícil excluirlo del estudio, debido a su alto índice de consumo en la población objeto de estudio. El diseño pareado fue indispensable en este tipo de estudio donde se tuvo un expuesto por cada referente, teniendo en cuenta edad la edad y la etnia.

7.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE MUCOSA BUCAL

Se recomendó a los participantes del estudio tener una previa higiene oral en el momento de la toma de la muestra, para evitar la contaminación con restos de comida u otros elementos contaminantes. La mucosa bucal se recolectó realizando un frotis en la parte interna de ambas mejillas de cada individuo con la ayuda de un cepillo citológico estéril durante dos minutos. Cada cepillo se introdujo en un tubo FALCON estéril de 15ml, lleno previamente con 5ml de buffer para células bucales para facilitar el desprendimiento de la muestra y formar una suspensión celular. Luego se agregaron 3ml de fijador SACCOMANNO'S para conservar las células intactas hasta ser procesadas en el laboratorio, sin sobrepasar un tiempo mayor a las dos horas. Cada tubo fue codificado para mantener la confidencialidad de los datos de los voluntarios.

7.4 PROCESAMIENTO DE CÉLULAS BUCALES

En el laboratorio, los tubos con las muestras de mucosa bucal fueron sometidos a una primera centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos, en la cual se obtuvo el botón celular y un sobrenadante que fue descartado en su totalidad con ayuda de una pipeta pasteur esterilizada. Luego se agregaron 5ml de buffer para células bucales (0.01 M Tris HCl, 0.1 M EDTA y 0.02 M NaCl-pH de 7.0), específico para eliminar Dnasas, remover bacterias y restos de células presentes en la cavidad oral y se adicionaron 20 μ L (Thomas et al., 2009) que facilitó la separación de las células. La muestra se resuspendió con la pipeta durante 5 minutos y de nuevo fueron llevadas a la centrifuga, bajo las mismas condiciones. Igualmente se retiró el sobrenadante y se agregaron 5ml de buffer para células bucales y 30 μ L de DMSO, se resuspendió muy bien la muestra hasta que se obtuvo una suspensión celular homogénea, y se repitió una vez más este último procedimiento. Cuando ya se obtuvo el precipitado final se retiró todo el sobrenadante, y se agregó una pequeña cantidad de metanol al 80% resuspendiendo de nuevo la muestra. En cada placa rotulada se hizo un extendido de suspensión celular con ayuda de la pipeta pasteur, con la finalidad de abarcar toda el área del portaobjetos. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se fijaron en metanol al 80% durante 20 minutos, después de retiradas se dejaron secar temperatura ambiente durante 8 horas.

7.5 COLORACIÓN DE LAS PLACAS

Para la coloración de las placas se siguió el protocolo propuesto por Thomas y Fenech (2009) con algunas variaciones, donde se sugiere el uso de la tinción diferencial y ADN específica Feulgen-Fast Green. Primero las placas fueron

sumergidas en un coplin con etanol al 50% durante un minuto, seguido por un minuto en etanol al 20%. Luego las placas se lavaron por 2 minutos en un coplin con agua MilliQ y se eliminó el excedente de agua con papel absorbente. Después las placas se introdujeron en un coplin con ácido clorhídrico 5M durante 45 minutos y se retiró el excedente sumergiéndolas en un coplin con agua de chorro por 3 minutos. Posteriormente se escurrieron las placas, pero no hasta secar. Enseguida se introdujeron en un coplin con colorante Shiff a temperatura ambiente durante 2 horas y media, en oscuridad. Luego se retiraron y se lavaron en un coplin con agua destilada tibia hasta retirar todo el excedente de colorante y el agua saliera clara. Después se sumergieron en un coplin con agua Milli Q durante 2 minutos, para así ser introducidas en el último coplin con colorante Fast Green donde se dejaron de uno a tres segundos y fueron lavadas de nuevo con abundante agua MilliQ. Por último las placas se dejaron secar a temperatura ambiente por un día completo y se fijaron con Xilol para luego ser cubiertas con un cubreobjetos.

7.6 CONTEO Y CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MN EN LAS CÉLULAS BUCALES

Todas las placas fueron visualizadas con un microscopio de transmisión bajo el lente de 40X, pero cuando se presentó la sospecha de MN se analizaron con el lente de 100X con aceite de inmersión. El registro de MN se llevó a cabo contando 1000 células por placa, dos placas por tubo para un total de 2000 células por individuo. Los datos fueron reportados, como el número de MN presentes en 1000 células. Los Micronúcleos fueron determinados bajo la metodología propuesta por Tolbert et al. (1992) para células bucales. La frecuencia fue estimada basada en el número de células exfoliadas normales: células bien separadas, buena coloración, con un núcleo y citoplasma completo. El tamaño del MN debe ser menor a 1/3 del diámetro del núcleo principal, debe encontrarse en el mismo plano de foco y presentar la misma coloración, textura y refracción que el núcleo madre. Además debió tener una forma redondeada u oval y estar claramente separado del núcleo principal. Los MN que fueron cuestionables, debido a que no cumplían con alguna de las anteriores especificaciones, fueron descartados.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recolectados en la encuesta individual y los resultados obtenidos en el registro de micronúcleos en el laboratorio, fueron ingresados a una base de datos mediante el programa SPSS versión 11 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL), con el cual posteriormente se realizó el análisis estadístico.

En el presente estudio, la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal se clasificó como una variable dependiente cuantitativa discreta, y fue sometida a prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si el conjunto de datos seguía o no una distribución normal. El valor de significancia p encontrado fue menor a 0.05, por lo tanto se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que la distribución de la frecuencia de MN no cumplió con el supuesto de normalidad dentro de la población de estudio. Sin embargo se realizó la transformación de datos mediante diferentes fórmulas de acuerdo al recomendado según el sesgo de los datos, con la finalidad de buscar su normalidad, pero no se logró ajustar. Además se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para la variable dependiente y la independencia de datos Rachas, teniendo en cuenta los dos grupos fumador y referente.

Estos resultados permitieron determinar, que el análisis estadístico que debía llevarse a cabo era mediante pruebas no paramétricas. Por consiguiente, para evaluar variables cuantitativas nominales, como el hábito de fumar y el consumo de bebidas alcohólicas se hizo uso de la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes, para determinar la existencia de diferencias significativas al compararse con la variable cuantitativa discreta MN; para las variables cualitativas ordinales categorizadas de tiempo de consumo, paquetes-años, y la variable combinada consumo de cigarrillo y alcohol se hizo uso de la prueba de Kruskal Wallis para K muestras independientes. Además para las variables cuantitativas como el tiempo en años de consumo, la intensidad de consumo, la edad, el índice de masa corporal se empleó el análisis estadístico mediante la prueba de correlación Rho de Spearman.

Como la variable consumo de bebidas alcohólicas no tuvo una distribución homogénea entre los dos grupos, se realizó el análisis combinado, hábito de fumar consumo de bebidas alcohólicas.

Todos los resultados fueron analizados con un nivel de significancia menor a 0.05 y fue utilizado como criterio para rechazar la hipótesis nula (H_0) con un intervalo de confianza de 95%.

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN

En la tabla 1 se muestran las características demográficas y de estilo de vida de la población de estudio. Se encuestaron y recolectaron las muestras de células bucales de 160 hombres, 80 expuestos (fumadores) y 80 referentes (no fumadores) según los criterios de inclusión y exclusión descritos. Todos los participantes del estudio fueron de nacionalidad colombiana, nacidos en el departamento del Cauca, residentes de la ciudad de Popayán y de raza mestiza. Los individuos del grupo referente no estuvieron expuestos a humo de segunda mano. Los individuos fumadores y no fumadores fueron colectados en centros universitarios, oficinas, almacenes de comercio, en el comando de policía del Cauca y en lugares concurridos de la ciudad, como el parque Caldas. El 72.5% del total de la población tuvo una formación universitaria y el 27.5% una formación básica. El emparejamiento por edad se realizó teniendo en cuenta una diferencia máxima de ± 1 año y la edad promedio para los dos grupos fue de 26.75 años.

Con respecto al hábito de fumar, se encontró que el promedio de la edad de inicio de consumo de cigarrillo fue los 17 años de edad, con un rango de edad de 10 a 34 años. La población fumadora presentó un promedio de consumo de 8 cigarrillos diarios, equivalente a 0.4 cajetillas-día. El tiempo promedio de consumo de cigarrillo fue de 9.4 años, con un rango de exposición de 2 a 30 años. La intensidad promedio de consumo de cigarrillo fue de 4.14 paquetes-años calculada mediante el producto del número de cajetillas al día por los años de consumo. Todos los individuos del grupo expuesto consumieron cigarrillos con filtro, en su mayoría de las marcas Marlboro y Boston con una prevalencia de 41% y 40% respectivamente y en menor cantidad las marcas Green, Kool y Piel Roja con una prevalencia de consumo del 19%.

Los individuos fumadores presentaron un consumo de bebidas alcohólicas 1.3 veces mayor que los no fumadores, siendo más frecuente el consumo de aguardiente y cerveza. Los grupos fumador y no fumador no presentaron diferencias estadísticamente significativas para las variables índice de masa corporal, consumo de frutas y verduras y el estrato socioeconómico.

Tabla 3. Características demográficas y de estilo de vida de la población objeto de estudio

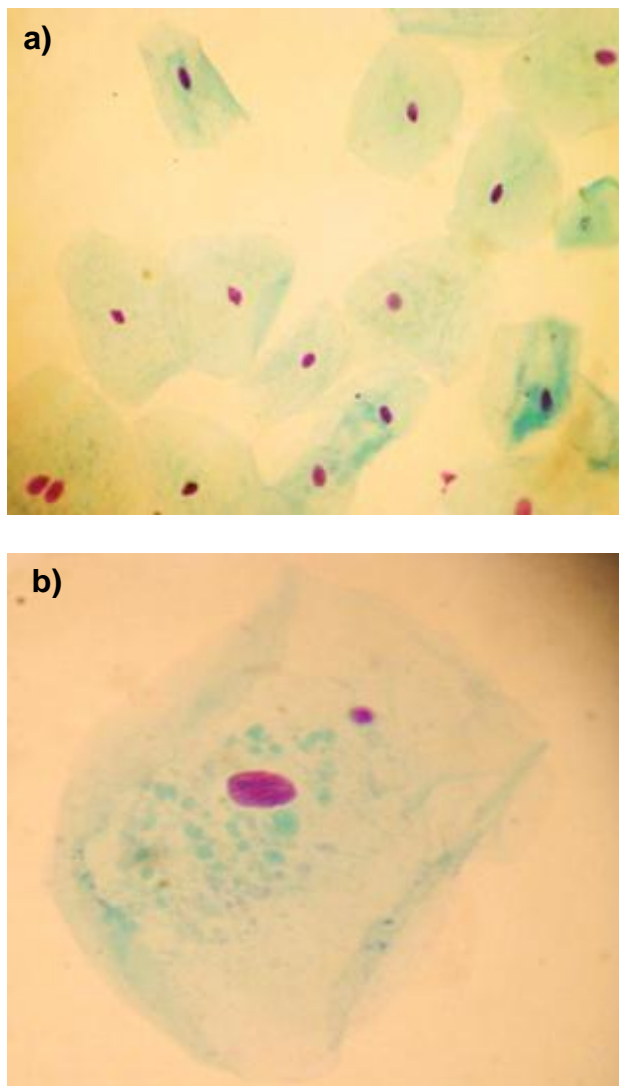
Variables	Fumadores N (%)	No fumadores N (%)	Valor- P
Sujetos (hombres)	80 (100)	80 (100)	
Raza Mestiza	80 (100)	80 (100)	
Edad (años) Media \pm D.E. (Rango)	26.75 \pm 6.35 (18-40)	26.75 \pm 6.33 (18-40)	1.000 ^b
Años de consumo de cigarrillo Media \pm D.E. Rango	9.37 \pm 6.48 (2-30)	0	N.A
Paquetes de cigarrillo-día Media \pm D.E. Rango	0.40 \pm 0.27 (0.10 – 1.20)	0	N.A
Consumo de bebidas alcohólicas Si No	75 (93.7) 5 (6.3)	58 (72.5) 22 (27.5)	<0.001 ^a
Índice de masa corporal (kg/m ²) Media \pm D.E. Rango	23.92 \pm 3.83 (17.05-30.11)	23.01 \pm 3.29 (16.97-33.98)	0.063 ^b
Consumo de frutas No consume 1- 6 porciones semanales \geq 7 porciones semanales	11 (13.8) 36 (45) 33 (41.2)	3 (3.7) 40 (50) 37 (46.3)	0.082 ^a
Consumo de verduras No consume 1- 6 porciones semanales \geq 7 porciones semanales	2 (2.5) 26 (32.5) 52 (65)	9 (11.3) 28 (35) 43 (43.7)	0.068 ^a
Estrato socioeconómico Bajo (1 y 2) Medio (3) Alto (4 y 5)	21 (26.3) 43 (53.7) 16 (20)	27 (33.7) 32 (40) 21(26.3)	0.219 ^a

^a Análisis mediante la prueba de Chi-cuadrado^b Análisis mediante la prueba t de Student

8.2 EFECTO DEL CONSUMO DE CIGARRILLO SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS

El efecto genotóxico del consumo de cigarrillo se determinó analizando la frecuencia de micronúcleos en 2000 células exfoliadas de la mucosa bucal por individuo (Ver figura 4). La frecuencia se reportó como la distribución media de micronúcleos en 1000 células \pm la desviación estándar.

Figura 4. Imagen de células diferenciadas exfoliadas del epitelio bucal con tinción Feulgen-Fast Green bajo el microscopio de luz. a) Células normales magnificadas con el objetivo 40X y b) Célula con micronúcleo magnificada con el objetivo 100X.



