



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO  
CAMPUS CHAPULTEPEC

---

Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo

Incorporada a UNAM

ESTUDIO DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL CIGARRILLO  
EN ADOLESCENTES POR MEDIO DEL CONTEO DE  
MICRONÚCLEOS (MNs) EN CÉLULAS EXFOLIADAS DE  
EPITELIO BUCAL

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**GUILLERMO PEDRO CHAN TORRANO**

Director de tesis: Q.F.B Martha Luna Ontiveros

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

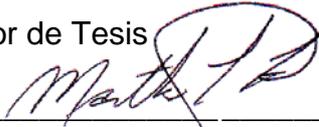
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Presidente	M en C. Hinojosa López Isidro.
Vocal	M en C. Giménez Scherer Juan Antonio.
Secretario	Q.F.B. Luna Ontiveros Martha Laura.
1er. Suplente	Dr. Del Rey Pineda Guillermo.
2do. Suplente	Q.F.B. Ma Esperanza Hernández Koelig.

### JURADO ASIGNADO

**Lugar donde se realizó la tesis:** Laboratorios de la Universidad del Valle de México Campus Chapultepec, en colaboración con la Escuela Secundaria Técnica 94 "Ciro González Blacayer", ubicada cerca de las inmediaciones de Venta de Carpio, Hidalgo, Pachuca.

Director de Tesis



Q.F.B. Martha Laura Luna Ontiveros

Sustentante



Guillermo Pedro Chan Torrano

## *Agradecimientos.*

*En este trabajo se plasma el conjunto de muchos esfuerzos, buenos deseos, oportunidades e innumerables consejos...*

*Todas y cada una de estas paginas, están forjadas del apoyo de muchas personas que a lo largo de este tiempo han aportado desde una coma o un acento, hasta una redacción a los cuales les brindo estas letras...*

*A ti mamá, que madrugaste y te desvelaste por muchas noches acompañándome siempre e incondicionalmente, que me ayudaste y me colmaste de buenos consejos, pidiéndome solo un favor... que fuese lo que quisiera ser, pero que fuera el mejor...*

*A ti papá por guiar mi camino y siempre tener una respuesta a mis dudas, por apoyarme en todo momento con tu cariño y un sin fin de lecciones; no olvidando decirme siempre, "estudia para obtener un once, si te equivocas en una... tendrás diez..."*  
*Gracias a ustedes dos, mis dos maravillosos padres Gilda y Guillermo, por confiar y creer siempre en mi y a los cuales les debo lo que soy.*

*A mi hermano Rodrigo por estar conmigo siempre; por tener el mismo horario que yo y por compartir mi sueño en todo momento, por esas tardes en las que te sentaste conmigo y me ayudaste a seguir dándome animo.*

*A Martha Luna, por el sin número de consejos, enseñanzas, apoyo, confianza y amistad, compartiendo su experiencia en todos esos momentos en los cuales hemos participado y difundido nuestra investigación.*

*A Isidro Hinojosa, por recordarme en todo momento que el éxito es el resultado del esfuerzo y la dedicación... y por esos consejos que me han hecho crecer tanto en lo profesional como en lo personal.*

*A Juan Antonio J. Scherer, por confiar en mí desde un principio y guiarme con sabias lecciones que me ayudaron paso a paso en el progreso de este proyecto y de la historia de la cual forma parte.*

*A Guillermo Del Rey, por darme parte de su vasta experiencia en el ámbito profesional, y hacerme parte de un sin fin de palabras que me hicieron crecer durante mi formación, recordándome que el éxito es fácil de obtener, lo difícil es merecerlo.*

*A Esperanza H. Koelig, por darme esos consejos para afinar cada uno de los detalles que conforman esta investigación, por recordarme que la calidad, es un valor que debemos aplicar todos los días.*

*A Rubén, Jorge y Cesar, que sin ellos no hubiera sido posible iniciar esta investigación, por todos los momentos y lugares en los cuales compartimos nuestro proyecto, y lo vimos crecer día a día y a ti Rosalinda por custodiar mis muestras y ser esa parte especial en mi vida.*

***A todos, absolutamente a todos los que han creído en mí... Gracias!!!***

Este trabajo se realizó en los laboratorios de la Universidad del Valle de México Campus Chapultepec, en colaboración con la Escuela Secundaria Técnica 94 “Ciro González Blacayer”, ubicada cerca de las inmediaciones de Venta de Carpio, Hidalgo, Pachuca.

Bajo la tutoría de la Q.F.B. Martha Luna Ontiveros.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
JUSTIFICACIÓN DEL ENSAYO	9
SUMMARY	10
PROLOGO	11
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>CAPITULO 2. BIOMARCADORES</b>	14
2.1.- Origen de Micronúcleos	15
2.2.- Elementos de confusión de Micronúcleos	18
<b>CAPITULO 3.- ANTECEDENTES</b>	21
Influencia del tabaco en los tejidos bucales	
3.1.- Principales compuestos tóxicos del tabaco	24
3.2.- Principales variedades de cigarrillos	27
3.3.- Influencia del humo del cigarrillo en la salud	38
3.4.- Genes RAS	42
3.5.- Fuentes de benzopireno	44
3.6.- Superóxido dismutasa, como potente inhibidor de oxidación celular	48
3.7.- Factores de variabilidad en fumadores	50
3.8.- Cáncer de pulmón, como efecto colateral por consumo de cigarrillo	52
<b>CAPITULO 4.- ASPECTOS GENERALES DE LA CAVIDAD BUCAL</b>	54
<b>CAPITULO 5.- ASPECTOS GENERALES SOBRE EL EPITELIO BUCAL</b>	56
5.1.- Renovación epitelial.	57
5.2.- Formación de queratina	59
5.3.- Capas del epitelio bucal	60

<b>CAPITULO 6.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	63
6.1.- Hipótesis	63
6.2.- Objetivo general	63
<b>CAPITULO 7.- METODOLOGÍA</b>	63
7.1.- Sujetos de estudio	65
7.2.- Toma de muestras	65
7.3.- Fijación de muestras	66
7.4.- Tinción con fucsina básica	66
7.5.- Microscopia de muestras	67
7.6.- Criterio de identificación de MNs	68
7.7.- Criterio para cuantificación	69
<b>CAPITULO 8.- RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA</b>	70
8.1.- Graficas comparativas	72
<b>CAPITULO 9.- ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	91
<b>CAPITULO 10.- CONCLUSIONES</b>	93
<b>CAPITULO 11.- BIBLIOGRAFÍA</b>	95

## INDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

TABLAS	TITULO	PAGINA
TABLA 1.	Resultados de estudio clínico, en donde se presenta una relación entre el compuesto químico y la cantidad de los mismos que inhala un sujeto por hora, por la