En la tabla 2 se describen las variables relacionadas con el consumo de cigarrillo, la frecuencia de MN y el valor de significancia calculado con un índice de confianza de 95%. El grupo de individuos fumadores presentó una frecuencia de micronúcleos de 0.4 ± 0.54 , dos veces mayor que los individuos no fumadores ($p=0.022$) (Ver figura 5). En lo referente a la intensidad de consumo de cigarrillo, primero se calculó el coeficiente de correlación Rho de Spearman donde se observó una significativa asociación positiva $p < 0.001$ entre la frecuencia promedio de MN y el número de paquetes-años de consumo de cigarrillo ($r_s=58.5\%$). Además mediante el coeficiente de determinación (R^2) se pudo inferir que la variabilidad observada entre el promedio total de micronúcleos se debe en un 24.5% a la variabilidad en el número de paquetes-años como se muestra en la figura 6. Adicionalmente la variable número de paquetes-años de consumo de cigarrillo se estratificó en tres rangos, bajo, medio y alto y se determinó su efecto sobre la frecuencia de MN, donde los dos últimos rangos de exposición mostraron un incremento en el promedio de MN con respecto al grupo referente, pero solo fue estadísticamente significativo ($p=0.001$) en el rango alto > 4 paquetes-años (Ver tabla 2).

Tabla 4. Efecto del consumo de cigarrillo sobre la frecuencia de micronúcleos en células bucales.

Variables	Número de MN/ 1000 células bucales		
	Media \pm D.E	N	P
Hábito de fumar			
Fuma	0.40 ± 0.54	80	0.022 ^a
No fuma	0.24 ± 0.45	80	
Número de paquetes-años			
Bajo (<2)	0.13 ± 0.28	31	<0.001 ^b
Medio (2-4)	0.28 ± 0.37	21	
Alto (> 4)	$0.82 \pm 0.62^*$	28	
Tiempo de consumo			
< 10 años	0.26 ± 0.44	45	0.002 ^b
> 10 años	$0.58 \pm 0.61^{**}$	35	

^aAnálisis mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

^bAnálisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

* $P < 0.001$ cuando se compara con el número promedio de MN 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

Figura 5. Frecuencia de micronúcleos en 1000 células según el hábito de fumar

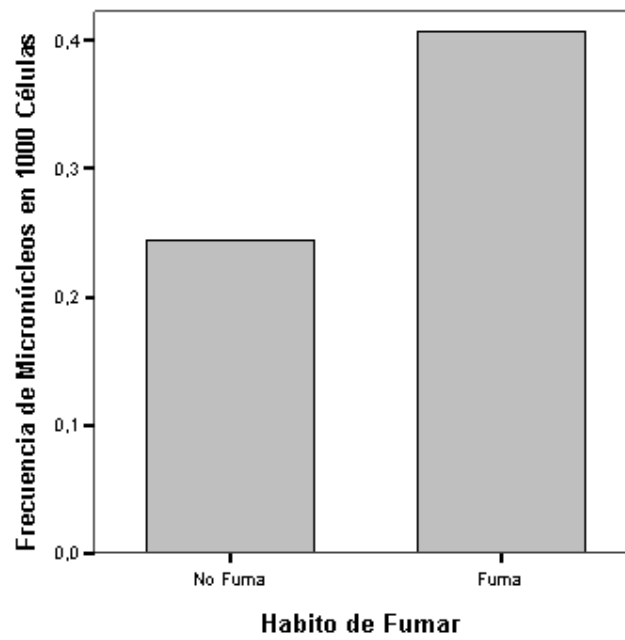
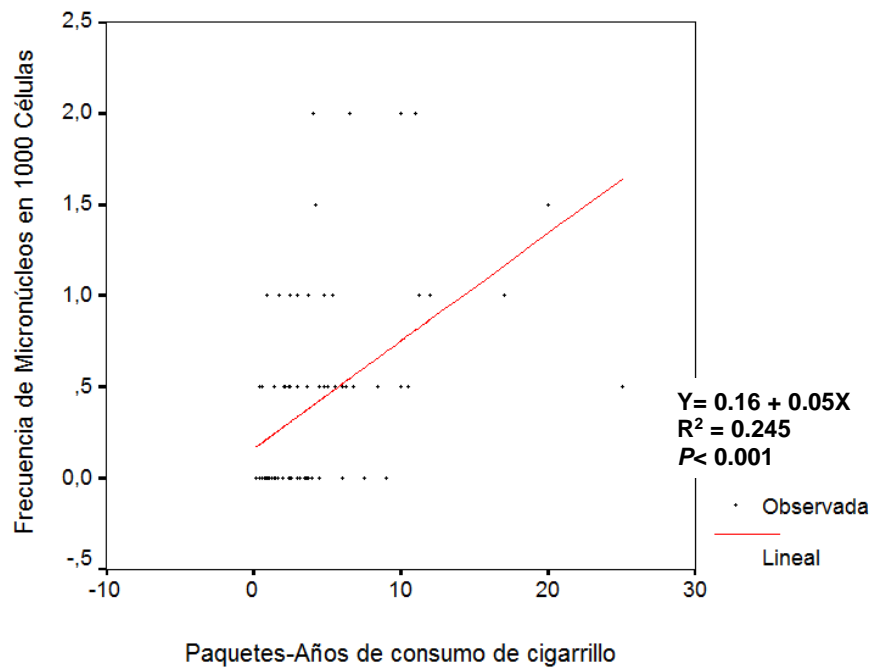
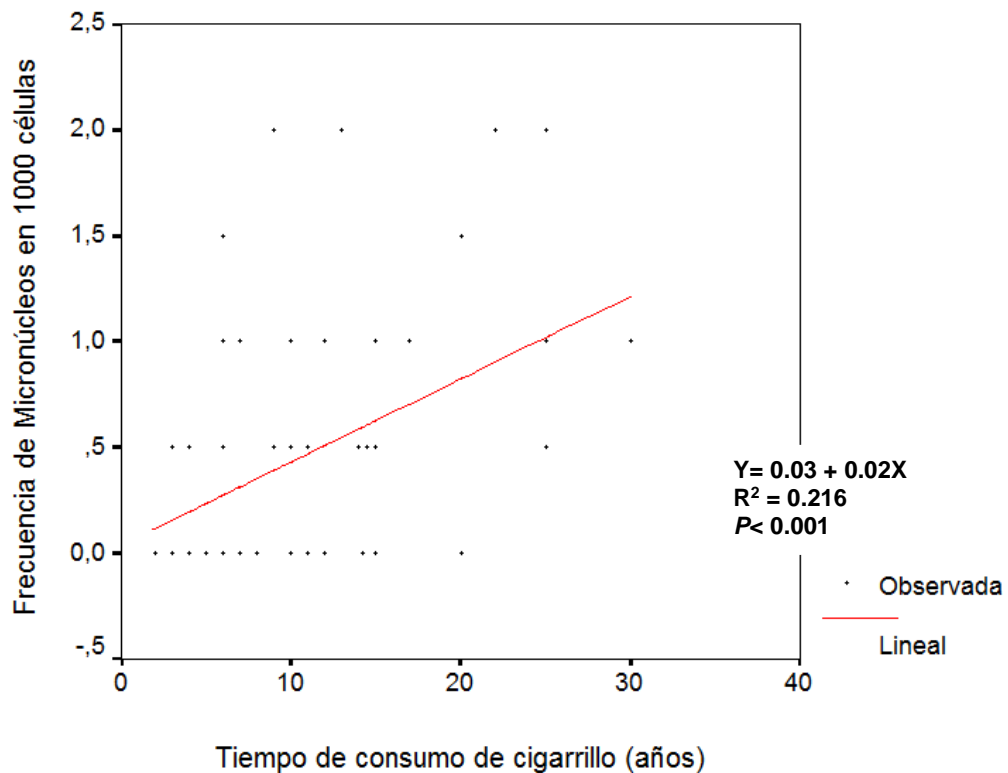


Figura 6. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y el número de paquetes-años de consumo de cigarrillo



Con el objetivo de analizar el efecto del tiempo de consumo de cigarrillo en años sobre la frecuencia de micronúcleos, se calculó el coeficiente de correlación Rho de Spearman y se evidenció una asociación positiva estadísticamente significativa de $r_s = 44,6\%$ ($p < 0.001$) entre estas dos variables. La figura 7 muestra la tendencia lineal del tiempo de consumo de cigarrillo con respecto al promedio total de MN y explica mediante el coeficiente de determinación que la variabilidad en la frecuencia de MN se debe en un 21.6% a la variabilidad en el tiempo de consumo ($p < 0.001$). Teniendo en cuenta estos resultados se estratificó la población de fumadores en dos grupos así: aquellos que presentaron un consumo menor a 10 años y los que presentaron un consumo mayor a 10 años, observándose un incremento estadísticamente significativo $p = 0.002$ cuando éste último se comparó con el grupo referente y con el grupo con un consumo menor a 10 años (Ver tabla 3).

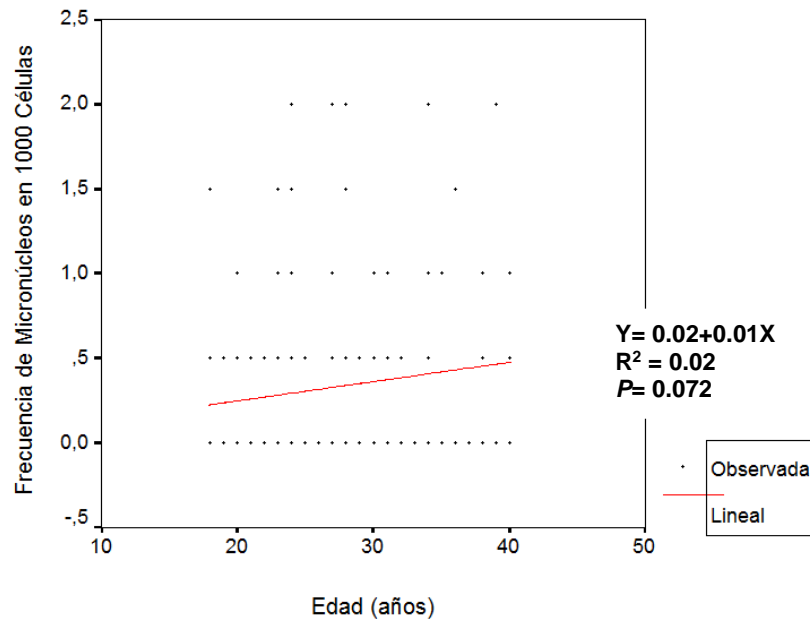
Figura 7. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y el tiempo de consumo en años



8.3 EFECTO DE LA EDAD SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS

El análisis de correlación Rho de Spearman determinó que la edad de los individuos no está asociada con el aumento o disminución de la frecuencia de micronúcleos en células bucales ($p= 0.10$). En la figura 8 se observa una tendencia lineal, donde la variabilidad en la frecuencia de MN se explica en un 2% a la variabilidad en la edad, pero esta relación fue no significativa $p=0.072$.

Figura 8. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y la edad de la población total.



Al ser éste valor marginalmente significativo, se realizó adicionalmente el análisis de asociación entre la edad y la frecuencia de MN para cada grupo por separado expuesto y referente con el fin de establecer si el efecto de la edad se incrementa en presencia de la exposición. Mediante el análisis de regresión lineal se observó que la variabilidad de la frecuencia de MN del grupo referente se explica en un 3% a la variabilidad en la edad pero esta tendencia lineal no fue significativa $p=0.128$ (ver figura 9). Por el contrario al realizar el mismo análisis para el grupo expuesto la tendencia lineal fue significativa $p<0.001$, donde la variabilidad en la frecuencia MN se explica en un 21.5% a la variabilidad en la edad (Ver figura 10), aunque este valor de significancia no pudo atribuirse directamente al efecto de la edad sobre la frecuencia de MN si no al efecto del tiempo de exposición, porque mediante el análisis de correlación Rho de Spearman se determinó que para el presente estudio estas dos variables se encontraron altamente relacionadas, demostrando que a mayor edad mayor tiempo de exposición (Ver tabla 3 y figura 11).

Figura 9. Análisis de correlación lineal entre el número MN en 1000 células del epitelio bucal y la edad del grupo referente.

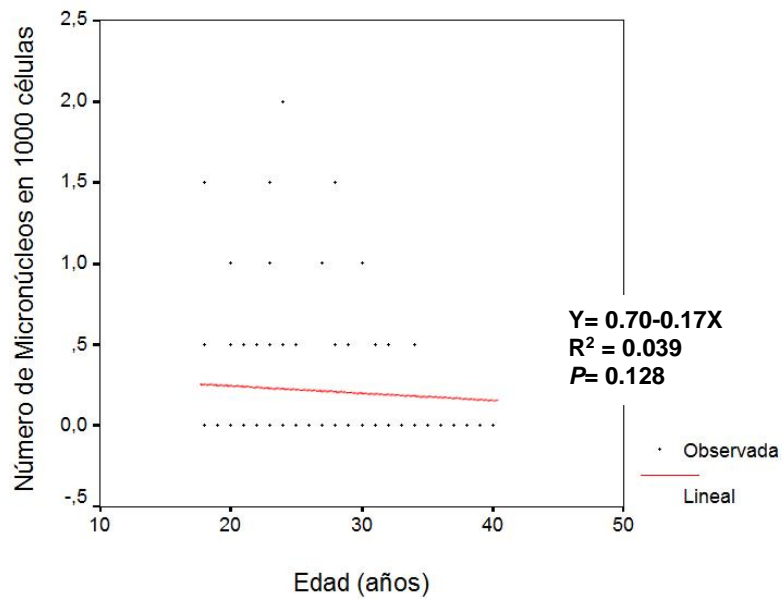


Figura 10. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y la edad del grupo expuesto.

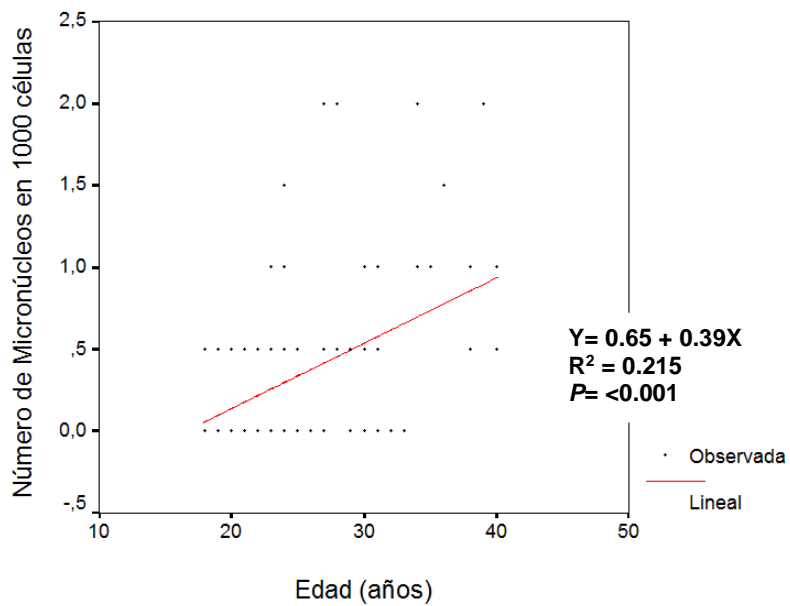
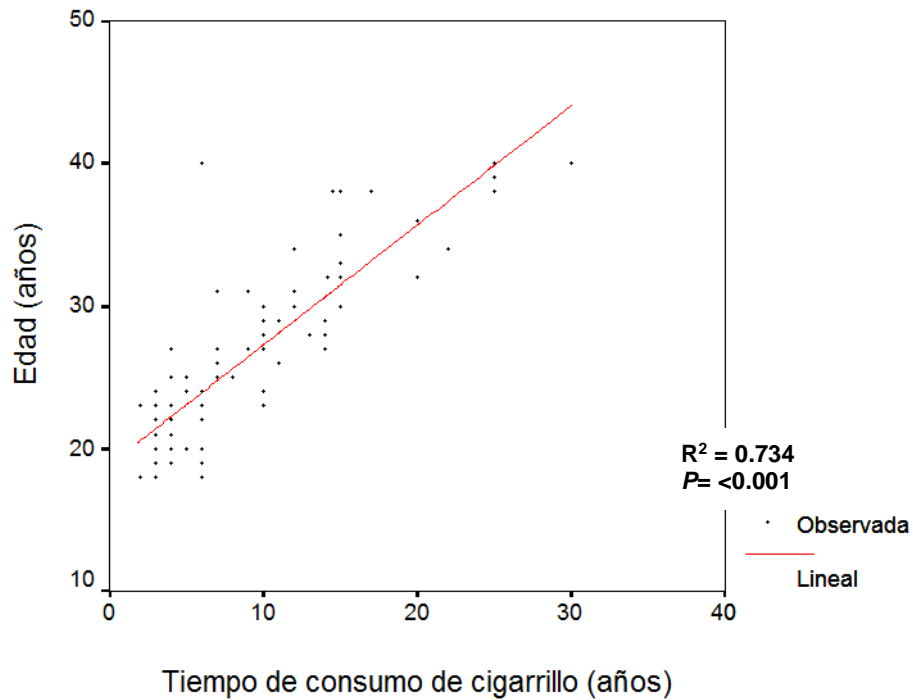


Tabla 5. Análisis de correlación Rho de Spearman entre la edad, el tiempo de consumo de cigarrillo y la frecuencia de Micronúcleos en 1000 células

		Tiempo de consumo de cigarrillo (años)	Frecuencia de MN/1000 células
Edad (años)	N	80	80
	Sig,(bilateral)	<0.001	<0.001
	Coefficiente de correlación	0.869**	0.431**
Tiempo de consumo de cigarrillo (años)	N	80	80
	Sig,(bilateral)	-	<0.001
	Coefficiente de correlación	1	0.446**

** La correlación es significativa a nivel 0,01 (bilateral)

Figura 11. Análisis de correlación lineal entre el tiempo de consumo de cigarrillo en años y la edad del grupo expuesto.



8.4 EFECTO DEL CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL

Con respecto al consumo de bebidas alcohólicas, en el grupo de fumadores se observó una mayor prevalencia de este hábito 93.7% comparado con un 72.5% en los no fumadores. Mediante la prueba U de Mann-Whitney se realizó el análisis estadístico para medir el efecto del consumo de bebidas alcohólicas sobre la frecuencia de MN y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa $p=0.579$, por lo tanto el consumo de alcohol no influyó en el incremento de la frecuencia de MN en las células del epitelio bucal de la población objeto de estudio.

También se realizó la interacción entre el consumo de bebidas alcohólicas y el hábito de fumar para determinar su efecto sobre la frecuencia de MN. Mediante el análisis estadístico de Kruskal-Wallis se pudo determinar que hubo una no asociación entre el hábito de fumar y el consumo de alcohol en nuestra población ($p=0.076$) como se muestra en la tabla 4. Sin embargo mediante la prueba U de Mann-Whitney se observó una diferencia estadísticamente significativa $p=0.013$ entre los individuos que solo consumen alcohol y los individuos que consumen alcohol y cigarrillo.

Tabla 6. Efecto del consumo de bebidas alcohólicas y el consumo de cigarrillo sobre la frecuencia de micronúcleos en células bucales.

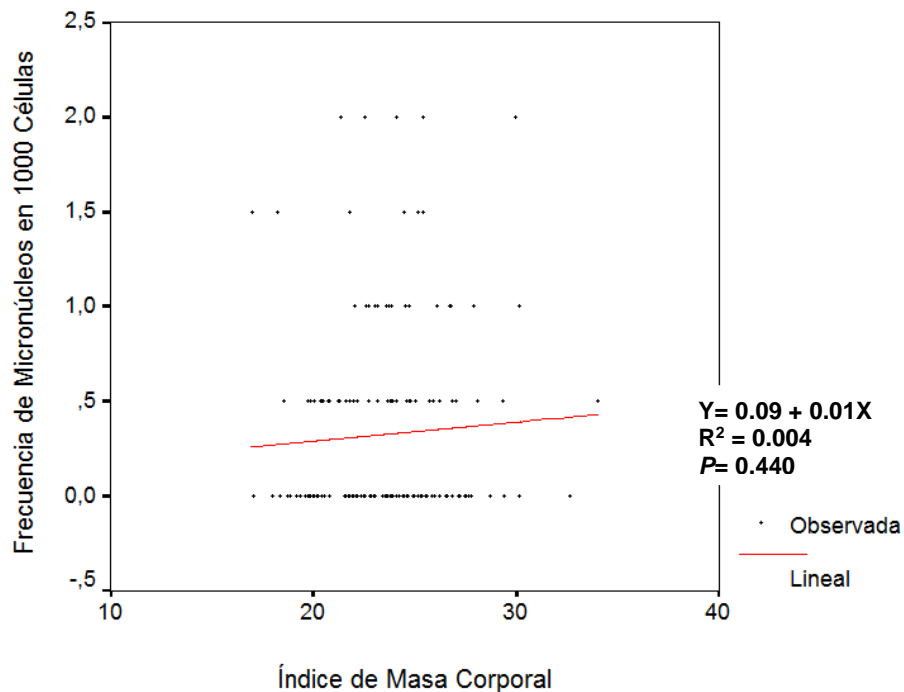
Variables	Número de MN/ 1000 células bucales		
	Media \pm D.E	N	P
Consumo			
Cigarrillo (--) / Alcohol (--)	0.36 \pm 0.58	22	0.076 ^a
Cigarrillo (+) / Alcohol (--)	0.40 \pm 0.41	5	
Cigarrillo (--) / Alcohol (+)	0.19 \pm 0.38	58	
Cigarrillo (+) / Alcohol (+)	0.40 \pm 0.55	75	

^aAnálisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

8.5 EFECTO DEL INDICE DE MASA CORPORAL (IMC) SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL

Al evaluar la frecuencia de micronúcleos con respecto al IMC, se encontró una correlación positiva no significativa ($r_s=6.3\%$; $p=0.427$). El coeficiente de determinación indica que la variabilidad observada en el número de MN en mil células del epitelio bucal se debe en un 0.4% a la variabilidad en el índice de masa corporal, pero esta relación fue no significativa $p=0.440$ (Ver figura 12). Al realizar el análisis para cada grupo por separado fumadores y referentes con respecto al índice de masa corporal tampoco se encontró asociación estadísticamente significativas $p= 0.621$ y $p= 0.223$ respectivamente entre la frecuencia de MN y el IMN en células del epitelio bucal (datos no mostrados).

Figura 12. Análisis de correlación lineal entre la frecuencia de MN en 1000 células del epitelio bucal y el índice de masa corporal.



8.6 EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO BUCAL

La tabla 5 muestra el efecto del consumo de frutas y verduras, individual y en conjunto, sobre la frecuencia de micronúcleos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas del consumo de frutas y verduras o de frutas+verduras en la frecuencia de MN comparando fumadores y referentes ($p>0.05$). Sin embargo al realizar el análisis intra-grupo entre la frecuencia de MN respecto al consumo combinado de frutas+verduras, solo el grupo fumador presentó una diferencia estadísticamente significativas $p<0.05$ cuando se comparó el promedio de MN en el consumo alto de frutas y verduras (0.15 ± 0.54) con respecto al consumo bajo (0.50 ± 0.59).

Tabla 7. Análisis de la frecuencia de MN/1000 células con los hábitos alimenticios

Variables	Micronúcleos en células bucales						P
	Fumadores			No fumadores			
	Media \pm D.E	N	P	Media \pm D.E	N	P	
Consumo de frutas (porción semanal)							
No consume	0.45 \pm 0.61	11		0.50 \pm 0.40	3		
Bajo (1-6)	0.36 \pm 0.51	36	0.772 ^b	0.22 \pm 0.45	40	0.368 ^b	0.330 ^a
Alto (≥ 7)	0.43 \pm 0.56	33		0.24 \pm 0.45	37		
Consumo de verduras (porción semanal)							
No consume	0.38 \pm 0.41	9		0.00 \pm 0.00	2		
Bajo (1-6)	0.50 \pm 0.66	28	0.722 ^b	0.25 \pm 0.40	26	0.604 ^b	0.703 ^a
Alto (≥ 7)	0.34 \pm 0.48	43		0.25 \pm 0.47	52		
Consumo de Frutas+Verduras							
No consume	0.33 \pm 0.28	3		0.00 \pm 0.00	0		
Bajo	0.50 \pm 0.59	57	0.042 ^b	0.28 \pm 0.47	50	0.298 ^b	0.835 ^a
Alto	0.15 \pm 0.54*	20		0.27 \pm 0.51	30		

^aAnálisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis entre-grupos.

^bAnálisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis intra-grupos.

* $P< 0.05$ cuando se comparó con el promedio de MN del grupo con bajo consumo de frutas+verduras

9. DISCUSIÓN

En la actualidad el tabaquismo se sigue posicionando como uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial y nacional, debido a la elevada carga de mortalidad, morbilidad y discapacidad que provoca (Ayesta et al., 2008; Eriksen et al., 2012; López-Antuñano, 2013; Pardo and Piñeros, 2010; Pichon-Riviere et al., 2013). El cigarrillo la presentación de tabaco consumida universalmente, pero más específicamente el humo producto de su combustión constituye uno de los principales factores de riesgo para la salud humana, porque en este se han encontrado más de 5300 compuesto químicos en su mayoría tóxicos de los cuales 70 han sido clasificados mutagénicos y carcinogénicos para el hombre (IARC and WHO, 2012; Shafey et al., 2010). Por esta razón el hábito de fumar se ha asociado con el desarrollo de un amplio espectro de enfermedades que incluyen problemas respiratorios, cardiovasculares y más de 10 tipos de cáncer donde se destacan el de pulmón, boca, faringe, laringe, esófago, estómago, vejiga, hígado, entre otros (Hecht, 2006; Hecht et al., 2012; HHS, 2010, 2014; IARC and WHO, 2004, 2012; Oppeltz and Jatoi, 2011; Sasco et al., 2004; Xue et al., 2014). A pesar de que existe suficiente evidencia científica que demuestra la nocividad del cigarrillo y su íntima relación con el cáncer, hace falta generar más conocimiento donde se proponga la implementación de técnicas prácticas para combatir los efectos adversos en la salud. Una herramienta útil para este propósito es el uso de biomarcadores citogenéticos sensibles que facilitan la detección temprana de los efectos genotóxicos y citotóxicos producto de la exposición a factores de tipo ambiental, ocupacional y de estilo de vida, como el consumo de cigarrillo (Fenech et al., 1999). Teniendo en cuenta esta creciente problemática, es evidente la necesidad de desarrollar estudios de biomonitorio en la población fumadora, dado que la prevención y la detección temprana juegan un papel determinante como estrategia para la disminución de la incidencia de muertes por cáncer.

Es por esto, que el presente estudio evaluó el efecto del consumo de cigarrillo en una población joven adulta de la ciudad de Popayán, mediante el ensayo de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa bucal, uno de los biomarcadores citogenéticos de efecto genotóxico retomado en la actualidad. Éste método proporciona una oportunidad única para evaluar la inestabilidad celular y el daño genético producto de la exposición a carcinógenos presentes en el humo de cigarrillo analizado en el tejido directamente afectado (Bonassi et al., 2009). Las características del epitelio de la cavidad oral favorecen su utilización, debido a que es un tejido de fácil acceso, y es la primera barrera contra un gran número de agentes potencialmente peligrosos que ingresan al organismo por inhalación e ingestión. Además sus células se encuentran naturalmente en proliferación, lo que las hace más vulnerables a lesiones producidas en el ADN y esto tiene una gran relevancia ya que se calcula que el 90% de todos los tipos de cáncer tienen un origen epitelial. Sumado a esto, el método de recolección de las células es mínimamente invasivo y de rápida elaboración porque no se requiere el paso de la replicación celular ex vivo, lo que minimiza sus costos y agiliza la obtención de

resultados (Fenech et al., 2007; Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009). Por estas razones, la prueba de MNs de la cavidad oral ha ganado popularidad a nivel internacional dentro de la comunidad científica, haciendo que el número de publicaciones que usan a este ensayo incrementen significativamente, lo que genera mayor conocimiento del comportamiento del biomarcador en diferentes poblaciones y contribuye en el proceso de caracterización propuesto por el proyecto HUMN_{XL}, para determinar su utilidad como predictor de riesgo de cáncer (Bonassi et al., 2011a; Fenech et al., 2011).

En este estudio, la frecuencia de MN en células epiteliales de la mucosa bucal fue evaluada en una población de 160 individuos, compuesta por 80 fumadores y 80 no fumadores. Se ha determinado que el tamaño de muestra óptimo para evaluar este biomarcador debe ser mayor a los 120 individuos (65 expuestos y 65 referentes), para obtener resultados significativos si la frecuencia de MN en los sujetos expuestos es 50% más alto que en los referentes (Ceppi et al., 2010). Por lo tanto el tamaño de muestra utilizado fue mayor al recomendado y además estuvo por encima del número reportado por los estudios de Bohrer et al. (2005), D'Agostini et al. (2012), Nerrsesyan et al. (2006) Piyathilake et al. (1995) Wu et al. (2004), que evaluaron este biomarcador en personas fumadoras y tuvieron poblaciones de 49, 36, 30, 99, 92 respectivamente. Por otra parte, haciendo referencia a la etnicidad de la población, algunos autores sugieren que esta variable debe tenerse en cuenta en los estudios de biomonitorio humano que hacen uso del biomarcador de MN, porque puede aparecer como un posible factor de confusión (Bonassi et al., 2009; Holland et al., 2008; Konopacka, 2003). Esto se debe a que los componentes ancestrales son diferentes para cada grupo o población y esta variabilidad genética puede interferir aumentando o disminuyendo la frecuencia de este biomarcador. Sin embargo en esta investigación la totalidad de la población colectada fue mestiza, teniendo en cuenta el estudio realizado por Córdoba et al. (2012), donde se identificó por medio de marcadores genéticos de ancestría que la población del departamento del Cauca es producto de una mezcla triétnica de orígenes europeo, amerindio y africano, por lo tanto no fue una covariable para este estudio.

Otra característica de este estudio fue la selección de una población joven adulta entre los 18 a 40 años de edad, debido a que esta, es una de las más vulnerables cuando se habla del hábito de fumar. Los jóvenes no asocian el consumo de cigarrillo con los efectos nocivos sobre la salud porque las enfermedades aparecen mucho tiempo después de iniciado su consumo, sobre todo en la etapa adulta (González and Berger, 2002). Por esta razón los adolescentes continúan fumando hasta convertirse en fumadores crónicos en la adultez haciendo más difícil el proceso de abandono de este hábito. La curiosidad, la rebeldía y la aceptación social son las razones que impulsan a los más jóvenes a iniciarse en el consumo de cigarrillo (Pérez and Pinzón, 2005). Los resultados muestran que la edad promedio de inicio para el consumo de cigarrillo fue de 17 años, lo que coincide con los datos epidemiológicos establecidos a nivel nacional por el Ministerio de Protección Social (2008). Otras investigaciones realizadas en la población colombiana han

encontrado edades de inicio de consumo que varían desde los 12 hasta los 17 años de edad (Gobierno Nacional de la Republica de Colombia, 2013; Navarro et al., 2012; Parra et al., 2003; Torres et al., 2006). Por consiguiente evaluar el biomarcador de MN en células epiteliales en jóvenes sanos fumadores, es una estrategia efectiva para producir evidencia científica que muestre los efectos tempranos producidos por el consumo de cigarrillo sobre el material genético. De esta forma contribuir en los modelos educativos y preventivos dirigidos hacia los niños, jóvenes y jóvenes adultos.

Otro aspecto relevante en la evaluación de la frecuencia de MN en células del epiteliales, es la tinción, una de las variables metodológicas que representa uno de los grandes factores de confusión al momento de evaluar este biomarcador (Bonassi et al., 2011a). La revisión bibliográfica muestra que hasta el momento existe una gran variabilidad en los procedimientos de coloración utilizados para el estudio de los MN en células bucales. Pero algunos autores ya han demostrado que las tinciones ADN específicas como Feulgen, DAPI, Yoduro de Propidio y Naranja de acridina son la mejor opción para valorar el biomarcador en este tipo de tejido en particular, comparado con los colorantes que no tienen especificidad con el ADN como Giemsa, May-Gründwald Giemsa, Hematoxilina Eosina y Acetorceina (Bonassi et al., 2009; Bonassi et al., 2011a; Grover et al., 2012; Holland et al., 2008; Holland et al., 1994; Nersesyán et al., 2006). Esto se debe a que las células de las últimas capas del epitelio oral tienden a queratinizarse, producto del recambio celular y como respuesta protectora a lesiones. Durante este proceso se forman gránulos de queratohialina, cuerpos proteicos, pequeños y circulares que aparecen en el citoplasma y que con tinciones no ADN-específicas se pueden mal interpretar como MN y sobreestimar su formación. De igual forma con este tipo de tinciones las bacterias presentes en la boca, por su tamaño reducido y forma redondeada también pueden parecerse a los MN (Grover et al., 2012; Holland et al., 2008; Kashiyap and Reddy, 2012). Por esta razón en presente trabajo se empleó el método de tinción específico para el ADN Feulgen-Fast Green porque además de su alta especificidad con el material genético, genera un buen contraste, claridad y brillo en las células, lo que facilita una buena clasificación de los MN, además es el protocolo recomendado y utilizado por más del 50% de los laboratorios que estudian este biomarcador y es la metodología propuesta hasta el momento por el proyecto HUMN_{XL} (Thomas et al., 2009).

En el presente estudio, la frecuencia basal de MN en células epiteliales bucales para el grupo referente fue de 0.24 ± 0.45 . Este resultado fue similar a los encontrados por Garcia et al. (2012), Zamani et al. (2011), Müllner et al. (2013), Çelik et al. (2003), Rosin et al. (1989), con niveles basales de 0.20, 0.26, 0.28 y 0.29 para los dos últimos, respectivamente, quienes usaron la metodología de tinción diferencial para ADN Feulgen Fast-Green. Sin embargo, otros estudios que utilizaron este mismo método de coloración, presentaron frecuencias significativamente menores (Angelieri et al., 2010; Bartolotta et al., 2011; Holland et al., 1994; Ladeira et al., 2010; Ribeiro et al., 2014) y mayores (Chandirasekar et al., 2014; Konopacka, 2003;

Naderi et al., 2012; Tolbert et al., 1992) con un rango de 0.04 a 0.94. Así mismo los resultados presentados por el consorcio del proyecto internacional HUMN_{XL} mostraron niveles basales entre 0.3 y 1.7 MN/1000 células (Bonassi et al., 2011a), valores que son mayores a los reportados en el presente estudio. Una posible explicación a este amplio espectro de los niveles basales, se puede deber en gran medida variables de estilo de vida como la alimentación y a componentes genéticos para cada población (etnia), adicionalmente a la gran variabilidad metodológica usada entre laboratorios, como por ejemplo la recolección, montaje de las muestras celulares, el número de células analizadas por individuo y al uso de metodologías con tinciones ADN no específicas, que se sabe que incrementan el registro equivoco de partículas no nucleares como MN, como por ejemplo el uso de tinciones con Giemsa y May-Grünwald Giemsa, presentan resultados que sobrepasan el límite superior de 1.7, con valores de 1.95, 2.34, 3.53, 4.44, y 4.50 en las publicaciones reportadas por Melikundi et al. (2013), Popova et al. (2014), Palaskar and Jindal. (2010), Gabriel et al. (2006), Odio et al. (2005) respectivamente. Además cabe resaltar que estas frecuencias no involucraron datos publicados en poblaciones humanas para Colombia, por lo tanto hasta el momento no existe reporte de frecuencia para esta población. Todos estos factores repercuten notoriamente en los resultados, pero aún no se ha podido describir con certeza el grado de incidencia que tiene cada una de estas variaciones sobre el biomarcador (Holland et al., 2008; Holland et al., 1994). Esto demuestra la importancia de que se generen estudios en diferentes poblaciones y que por supuesto hagan uso del protocolo propuesto por Thomas et al. (2009), para que se logre unificar las metodologías y se pueda establecer correctamente los niveles basales para el biomarcador de MN bucales. Por lo tanto este estudio aporta datos importantes que contribuyen con el proceso de caracterización de este biomarcador y de esta forma lograr su posterior validación.

Para el grupo de fumadores se observó que la frecuencia de micronúcleos fue dos veces mayor a la del grupo referente ($p < 0.05$). Este incremento se debió principalmente al efecto clastogénico y/o aneugénico producto de la interacción directa de los compuesto tóxicos y genotóxicos presentes en el humo del cigarrillo con las células germinativas del epitelio de la cavidad oral, donde la mucosa permite una rápida absorción de estos a través de su membrana y a la interacción de metabolitos reactivos que se encuentran en el sistema circulatorio adyacente a la lámina basal donde se encuentran las células basales en división (Avezov et al., 2014). Se ha demostrado además, que estas células tienen la capacidad metabólica de biotransformar procarcinógenos presentes en el humo del cigarrillo como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las N-nitrosaminas específicas del tabaco, en sus metabolitos altamente reactivos mediante las enzimas citocromo P-450 (Sacks et al., 2011). El benzopireno es transformado a benzopireno diol epóxido que reacciona con el ADN formando predominantemente aductos en las guanosinas. La N-nitrosornicotina (NNN) y la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) son transformadas por hidroxilación en agentes alquilates que pueden ocasionar metilación, piridiloxobutilación y piridilhidroxibutilación de los

nucleótidos, lo que resulta en el incremento de aductos en el ADN (Warnakulasuriya et al., 2005; Xue et al., 2014). Si estas lesiones en el material genético, no son reparadas o se reparan incorrectamente se producirán mutaciones como rupturas de cadena doble o sencilla que se expresarán como fragmentos de cromosomas que serán visualizadas en forma de MN (Fenech et al., 1999). Por el contrario otros compuestos del cigarrillo actúan específicamente sobre los genes que controlan la formación del uso mitótico, lo que provoca la pérdida de cromosomas enteros, los cuales quedan rezagados al momento de la división celular lo que incrementa las aneuploidias, una de las alteraciones comunes en los procesos carcinogénicos (Landi et al., 2008).

Esta diferencia significativa concuerda con los resultados reportados por (Sarto et al., 1987), (Naderi et al., 2012), (Piyathilake et al., 1995), (Konopacka, 2003), (Zamani et al., 2011), (Nersesyan et al., 2011), (Chandirasekar et al., 2014), quienes evaluaron el efecto del consumo de cigarrillo mediante el biomarcador de MN en células del epitelio bucal con la tinción diferencial Feulgen Fast-Green. Estos estudios observaron un incremento significativo en la formación de MN que fueron de 2 a 4.6 veces mayor con respecto al grupo referente. Adicionalmente los resultados aquí descritos coinciden con las investigaciones que evaluaron este biomarcador en poblaciones fumadoras pero que emplearon tinciones como Papanicolau, Giemsa, May-Gründwal Giemsa y Acetorceina, (Ayarde et al., 2008; Bansal et al., 2012; Caplash et al., 2013; Kamath et al., 2014; Nefić et al., 2013; Palaskar and Jindal, 2010; Pradeep et al., 2014). Sin embargo como se mencionó anteriormente la exposición crónica de la mucosa bucal a sustancias tóxicas como las presentes en el humo del cigarrillo pueden incrementar la formación de cuerpos queratínicos los cuales son mal interpretados como MN, por lo tanto estos resultados deben analizarse detenidamente hasta corroborar su confiabilidad.

Contrario a esto, Bohrer et al. (2005), D'Agostini et al. (2012) Stich and Rosin (1983), Wu et al. (2004) quienes hicieron uso de la tinción diferencial Feulgen Fast-Green, no observaron diferencias estadísticamente significativas de MN en las células del epitelio bucal entre fumadores y no fumadores. Una posible explicación a estos resultados fue el reducido número de individuos recolectados con un tamaño de 46, 49, 51, y 92 respectivamente, los cuales no superaron el tamaño poblacional de al menos 120 individuos según lo recomendado por Ceppi et al. (2010), y esto pudo influir para que la prueba no contara con el suficiente poder estadístico para demostrar el daño ocasionado por el hábito de fumar. Otra explicación podría ser la variabilidad en la metodología de recolección de las muestras o el número de células analizadas que no sobrepasó las 1000 células. Además en estos estudios no se realizó un emparejamiento uno a uno fumador referente, lo cual también pudo afectar los resultados. Con lo mencionado hasta el momento referente al cigarrillo, se debe reconocer que existe un amplio número de investigaciones que evalúan el daño cromosómico ocasionado por su consumo, a través del biomarcador de MN en células exfoliadas de la mucosa bucal, pero los resultado aún son muy divergentes. Por lo tanto, se recomienda continuar con los estudios que analicen

esta variable en particular, aplicando las recomendaciones internacionales establecidas para el biomarcador, con el propósito de establecer su sensibilidad en la detección de daños genotóxicos producto de la exposición a contaminantes ambientales.

Tradicionalmente, el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica se ha utilizado para monitorear la exposición humana a mutágenos ambientales, y más en los últimos años después de su validación como biomarcador para predecir riesgo de desarrollar cáncer (Bonassi et al., 2007). En la evaluación del biomarcador de MN en fumadores, Salama et al. (1999) en su revisión reportaron que la mayoría de estudios no evidencian una asociación significativa, incluso cuando se evalúa en grandes poblaciones. Sin embargo Bonassi et al. (2003) encontraron en su metanálisis del proyecto HUMN diferencias significativas en el subgrupo de fumadores pesados que consumen más de 30 cigarrillos al día (Bonassi et al., 2003; Fenech and Bonassi, 2011). Como se dijo anteriormente, en el presente estudio el biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal fue significativo cuando se comparó fumadores y no fumadores, teniendo en cuenta que los niveles de exposición fueron bajos, en promedio 8 cigarrillos al día y 13 en el rango alto de consumo. Esta diferencia entre los linfocitos de sangre periférica y el tejido epitelial bucal se puede explicar teniendo en cuenta que las células bucoepiteliales además de estar expuestas directamente al humo del cigarrillo, también reciben metabolitos reactivos provenientes del sistema circulatorio, donde las células basales son las que están en contacto con el tejido conectivo y son las que expresan el daño genético como MN durante la división nuclear (Holland et al., 2008). Sumado a esto las células bucales poseen un potencial limitado para la reparación del ADN en comparación a los linfocitos de sangre periférica, por lo tanto el tejido epitelial de la cavidad bucal es más adecuado para reflejar el daño real ocasionado por exposición a compuestos como los presentes en el humo de cigarrillo (Dhillon et al., 2004; Heravi et al., 2013). Además otros estudios han mostrado que el hábito de fumar disminuye la capacidad antioxidante de las peroxidasas y del ácido úrico presentes en la saliva, que son los mecanismos de defensa más importantes en contra de los radicales libres provenientes del cigarrillo, lo que deja a las células de la boca desprotegidas contra los efectos deletéreos producidos por el incremento del estrés oxidativo. (Abdolsamadi et al., 2011; Greabu et al., 2008; Reznick et al., 2003). Por lo tanto, las células de la mucosa bucal parecen ser más sensibles que los linfocitos de sangre periférica para demostrar la inducción del daño citogenético producto del consumo de cigarrillo.

La intensidad del hábito de fumar se midió calculando el número de paquetes-años y estratificando la población en tres categorías; bajo, medio y alto. Solo el nivel alto de consumo de más de 4 paquetes-años correspondiente a 13.3 cigarrillos al día, se asoció con un incremento significativo en la frecuencia de MN bucales cuando se comparó con las demás categorías incluido el grupo referente. Algunos estudios han observado que existe una asociación positiva entre el número de cigarrillos/día o paquetes-años de consumo y el biomarcador de MN en células del epitelio bucal

(Chandirasekar et al., 2014; Konopacka, 2003; Piyathilake et al., 1995; Wu et al., 2004; Zamani et al., 2011). Sin embargo Bonassi et al. (2011) en su meta-análisis del proyecto HUMN_{XL} aseguró que solo es posible evidenciar un incremento significativo de MN en células bucales cuando se consumen más de 40 cigarrillos diarios. Hasta el momento, son pocos los estudios que han evaluado los efectos nocivos de las bajas exposiciones como los presentados en este estudio. La investigación realizada por Konopacka (2003) quien evaluó una población de 120 individuos que consumían al menos 10 cigarrillos al día, encontró una relación positiva significativa cuando se comparó la frecuencia de MN bucales entre fumadores y no fumadores y sugirió una asociación dependiente entre estas dos variables. De igual forma Chandirasekar et al. (2014) demostró que el consumo en promedio de 10.11 cigarrillos por día, influye significativamente $p < 0.05$ en el daño genético evaluado mediante el biomarcador de MN en células del epitelio oral, en una población de 241 individuos. También Zamani et al. (2011) reportó un incremento significativo de MNs bucales cuando evaluó una población de fumadores jóvenes con un consumo mayor a los 5 paq-años. Otros autores como Nersersyan et al. (2006, 2011) y Piyathilake et al. (1995) han valorado solo fumadores pesados de más de 20 paq-años de consumo de cigarrillo, y encontraron una asociación positiva significativa con este biomarcador. Es evidente que posiblemente un mayor nivel de consumo incremente aún más los valores de la frecuencia de MN en el tejido de la cavidad oral, pero como se demostró en este estudio y como lo corroboran otros, los niveles bajos de exposición también inducen daño cuando el estudio está bien estructurado y los controles son escogidos adecuadamente. Sin embargo se recomienda que se realicen más estudios que tengan en cuenta fumadores livianos para de esta forma poder esclarecer las ambigüedades que se presentan al respecto.

La frecuencia de MN en células bucales en los individuos con un consumo de cigarrillo superior a los 10 años, fue significativamente mayor comparado con las personas que consumieron cigarrillo por un tiempo menor a 10 años y con el grupo no fumador ($p < 0.05$). Hasta el momento solo hay dos publicaciones que tuvieron en cuenta esta variable y que además hicieron uso de la tinción de Feulgen. El primero, realizado por Naderi et al. (2012), mostró un incremento significativo cuando comparó los fumadores con un tiempo de consumo mayor a 10 años con el grupo referente, pero una desventaja en sus resultados es que no fue clara la descripción de la intensidad de consumo, como el número de paquetes-años y el número de cigarrillos por día, además los grupos no fueron emparejados por edad por lo tanto esta variable pudo influir en sus resultados. El segundo estudio, igualmente reveló una elevada formación de MN bucales en el grupo con un consumo mayor a 10 años, pero el análisis se realizó combinando individuos fumadores individuos consumidores de tabaco sin humo (Chandirasekar et al., 2014). Las células epiteliales exfoliadas como las presentes en la cavidad oral tienen un tiempo de vida limitado debido al recambio celular de 5 a 25 días, por lo tanto no tienen la capacidad de reflejar el daño acumulativo por exposiciones crónicas (Nersesyan et al., 2011). Sin embargo en el caso particular del cigarrillo, se sabe que entre sus compuestos

se destacan los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzo(a)pireno y algunos metales pesados como el cadmio, mercurio, plomo, arsénico, entre otros, los cuales son altamente persistentes, lo que promueve su bioacumulación en diferentes tejidos por largos periodos debido a su difícil excreción (Bernhard et al., 2005). El cadmio en específico, está clasificado como un agente potencialmente carcinogénico porque ocasiona múltiples daños en el ADN, como rupturas de cadena doble, que pueden expresarse como MN (Khlifi and Hamza-Chaffai, 2010). Por consiguiente, el consumo diario de cigarrillo por muchos años podría causar una mayor acumulación de estos elementos, los cuales son liberados y pueden llegar a tener contacto con las capas basales del tejido epitelial, ocasionando una exposición que reflejará un incremento de daño genético que puede ser evidenciado mediante el biomarcador de MN en las células exfoliadas.

Varios estudios incluyendo meta-análisis han identificado los principales factores que alteran la frecuencia de micronúcleos en células bucales. Por esta razón uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar las variables que podían ejercer un efecto modulador sobre éste biomarcador, en nuestra población bajo las condiciones particulares de ambiente, estilo de vida, según lo reportado. La edad es una de las variables demográficas más importantes que impactan el índice de MN tanto en linfocitos como en células epiteliales de boca (Fenech et al., 2011). Por esta razón en el presente estudio se realizó un emparejamiento uno a uno dependiendo la edad de los participantes, para de cierta forma omitir el efecto generado por ésta. De tal modo tanto el grupo fumador como el de no fumadores tuvieron una edad media de 26.75 años y al calcular su efecto sobre la frecuencia de MN en células de la mucosa bucal no se encontró una asociación significativa entre estas dos variables ($p > 0.05$), lo cual se atribuyó a que la población objeto de estudio fue de jóvenes adultos que no sobrepasaron los 40 años de edad. Esta observación concuerda con varios autores quienes evaluaron el efecto de la edad con un promedio inferior a los 45 años y encontraron una no asociación para la ocurrencia de MN del epitelio bucal teniendo en cuenta el consumo de cigarrillo (Bohrer et al., 2005; D'Agostini et al., 2012; Konopacka, 2003; Nersesyan et al., 2006; Nersesyan et al., 2011). Así mismo el meta-análisis publicado por (Bonassi et al., 2011a) en el proyecto HUMNxl, reportó un incremento significativo de MN en células buco-epiteliales solo en los individuos con edades superiores a los 40 años.

Por el contrario otras publicaciones han demostrado una asociación positiva significativa entre la edad y la frecuencia de MN en el epitelio bucal (Bloching et al., 2008; Özkul et al., 1997; Piyathilake et al., 1995), sin embargo, en estas la edad promedio fue mayor que la reportada en los estudios antes mencionados. Estos resultados demuestran que en este tejido, solo las edades más avanzadas pueden ejercer un efecto modulador sobre el biomarcador de MN. Cabe resaltar que evidentemente la vejez ha sido asociada con alteraciones fisiológicas y estructurales que disminuyen el funcionamiento de los órganos y los sistemas. Por ejemplo a nivel celular, el envejecimiento genera una excesiva acumulación de radicales libres por la pérdida de funcionalidad de los procesos de detoxificación

(Bolognesi et al., 1999). Adicionalmente hay un incremento de daños en el material genético como rupturas y pérdida de cromosomas, no disyunción, acortamiento de telómeros entre otros (Fenech, 1998). Sumado a esto con el paso de los años la capacidad de reparación del ADN se reduce, promoviendo un aumento de mutaciones permanentes (Nefić et al., 2013). Además se ha reportado que la actividad proliferativa de las células de la mucosa bucal decrece atrofiando la estructura del tejido (Eid et al., 2012). Por lo tanto es notorio que los procesos celulares de defensa se vuelven ineficientes en edades adultas, incrementando la inestabilidad del genoma.

El efecto del envejecimiento parece ser una combinación entre los procesos genéticamente programados y las alteraciones inducidas por factores externos como es el caso del consumo de cigarrillo (Bolognesi et al., 1999; Erceg et al., 2007). Por esta razón, adicionalmente, se evaluó el efecto de la edad independientemente para cada grupo. El grupo referente no presentó una relación entre la edad y la frecuencia de MN, pero los fumadores si mostraron un efecto significativo al evaluar la edad sobre la frecuencia de MN, aunque esta asociación no fue clara debido a que en este grupo, el tiempo de exposición y la edad fueron factores que mostraron un alto nivel de correlación, por lo tanto se sugirió que fue el tiempo de exposición quien incrementó la frecuencia del biomarcador al no evidenciarse un efecto aditivo entre estas dos variables. Por esta razón el efecto de la edad debe seguir siendo objeto de futuras investigaciones que ayuden a esclarecer su función en el desarrollo de MN en células bucales.

El consumo de bebidas alcohólicas al igual que el cigarrillo es uno de los factores de riesgo que impactan el estado de salud de la población colombiana (Londoño et al., 2005; MPS and DNE, 2008). Esta variable no pudo ser excluida de este estudio, debido a que gran parte de la población joven y en mayor medida los fumadores consumen bebidas alcohólicas, por lo tanto se tuvo en cuenta al realizar el análisis estadístico. Los resultados revelaron que el consumo de alcohol no presentó una diferencia significativa para la frecuencia de MN en células bucales, esto pudo deberse a que el nivel de consumo en la población objeto de estudio fue moderado, de una a dos veces por mes. Este resultado concuerda con tres publicaciones donde se evaluó el consumo moderado de alcohol en fumadores y se encontró una asociación no significativa en la formación de MN bucales (Bloching et al., 2000; Nersesyan et al., 2006; Sarto et al., 1987). Otros como (Reis et al., 2002) pudieron determinar que el consumo diario y excesivo de bebidas alcohólicas interviene en el incremento de la frecuencia de MN en células bucales cuando se compara con el grupo referente, pero la diferencia solo fue significativa en el tejido epitelial de lengua el cual fue más susceptible. Por el contrario en un estudio caso control de cáncer oral se encontró que la frecuencia de MN en el epitelio bucal decrece con el consumo de alcohol, en consecuencia a un elevado número de células apoptóticas (Ramirez and Saldanha, 2002). Teniendo en cuenta estos estudios, es evidente que la evaluación de MN en tejido epitelial de boca y su asociación con el consumo de bebidas alcohólicas es aún controversial

Se ha establecido el efecto carcinogénico del alcohol ocurre a niveles de exposición superiores a 45ml de etanol por día (Reis et al., 2002). En el organismo el etanol es oxidado y transformado a su principal metabolito el acetaldehído, que se forma gracias a la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa presente en la células hepáticas o en las células de la mucosa oral y también puede generarse por la acción metabólica de la microflora presente en la saliva (Homann et al., 2000). El acetaldehído se ha clasificado como un químico tóxico, con características mutagénicas y carcinogénicas, que puede provocar aductos y mutaciones permanentes en el ADN que se verán expresados como MN en las células de la boca, incluso puede reducir la función inmune, inhibir la capacidad de detoxificación de carcinógenos y afectar la síntesis y reparación del genoma (IARC and WHO, 2012; Morse et al., 2007; Reidy et al., 2011).

De igual forma en el presente estudio se evaluó la interacción entre el consumo de cigarrillo y el alcohol, encontrando de nuevo resultados negativos para la frecuencia de MN bucales, donde se pudo establecer que el hábito de fumar fue el único responsable del incremento en la formación de daños en el ADN. A la fecha no se encontraron reportes para el efecto aditivo con un nivel moderado de consumo de alcohol en fumadores. Algunos autores han descrito un efecto sinérgico cuando se combina un excesivo consumo de cigarrillo, con un alto consumo de bebidas alcohólicas, reportando incrementos significativos en la frecuencia de MN bucales de hasta 5.5 veces más con respecto al grupo referente (Bohrer et al., 2005; Stich and Rosin, 1983). Se sugiere que el alcohol (etanol) probablemente actúa como cofactor incrementando el potencial carcinogénico de los componentes del humo de cigarrillo o del tabaco y que además se comporta como un solvente que facilita el paso de los carcinógenos a través de la membrana (Mohanta et al., 2013). Adicionalmente el consumo crónico de alcohol estimula las enzimas del citocromo P450 en el hígado y en la mucosa oral, dando lugar a una aceleración de la activación metabólica de pro-carcinógenos relacionadas con el humo del cigarrillo para ser transformados en carcinógenos activos (Toh et al., 2010). Sumado a esto, se ha determinado que la capacidad de salivación disminuye con el consumo de alcohol, lo que hace que aumente la concentración de carcinógenos en la cavidad bucal (Kamboj and Mahajan, 2007). Todos estos procesos indudablemente aumentan las lesiones en el ADN de las células expuestas promoviendo la formación de MN en este tejido.

Algunas investigaciones resaltan la importancia de incorporar el índice de masa corporal (IMC) como variable relevante, relacionada con la dieta y con el biomarcador de MN en células bucales, por lo tanto recomiendan su análisis en este tipo de estudios (Bonassi et al., 2009; Thomas et al., 2009). En el presente trabajo el promedio del IMC (kg/m^2) fue homogéneo para los dos grupos, 23.92 ± 3.83 en fumadores y 23.01 ± 3.25 en no fumadores. Además no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el IMC con respecto a la frecuencia de MN en células del epitelio bucal para la población total y por separado fumadores y

referentes. Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud respecto al estado nutricional, el total de la población de este estudio, teniendo en cuenta el IMC antes descrito se ubicó en el rango especificado como normal (18.5 a 24.9), que significa personas saludables sin delgadez, sobrepeso u obesidad (WHO, 1995). Este resultado es coherente al estudio realizado por Ros-Llor et al. (2012) el cual mostró una asociación no significativa entre el IMC con una media de $23.94 \pm 3.59 \text{ kg/m}^2$ y la frecuencia de MN en células bucales. De igual manera también se reportó una no asociación del IMC y la formación de linfocitos de sangre periférica (Fenech and Bonassi, 2011).

Un número importante de estudios tienen en cuenta el IMC como variable demográfica, sin embargo solo reportan la homogeneidad de este valor entre sus grupos de estudio, y no evalúan su influencia sobre la frecuencia de MN en células del epitelio bucal (El-Setouhy et al., 2008; Gabriel et al., 2006; Hintzsche and Stopper, 2010; Mondal et al., 2011; Nersesyan et al., 2011). Sin embargo, se ha demostrado que existe un efecto significativo del IMC sobre la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica y en células exfoliadas de la mucosa oral en individuos con obesidad $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Borges et al., 2013; Donmez et al., 2014; Terriquez et al., 2006). La obesidad está asociada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de una sobreproducción de radicales libres debida al excesivo flujo de ácidos grasos en comparación con la concentración de antioxidantes, esto promueve el estrés oxidativo y da inicio a procesos genotóxicos los cuales pueden ser cuantificados mediante el biomarcador de MN (Andreassi et al., 2011). De igual forma la delgadez severa ($\text{IMC} < 17 \text{ kg/m}^2$) puede generar inestabilidad y daños en el ADN como consecuencia de una malnutrición (Mondal et al., 2011). Por tal motivo se sugiere el IMC sea evaluado no solo a nivel demográfico e informativo, si no como un factor de confusión que puede llegar a modular la frecuencia del biomarcador de MN.

Adicionalmente en la presente investigación se evaluó concretamente el efecto del consumo por porción semanal, clasificado en no consumo y consumo alto y bajo de frutas y verduras y su variable combinada frutas+verduras, pero no se encontró una relación significativa para ninguna de estas con referencia al biomarcador de MN en células de la mucosa bucal, teniendo en cuenta que el consumo fue homogéneo para los dos grupos, fumador y referente. Cabe mencionar que este estudio no conto con suficiente variabilidad en la ingesta de frutas y verduras por parte de los participantes, lo que en gran medida no permitió apreciar el efecto modulador de los factores de la dieta dado que esta no fue la variable principal de interés, como si lo fue el consumo de cigarrillo. Pocos estudios han documentado el efecto de la dieta con relación al biomarcador de MN y han establecido que una alimentación rica en frutas y vegetales puede disminuir los niveles de este biomarcador en células del epitelio bucal (Bonassi et al., 2011a) como en linfocitos (Fenech et al., 2005). A nivel científico se ha establecido que evidentemente la estabilidad y la integridad del material genético dependen en gran medida de una adecuada alimentación rica en micronutrientes, como los β -carotenos, vitaminas B9 (folato), B6, B12, hierro, zinc

entre otros (Fenech, 2001, 2002b, 2008; Fenech, 2012), incluso se cree que un exceso o una deficiencia de estos puede llegar a ser igual de perjudiciales para el ADN como la exposición ambiental a genotóxicos, porque genera daños como lesiones oxidativas y rupturas de cadena doble y sencilla (Ames, 2001; Ames and Wakimoto, 2002; Fenech, 2008). Esto se explica porque las vitaminas y los minerales ingeridos en la dieta son requeridos como cofactores de enzimas, como parte estructural de diferentes proteínas, como sustratos en las rutas metabólicas y efectivamente son muy necesarios en los procesos de reparación y en la prevención al daño oxidativo, como por ejemplo la metilación del ADN (Fenech, 2002b, 2005, 2008; Fenech and Ferguson, 2001). Otras investigaciones se han dedicado a analizar el efecto de la suplementación dietaria intervenida, quimiopreención sobre el biomarcador de MN bucales, encontrando que algunos micronutrientes puede disminuir significativamente los niveles del biomarcador personas sanas, consumidores de tabaco y en individuos con lesiones precancerosas (Benner et al., 1994; Buajeeb et al., 2008; Holland et al., 1998; Li et al., 1999; Stich et al., 1984a; Stich et al., 1988; Stich et al., 1984b), actuando como agentes protectores contra los daños en el ADN (Thomas et al., 2011).

Finalmente es importante resaltar que el presente estudio es uno de los pocos que ha evaluado los niveles bajos de consumo de cigarrillo mediante el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa bucal y es el primero para Colombia y el Cauca en emplear este biomarcador en la población fumadora. Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron establecer que el hábito de fumar induce daños y promueve la inestabilidad en el material genético de las células implicadas, evidenciando la vulnerabilidad de esta población en particular a desarrollar enfermedades asociadas con este tipo de lesiones, como el cáncer. Por tal motivo con la socialización y publicación de esta investigación se pretende promover el uso del biomarcador de MN en células de la cavidad oral como una herramienta útil y sensible para realizar vigilancia epidemiológica a poblaciones en riesgo como los fumadores y detectar tempranamente los primeros eventos que anteceden los procesos carcinogénicos. De esta forma las entidades competentes podrán tener mayor control e información para formular estrategias de prevención, educación y promoción de la salud adecuadas y específicas para la población colombiana. Además este tipo de estudios puede influir en el control y cumplimiento de las políticas públicas ya establecidas en contra del tabaquismo. Todos los estudios encaminados a diseminar información sobre los efectos adversos sobre la salud del consumo de cigarrillo siempre serán la mejor estrategia para combatir esta creciente epidemia.

10. CONCLUSIONES

La frecuencia de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa bucal mostró un aumento estadísticamente significativo en el grupo fumador cuando se comparó con el grupo referente. Este resultado indicó que los componentes inhalados a través del humo del cigarrillo pueden interactuar con las células basales del epitelio bucal produciendo daños que afectan directamente el material genético ya sea por su efecto clastogénico y/o aneugénico. Por lo tanto esta población en particular de continuar con este hábito aumentara el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer. Las células exfoliadas de la mucosa bucal fueron sensible para detectar el daño ocasionado por este tipo de exposición.

El incremento en la frecuencia de MN en fumadores estuvo influenciado directamente por el tiempo en años y la intensidad de consumo. Los individuos clasificados en el rango alto de consumo de más de 4 paquetes-años fueron los que presentaron una mayor frecuencia de MN, así mismo como los que consumieron cigarrillo por un tiempo mayor a los 10 años. Este hallazgo permitió sugerir que a pesar de que el tejido epitelial de la cavidad bucal se renueva constantemente y no permite evidenciar el daño acumulativo, algunos componentes del cigarrillo que no se degradan con facilidad se acumulan durante años en el organismo continuando con sus efectos nocivos e interactuando indirectamente con este tipo de células generando daño.

La frecuencia basal de MN en células del epitelio bucal encontrada en el presente estudio, fue más baja en comparación con los niveles reportados a nivel internacional. Para Colombia aporta nuevo conocimiento, dado que hasta el momento no existen publicaciones para establecer comparaciones para nuestra población en particular, pero este valor indudablemente evidencia la adecuada escogencia del grupo control, un aspecto relevante. Las otras variables recolectadas en la encuesta, como la edad, el consumo de alcohol, el índice de masa corporal y la dieta no intervinieron en la formación en células de la mucosa bucal, pero es importante continuar evaluando su asociación con este biomarcador.

Los resultados de este estudio demuestran que, el ensayo de MN en células epiteliales de la mucosa bucal es una herramienta útil para detectar alteraciones en el material genético producto de la exposición a compuestos mutagénicos y carcinogénicos como los presentes en el humo de cigarrillo, además pone en manifiesto el riesgo a desarrollar enfermedades asociadas con este tipo de lesiones, como el cáncer. Las características del biomarcador como método sensible, mínimamente invasivo, de fácil aplicación y de rápida obtención de resultados lo postulan como un excelente candidato para ser incluido en los programas de vigilancia epidemiológica. La detección temprana de los efectos adversos sobre la salud producto del consumo de cigarrillo facilitará la formulación de estrategias educativas, preventivas y de promoción de la salud.

11. RECOMENDACIONES

Es importante que se sigan realizando estudios de biomonitorio a la población fumadora mediante el ensayo de MN en células epiteliales de la mucosa bucal, empleando las recomendaciones propuestas a nivel internacional de metodología y tamaño de muestra, para lograr establecer el comportamiento del biomarcador en la población colombiana bajo sus condiciones particulares. Además se sugiere la aplicación de toda la batería de biomarcadores del ensayo *Cytome* para complementar la evaluación de daño genotóxico y además evaluar citotoxicidad, muerte celular y la dinámica del tejido.

Se recomienda estimar los niveles de nicotina y de otros productos metabólicos en sangre, orina y saliva de las personas fumadoras, para determinar su relación de forma cuantitativa con el biomarcador de MN en células bucales. Además podría sugerirse el análisis relacionado con las diferentes marcas y tipos de cigarrillo que se promocionan a nivel nacional, porque se sabe que cada una posee diferentes niveles en los contenidos de alquitran que pueden modular la formación de MN en células bucales.

Emplear sondas inmunohistoquímicas centroméricas permitirá detectar la procedencia del daño ya sea por efecto clastogénico o aneugénico, producto de la interacción de los compuestos del humo del cigarrillo con el material genético, así se podrá calcular cuantitativamente el daño que ocurre con mayor frecuencia, ya sea rupturas o pérdida completa de cromosomas. Adicionalmente con el método de hibridación fluorescente *in situ* FISH se podrá detectar los cromosomas que con más frecuencia se ven afectados por este tipo de daño.

Un estudio complementario, sería evaluar biomarcadores de susceptibilidad en esta misma población, para identificar la relación entre los genes polimórficos del metabolismo y reparación del ADN, con la frecuencia del biomarcador de MN en células epiteliales de la mucosa bucal.

A futuro se podría desarrollar un estudio prospectivo de cohorte en la misma población, para evaluar la incidencia de cáncer y compararla con los resultados obtenidos con anterioridad para los grupos de fumadores que tuvieron un incremento significativo en la frecuencia de MN en células bucales, esto proporcionaría información relevante para lograr la validación de este biomarcador como predictor de riesgo de cáncer.

Para la variable de la dieta se recomienda realizar un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) de forma cuantitativa (g/día) y con la ayuda del programa (FREQUAN) esta información se cuantifica con la composición de los nutrientes del alimento por unidad de peso para saber la ingesta diaria de micro y macro nutrientes, es así que se puede evaluar su efecto sobre la frecuencia de MN.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abdolsamadi, H., Goodarzi, M., Mortazavi, H., Robati, M., and Ahmadi-Motemaye, F. (2011). Comparison of salivary antioxidants in healthy smoking and non-smoking men. *Chang Gung Med J* 34, 607-611.

Aitio, A., and Kallio, A. (1999). Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application. *Toxicology letters* 108, 137-147.

Ames, B.N. (2001). DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer* 1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475, 7-20.

Ames, B.N., and Wakimoto, P. (2002). Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nature Reviews Cancer* 2, 694-704.

Andreassi, M.G., Barale, R., Iozzo, P., and Picano, E. (2011). The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis* 26, 77-83.

Angelier, F., de Cássia Gonçalves Moleirinho, T., Carlin, V., Oshima, C.T.F., and Ribeiro, D.A. (2010). Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Clinical oral investigations* 14, 669-674.

Arboleda, Y., Hoyos, L., Carvajal, S., and Sierra, C. (2004). Genotoxicity from exposure to cigarettes in young smokers in Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública* 15, 367-372.

Avezov, K., Reznick, A.Z., and Aizenbud, D. (2014). Oxidative damage in keratinocytes exposed to cigarette smoke and aldehydes. *Toxicology in Vitro* 28, 485-491.

Ayarde, B., Cuti, M., Ascarrunz, M.E., and Tirado, 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.

Ayesta, F., Galán, M., and Márquez, F. (2008). El consumo de tabaco como problema de salud pública. Márquez FL y Ayesta FJ, eds, 11-21.

Bansal, H., Sandhu, V., Bhandari, R., and Sharma, D. (2012). Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population. *Contemporary Clinical Dentistry* 3, 184.

Bartolotta, S.A., Pacskowski, M.G., Hick, A., and Carballo, M.A. (2011). Micronuclei assay in exfoliated buccal cells from individuals exposed to arsenic in Argentina. *Archives of environmental contamination and toxicology* 61, 337-343.

Benner, S.E., Wargovich, M.J., Lippman, S.M., Fisher, R., Velasco, M., Winn, R.J., and Hong, W.K. (1994). Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leukoplakia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 3, 73-76.

Benowitz, N.L. (2010). Nicotine addiction. *The New England journal of medicine* 362, 2295.

Benowitz, N.L., and Henningfield, J.E. (2013). Reducing the nicotine content to make cigarettes less addictive. *Tobacco control* 22, i14-i17.

Bernhard, D., Rossmann, A., and Wick, G. (2005). Metals in cigarette smoke. *IUBMB life* 57, 805-809.

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.

Bloching, M., Reich, W., Schubert, J., Grummt, T., and Sandner, A. (2008). Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral oncology* 44, 220-226.

Bohrer, P.L., Paiva, R., Da Silva, I., and Rados, P. (2005). Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta cytologica* 49, 265.

Bolognesi, C., Lando, C., Forni, A., Landini, E., Scarpato, R., Migliore, L., and Bonassi, S. (1999). Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age and ageing* 28, 393-397.

Bonassi, S., and Au, W.W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 511, 73-86.

Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Burgaz, S., Bolognesi, C., Holland, N., Thomas, P., and Fenech, M. (2009). State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis* 24, 295.

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 (HUMNXL): The role of life-style,

host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*.

Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., and Fenech, M. (2011b). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis* 26, 93-100.

Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y., Chang, W., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., and Fenech, M. (2003). 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.

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., and Barale, R. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625.

Borgerding, M., and Klus, H. (2005). Analysis of complex mixtures-Cigarette smoke. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57, 43-73.

Borges, L., Moitinho, I., and Oliveira, D. (2013). FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL DE OBESOS. A Revista Saúde Com é uma publicação gratuita do Departamento de Saúde-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia 45, 36.

Buajeeb, W., Kraivaphan, P., Amornchat, C., and Suthamajariya, K. (2008). Reduction of micronuclei in oral lichen planus supplemented with beta-carotene. *Journal of oral science* 50, 461-467.

Caplash, S., Meenakshi., and Kaur, S. (2013). Micronucleus investigation in exfoliated buccal cells among tobacco chewers/smokers and controls. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences (IJBPAS)* 2, 72-79

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.

Collins, A.R. (1998). Molecular epidemiology in cancer research. *Molecular Aspects of Medicine* 19, 359-432.

Chandirasekar, R., Kumar, B.L., Sasikala, K., Jayakumar, R., Suresh, K., Venkatesan, R., Jacob, R., Krishnapriya, E., Kavitha, H., and Ganesh, G.K. (2014). Assessment of genotoxic and molecular mechanisms of cancer risk in smoking and

smokeless tobacco users. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 767, 21-27.

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*.

De Flora, S., and Bartsch, H. (2012). Genomic and post-genomic effects of cigarette smoke: Mechanisms and implications for risk assessment and prevention strategies. *International Journal of Cancer* 131, 2721-2723.

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

Dhillon, V., 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.

Donmez, H., Sahin, F., Bayram, F., Bitgen, N., Mert, M., Guclu, K., Hamurcu, Z., Aribas, S., Gundogan, K., and Diric, H. (2014). Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.

Eid, R.A., Sawair, F., Landini, G., and Saku, T. (2012). Age and the architecture of oral mucosa. *Age* 34, 651-658.

El-Setouhy, M., Loffredo, C., Radwan, G., Rahman, R., Mahfouz, E., Israel, E., Mohamed, M., and Ayyad, S. (2008). Genotoxic effects of waterpipe smoking on the buccal mucosa cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 655, 36-40.

Erceg, P., Milosevic, D.P., Despotovic, N., and Davidovic, M. (2007). Chromosomal changes in ageing. *Journal of genetics* 86, 277.

Eriksen, M., Mackay, J., and Ross, H. (2012). *The Tobacco Atlas*, American Cancer Society, World Lung Foundation, and Ed. Atlanta GA, eds. (New York).

Fenech, M. (1998). Chromosomal Damage Rate, Aging, and Diet. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854, 23-36.

Fenech, M. (2001). The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475, 57-67.

Fenech, M. (2002a). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 181, 411-416.

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

Fenech, M. (2005). The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis* 20, 255-269.

Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600, 58-66.

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. (2012). Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 733, 21-33.

Fenech, M., Baghurst, P., Luderer, W., Turner, J., Record, S., Ceppi, M., and Bonassi, S. (2005). Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, B-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability-results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 26, 991-999.

Fenech, M., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmuller, S., and Holland, N. (2007). Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells--a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis* 22, 3.

Fenech, M., and Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 43-49.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., and Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534, 65-75.

Fenech, M., and Ferguson, L.R. (2001). Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475, 1-6.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W., Zeiger, E., and Bonassi, S. (1999). The HUman MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 428, 271-283.

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.

Franco, E., and Otero, A.L. (2011). *Política Pública Salud Mental Popayán, Alcaldía de Popayán, and Secretaría de Salud Municipal, eds. (Popayán).*

Gabriel, H., Crott, J., Ghandour, H., Dallal, G., Choi, S., Keyes, M., 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. *American Journal of Clinical Nutrition* 83, 835.

Glynn, T., Seffrin, J.R., Brawley, O.W., Grey, N., and Ross, H. (2010). The globalization of tobacco use: 21 challenges for the 21st century. *CA: a cancer journal for clinicians* 60, 50-61.

Gobierno Nacional de la Republica de Colombia (2013). *Estudio Nacional de Consumo de Sustancias Psicoactivas en Colombia-2013, M.d.E.N. Ministerio de Justicia y del Derecho, Ministerio de Salud, Ministerio de Protección Social, Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito-ONUDD, Organizacio de Estados Americanos OEA, Embajada de los Estados Unidos de America, ed.*

Gómez, P. (2009). Transiciones en el consumo de drogas en Colombia. *Adicciones* 21, 81.

González, L., and Berger, K. (2002). Consumo de tabaco en adolescentes: factores de riesgo y factores protectores *Ciencia y enfermería* 8, 27-35.

Greabu, M., Totan, A., Battino, M., Mohora, M., Didilescu, A., Totan, C., and Spinu, T. (2008). Cigarette smoke effect on total salivary antioxidant capacity, salivary glutathione peroxidase and gamma-glutamyltransferase activity. *Biofactors* 33, 129-136.

Grover, S., Mujib, A., Jahagirdar, A., Telagi, N., and Kulkarni, P. (2012). A comparative study for selectivity of micronuclei in oral exfoliated epithelial cells. *Journal of cytology/Indian Academy of Cytologists* 29, 230.

Hagmar, L., Strömberg, U., Bonassi, S., Hansteen, I.-L., Knudsen, L.E., Lindholm, C., and Norppa, H. (2004). Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer research* 64, 2258-2263.

Hecht, S.S. (2002). Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *The Lancet Oncology* 3, 461-469.

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

Hecht, S.S. (2006). Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbeck's Archives of Surgery* 391, 603-613.

Hecht, S.S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer* 131, 2724-2732.

Hecht, S.S., Murphy, S.E., Stepanov, I., Nelson, H.H., and Yuan, J.-M. (2012). Tobacco smoke biomarkers and cancer risk among male smokers in the Shanghai Cohort Study. *Cancer Letters* 334, 34-38.

Heravi, F., Abbaszadegan, M.R., Merati, M., Hasanzadeh, N., Dadkhah, E., and Ahrari, F. (2013). DNA Damage in Oral Mucosa Cells of Patients with Fixed Orthodontic Appliances. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)* 10, 494.

HHS, U.S. (2010). How tobacco smoke causes disease: The biology and behavioral basis for smoking-attributable disease. In A report of the Surgeon General, U.S. Department of Health and Human Services, ed. (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).

HHS, U.S. (2014). The health consequences of smoking—50 years of progress: A report of the surgeon general. Atlanta, GA: US 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 17.

Hintzsche, H., and Stopper, H. (2010). Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicology letters* 193, 124-130.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., and Knasmueller and Michael, S. (2008). 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.

Holland, N., Jacob, R.A., Shang, N., Balaraman, A., and Smith, M.T. (1998). Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 417, 101-114.

Holland, N., Moore, L., and Smith, M. (1994). Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 312, 39-50.

Homann, N., Tillonen, J., Meurman, J.H., Rintamäki, H., Lindqvist, C., Rautio, M., Jousimies-Somer, H., and Salaspuro, M. (2000). Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 21, 663-668.

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

IARC (2007). Smokeless Tobacco and some Tobacco-specific N-Nitrosamines In IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, W.H. Organisation, ed. (France: International agency for research on Cancer).

IARC, and WHO (2004). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In Tobacco Smoke and

Involuntary Smoking, World Health Organization, and International Agency for Research on Cancer, eds. (Lyon, France).

IARC, and WHO (2012). IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human. 100, 579.

Jha, P., and Peto, R. (2014). Global effects of smoking, of quitting, and of taxing tobacco. *New England Journal of Medicine* 370, 60-68.

Jindal, S., Chauhan, I., and Grewal, H.K. (2013). Alteration in buccal mucosal cells due to the effect of tobacco and alcohol by assessing the silver-stained nucleolar organiser regions and micronuclei. *Journal of cytology/Indian Academy of Cytologists* 30, 174.

Kamath, V., Anigol, P., and Setlur, K. (2014). Micronuclei as prognostic indicators in oral cytological smears: A comparison between smokers and non-smokers. *Clinical Cancer Investigation Journal* 3, 49.

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

Karahalil, B., Karakaya, A., and Burgaz, S. (1999). The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 442, 29-35.

Karin Klimo, Renate Steinle, and Frank, N. (2010). Identification and evaluation of novel potential cancer chemopreventive agents (German Cancer Research Center).

Kashiyap, B., and Reddy, S.P. (2012). Micronuclei assay of exfoliated buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases *Journal of Cancer Research* 8, 184-191.

Khelifi, R., and Hamza-Chaffai, A. (2010). Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: A review. *Toxicology and applied pharmacology* 248, 71-88.

Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., and Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology* 254, 86-99.

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

Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., and Georgakilas, A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711, 193-201.

Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E., Engstrom, P.F., Clapper, M.L., and Schnoll, R.A. (2003). *Carcinogenic and Genotoxic Effects of Tobacco Constituents*, 6th edn (BC Decker Inc.).

Ladeira, C., Gomes, M.C., and Brito, M. (2010). Lifestyle factors influence in the frequency in buccal micronucleus. In *Repositorio científico Universidad del Instituto politecnico de Lisboa (Europena Journal of Cancer Supplements)*, pp. 20.

Landi, M.T., Dracheva, T., Rotunno, M., Figueroa, J.D., Liu, H., Dasgupta, A., Mann, F.E., Fukuoka, J., Hames, M., and Bergen, A.W. (2008). Gene expression signature of cigarette smoking and its role in lung adenocarcinoma development and survival. *PloS one* 3, e1651.

Li, N., Sun, Z., Han, C., and Chen, J. (1999). The chemopreventive effects of tea on human oral precancerous mucosa lesions. *Experimental Biology and Medicine* 220, 218-224.

Londoño, C., García, W., Valencia, S.C., and Vinaccia, S. (2005). Expectativas frente al consumo de alcohol en jóvenes universitarios colombianos.

López-Antuñano, F. (2013). Origen y consecuencias del humo tóxico de tabaco. Guía para la erradicación de atmósferas envenenadas (Mexico: Instituto para la Atención y Prevención de las Adicciones en la Ciudad de México IAPA

Alianza contra el Tabaco A.C).

Lowry, L.K. (1995). Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risks. *Toxicology letters* 77, 31-38.

Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M., and Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology letters* 192, 3-16.

Ministerio de Protección Social, E.N.d.E., Instituto Nacional de Cancerología (2010). Plan Nacional para el control del Cáncer en Colombia 2010-2019.

Mohanta, A., Mohanty, P.K., and Parida, G. (2013). Genotoxicity of tobacco and alcohol on human oral mucosal cells. *European Journal of Experimental Biology* 3, 503-514.

Mondal, N.K., Ghosh, S., and Ray, M.R. (2011). Micronucleus formation and DNA damage in buccal epithelial cells of Indian street boys addicted to gasp 'Golden glue'. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 721, 178-183.

Morse, D.E., Psoter, W.J., Cleveland, D., Cohen, D., Mohit-Tabatabai, M., Kosis, D.L., and Eisenberg, E. (2007). Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer Causes Control* 18, 919-929.

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.

Murgia, E., Ballardin, M., Bonassi, S., Rossi, A.M., and Barale, R. (2008). Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 639, 27-34.

Naderi, N.J., Farhadi, S., and Sarshar, S. (2012). Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 55, 433.

- Nagaraj, N.S., Beckers, S., Mensah, J.K., Waigel, S., Vigneswaran, N., and Zacharias, W. (2006). Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. *Toxicology letters* 165, 182-194.
- Navarro, E., Vargas, R., Martínez, R., Padilla, B., Ruiz, D., and Thorne, B. (2012). Factores asociados al consumo de cigarrillo en adultos del suroccidente de Barranquilla (Colombia). *Revista Científica Salud Uninorte* 21.
- 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. *Journal of Health Sciences* 3, 196-204.
- 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.
- Norppa, H. (2004a). Cytogenetic biomarkers. IARC scientific publications, 179.
- Norppa, H. (2004b). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology letters* 149, 309-334.
- Ogden, G.R. (2005). Alcohol and oral cancer. *Alcohol* 35, 169-173.
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P, L.F., and Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79, 593-616.
- OMS (2005). Convenio Marco de la OMS para el Control de Tabaco, Organización Mundial de la Salud, ed.
- Oppeltz, R.F., and Jatoi, I. (2011). Tobacco and the Escalating Global Cancer Burden. *Journal of Oncology* 2011, 8.
- Özkul, Y., Donmez, H., Erenmemisoglu, A., Demirtas, H., and Imamoglu, N. (1997). Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis* 12, 285.

- Palaskar, S., and Jindal, C. (2010). Evaluation of micronuclei using papanicolaou and may grunwald giemsa stain in individuals with different tobacco habits—A Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 4, 3607-3613.
- Pardo, C., and Piñeros, M. (2010). Consumo de tabaco en cinco ciudades de Colombia, Encuesta Mundial de Tabaquismo en Jóvenes, 2007. *Biomédica* 30, 509-518.
- Parra, D.B., Pinzón, M.D., Martín, L.M.S., and Rojas, J.D.G. (2003). Encuesta de prevalencia sobre el consumo de cigarrillo en la Pontificia Universidad Javeriana. *Univ Psychol Bogotá (Colombia)* 2, 89-94.
- 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.
- Perera, F.P., and Weinstein, I.B. (2000). Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 21, 517.
- Pérez, M.A., and Pinzón, H. (2005). Uso del tabaco entre los jóvenes colombianos Retos para los profesionales en salud pública. *Revista Científica Salud Uninorte* 21.
- Pichon-Riviere, A., Bardach, A., Alcaraz, A., Caporale, J., Augustovski, F., Peña Torres, E., Osorio, D., Pérez Acevedo, J., Gamboa Garay, O., and Gamboa Garay, C. (2013). Carga de Enfermedad atribuible al Tabaquismo en Colombia. (Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria, Buenos Aires, Argentina).
- Piyathilake, C., Macaluso, M., Hine, R., Vinter, D., Richards, E., and Krumdieck, C. (1995). Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency, and occurrence of micronuclei in epithelial cells of the buccal mucosa. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 4, 751.
- Pradeep, M., Yadavalli, G., Maji, J., Kartikay, S., Deepa, K., and Vishnudas, P. (2014). Comparative study of genotoxicity in different tobacco related habits using micronucleus assay in exfoliated buccal epithelial cells. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 8, 21-24.
- Ramirez, A., and Saldanha, P.H. (2002). Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetics and Molecular Research* 1, 246-260.
- Reidy, J., McHugh, E., and Stassen, L. (2011). A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The Surgeon* 9, 278-283.
- Reis, S.R.d.A., Sadigursky, M., Andrade, M.G.S., Soares, L.P., Espírito Santo, A.R.d., Bôas, V., and Souza, D. (2002). Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 16, 221-225.

- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 49, 1603-1616.
- Reznick, A.Z., Klein, I., Eiserich, J.P., Cross, C.E., and Nagler, R.M. (2003). Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 377-384.
- Ribeiro, D., De Oliveira, G., De Castro, G., and Angelieri, F. (2014). Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children.
- Rico, J.L., Arias, I., Varela, L., Ruiz, M., Gutiérrez, R., Garavito, P., and Silvera Redondo, C. (2010). Análisis de la frecuencia de micronúcleos como biomarcador de genotoxicidad en un grupo de fumadores de la ciudad de Barranquilla. *Iatreia* 23, S-34.
- Ruiz, A.M., Gómez, I.R., Rubio, C., Revert, C., and Hardisson, A. (2004). Efectos tóxicos del tabaco. *Revista de Toxicología* 21, 64-71.
- Sacks, P.G., Zhao, Z.-L., Kosinska, W., Fleisher, K.E., Gordon, T., and Guttenplan, J.B. (2011). Concentration dependent effects of tobacco particulates from different types of cigarettes on expression of drug metabolizing proteins, and benzo (a) pyrene metabolism in primary normal human oral epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2348-2355.
- 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.
- Sasco, A., Secretan, M., and Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung cancer* 45, S3-S9.
- Schlage, W.K., Iskandar, A.R., Kostadinova, R., Xiang, Y., Sewer, A., Majeed, S., Kuehn, D., Frentzel, S., Talikka, M., and Geertz, M. (2014). In vitro systems toxicology approach to investigate the effects of repeated cigarette smoke exposure on human buccal and gingival organotypic epithelial tissue cultures. *Toxicology mechanisms and methods* 24, 470-487.
- Shafey, O., Eriksen, M., Ross, H., and Mackay, J. (2010). *The Tobacco Atlas*, B.H. Group, ed. (EE.UU: American Cancer Society).
- Sharma, V., Chowdhary, D., Agarwal, S., and Jain Aarushi, S.V. (2013). A comparative study of oral epithelium in tobacco and alcohol consumers in central rajasthan population.

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.

Spitz, M.R., and Bondy, M.L. (2010). The evolving discipline of molecular epidemiology of cancer. *Carcinogenesis* 31, 127.

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.

Stich, H., Rosin, M., and Vallejera, M. (1984a). Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in Asian betel nut and tobacco chewers. *The Lancet* 323, 1204-1206.

Stich, 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.F., Rosin, M.P., Hornby, A.P., Mathew, B., Sankaranarayanan, R., and Nair, M.K. (1988). Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *International Journal of Cancer* 42, 195-199.

Stich, H.F., Stich, W., Rosin, M.P., and Vallejera, M.O. (1984b). Use of the micronucleus test to monitor the effect of vitamin A, beta-carotene and canthaxanthin on the buccal mucosa of betel nut/tobacco chewers. *International journal of cancer* 34, 745-750.

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.

Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., Van Benthem, J., Wester, P., and Opperhuizen, A. (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *International journal of environmental research and public health* 8, 613-628.

Terriquez, S., Aburto, N., Zavala, J., and Torres, O. (2006). Genotoxicidad del exceso de peso en el adulto, mediante la prueba de micronúcleos y otras anomalías nucleares en la mucosa bucal.

Thomas, P., Fenech, M., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., and Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 682, 235.

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.

Toh, Y., Oki, E., Ohgaki, K., Sakamoto, Y., Ito, S., Egashira, A., Saeki, H., Kakeji, Y., Morita, M., and Sakaguchi, Y. (2010). Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. *International journal of clinical oncology* 15, 135-144.

Tolbert, P., Shy, C., and Allen, J. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 271, 69-77.

Torres, I.C.S., Arévalo, M.T.V., de Rodríguez, D.C., and Cuevas, J.R.T. (2006). El consumo de alcohol y tabaco en jóvenes Colombianos; factores psicosociales de riesgo y protección. *Psicología Conductual* 14, 77-101.

Tucker, J.D., and Preston, R.J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 365, 147-159.

Vineis, P., Alavanja, M., Buffler, P., Fontham, E., Franceschi, S., Gao, Y.-T., Gupta, P.C., Hackshaw, A., Matos, E., and Samet, J. (2004). Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 99-106.

Warnakulasuriya, S., Sutherland, G., and Scully, C. (2005). Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral oncology* 41, 244-260.

WHO (1995). Physical status: The use of and interpretation of anthropometry, Report of a WHO Expert Committee, W.H. Organization, ed. (World Health Organization).

WHO (2006). Tobacco: deadly in any form or disguise, W.H. Organisation, ed. (Switzerland).

WHO (2008). Report on the Global Tobacco Epidemic: The MPOWER package, World Health Organization, ed.

WHO (2011). Report on the Global Tobacco Epidemic, 2011: Warning about the dangers of tobacco.

Wogan, G., Hecht, S., Felton, J., Conney, A., and Loeb, L. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminar in Cancer Biology* 14, 473-486.

Wu, P., Loh, C., Hsieh, L., Liu, T., Chen, C., and Liou, S. (2004). Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 562, 27-38.

Xue, J., Yang, S., and Seng, S. (2014). Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers* 6, 1138-1156.

Zamani, A.G., Durakbasi-Dursun, H.G., Demirel, S., and Acar, A. (2011). Evaluation of smoking genotoxicity in Turkish young adults. *Indian journal of human genetics* 17, 7.

Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A.G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-biological interactions* 188, 334-339.

Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2011). Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711, 167-173.



Universidad
del Cauca

Código MNCB
Fecha
Lugar

ANEXO A: CONSENTIMIENTO INFORMADO
EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL, COMO UN BIOMARCADOR DE DAÑO GENÉTICO EN UNA POBLACION FUMADORA DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

Yo _____ con cédula de ciudadanía _____ de _____, se me ha solicitado el favor de participar voluntariamente como sujeto de estudio en una investigación titulada "EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL, COMO UN BIOMARCADOR DE DAÑO GENÉTICO EN UNA POBLACION FUMADORA DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA" trabajo de grado realizado por Juliana Salazar Benítez 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.

METODOLOGÍA: Se realizará una entrevista escrita, hecha con preguntas puntuales, con el propósito de tener datos que ayudarán a determinar algunas características demográficas, exposición a factores de riesgo, historia familiar de enfermedades no transmisible, estilo de vida, entre otras, los cuales serán tenidos en cuenta para la realización del análisis estadístico. Las células exfoliadas de epitelio bucal serán colectadas haciendo uso de un cepillo citológico estéril con el cual cada individuo realizará un frotis del tejido epitelial de las mejillas. Luego el cepillo será introducido en un tubo FALCON de 15mL lleno previamente con 5mL de Buffer para células bucales, para ser luego llevado al laboratorio donde se realizarán diferentes procesos, que permitirán hacer los montajes de las células en los portaobjetos, para realizar la prueba citogenética de Micronúcleos.

PROPÓSITO: Determinar el daño genético ocasionado por el consumo de cigarrillo, por medio del biomarcador de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa bucal en una población joven y sana del departamento del Cauca con el fin de establecer 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.

RIESGO: Éste estudio no representa ningún tipo de riesgo para los participantes, además se garantiza que la información obtenida en el cuestionario y de todas las muestras tendrán un código único y serán mantenidas bajo estricta privacidad y confidencialidad, por lo que solo el investigador principal tendrá la información completa de cada participante.

NUMERO DE PARTICIPANTES: El número aproximado será de 150 individuos

CLAUSULAS ESTANDAR:

- Entiendo que el consentimiento voluntario es requerido para todas las personas que participan en este proyecto.
- Entiendo que completaré un cuestionario facilitando información como teléfono y dirección que podrá ser utilizada para contactarme si existe la necesidad en el futuro.
- Permitiré que se me tome una muestra de mucosa bucal haciendo uso de un cepillo citológico.
- Entiendo que 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.
- Me han explicado en un lenguaje que yo puedo entender el propósito de la investigación, los beneficios, los procedimientos y riesgos por participación.
- Entiendo que no recibiré ninguna compensación económica (dinero) por mi participación.
- Entiendo que los resultados de este estudio pueden ser divulgados en eventos nacionales y/o internacionales o ser publicados en revistas científicas sin identificar mi nombre.

Después de entendida la finalidad del proyecto, dejo constancia que acepto voluntariamente participar como sujeto de investigación en el proyecto antes mencionado, por lo tanto, firmo para ingresar al estudio.

Nombre del participante

Firma del participante

Fecha

Como constancia firma:

Firma del estudiante a cargo

Firma del testigo



Universidad
del Cauca

Código MNCB

Fecha

Lugar

ANEXO B: ENTREVISTA

EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA BUCAL, COMO UN BIOMARCADOR DE DAÑO GENÉTICO EN UNA POBLACION FUMADORA 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 (años)
Estado civil	Casado	Soltero	Otros
Oficio y nivel de educación			Estrato

II. INFORMACION SOBRE ESTADO DE SALUD

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

Consumo algún tipo de medicamento ¿Cuál y por cuanto tiempo?	
Desde	Hasta
Consumo algún suplemento vitamínico ¿Cual y por cuanto tiempo?	
Desde	Hasta
¿En los últimos 2 años ha sido expuesto a irradiación?	¿Cada cuanto visita al odontólogo?
	¿Cuántas veces al día cepilla sus dientes?

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

Consumo de bebidas alcohólicas	NO	SI	Aguardiente	Ron	Cerveza	Chicha	Vino
			Whisky	Tequila	Brandy	Viche	Otros
Frecuencia de consumo	Cantidad (botellas o copas)			Días al / mes		Hace cuanto	



Universidad
del Cauca

Código MNCB

Fecha

Lugar

VI. MEDIDAS Y ESTADO FÍSICO

Medidas antropométricas	Estatura			Peso			IMC		
Realiza actividad física por semana	0	1	2	3	4	>4	Esporádico		
¿Cuántas horas al día?	1		2		3		>3		

VII. ANTECEDENTES FAMILIARES

Trastorno	Descripción
Malformaciones de nacimiento	Familiar Tipo
Cáncer hereditario	Familiar Tipo

VIII. INFORMACIÓN NUTRICIONAL

¿Cuántas comidas consume al día?	1	2	3	4	5	>5
¿Qué tipo de alimentos consume en sus comidas?	Harinas	Frutas	Verduras	Carnes	Grasas	
¿A qué horas son sus comidas?	Desayuno	Entre día	Almuerzo	Entre tarde	Comida	

1. CONSUMO DE HARINAS										
Cuántas harinas consume al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico			
Qué tipo de harinas consume	Papa	Yuca	Arroz	Plátano	Pan	Pastas	Arepa			
En qué momento del día	Desayuno	Entre día	Almuerzo	Entre tarde	Comida					
2. CONSUMO DE FRUTAS										
Cuántas frutas consume al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico			
Qué tipo de frutas consume	Uva	Naranja	Manzana	Guayaba	Mora	Otros				
	Piña	Banano	Mandarina	Limón	Lulo					
	Pera	Papaya	Granadilla	Maracuyá	Fresa					
En qué momento del día	Desayuno	Entre día	Almuerzo	Entre tarde	Comida					
Consumo a la semana / días										
3. CONSUMO DE VEGETALES										
Cuántos consume al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico			
Qué tipo consume	Zapallo	Pimentón	Tomate	Pepino	Apio	Otros				
	Cebolla	Zanahoria	Lechuga	Remolacha	Ajo					
	Coliflor	Espinaca	Brócoli	Calabacín	Rábano					
En qué momento del día	Desayuno	Entre día	Almuerzo	Entre tarde	Comida					
Consumo a la semana/ días										
4. CONSUMO DE CARNES										
Cuántas carnes consume al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico			
Qué tipo de carne consume	Res	Pollo	Cerdo	Pavo	Pescado	Cordero				
En qué momento del día	Desayuno	Entre día	Almuerzo	Entre tarde	Comida					
Consumo a la semana/ días										



Universidad
del Cauca

Código MNCB

Fecha

Lugar

5. CONSUMO DE LACTEOS													
Cuántos lácteos consume al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico						
Qué tipo de lácteos consume	Leche		Yogurt		Queso		Jugos en leche			Otros			
En qué momento del día	Desayuno		Entre día			Almuerzo		Entre tarde		Comida			
Consumo a la semana/ días													
6. CONSUMO DE LEGUMBRES													
Cuántos consumes al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico						
Que tipo de legumbre consume	Fríjol		Lentejas		Abas		Otros						
	Ulluco		Garbanzos		Blanquillos								
En que momento del día	Desayuno		Entre día			Almuerzo		Entre tarde		Comida			
Consumo a la semana/ días													
7. CONSUMO DE BEBIDAS													
Cuántas consumes al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico						
Qué tipo de bebida consume	Café		Chocolate			Té		Otros					
	Gaseosa		Jugos			Agua							
En que momento del día	Desayuno		Entre día			Almuerzo		Entre tarde		Comida			
Consumo a la semana/ días													
8. CONSUMO DE HUEVO													
Cuántos huevos consume al día	0	1	2	3	4	>4	Esporádico						
En que momento del día	Desayuno		Ente día			Almuerzo		Entre tarde		Comida			
Consumo a la semana/ días													
9. CONSUMO DE FIBRA													
Cuántos consume al día													
Qué tipo de fibra consume	Avena		Ajonjolí		Cereal		Pasas		Almendras		Otros		
	Cebada		Linaza		Nueces		Maní		Soja				
Consumo a la semana/ días													
10. CONSUMO DE COMIDAS RÁPIDAS													
Cuántas consumes a la semana	0	1	2	3	>3	Esporádico							
Que tipo consume	Perro		Hamburguesa		Pizza		Sándwich		Otros				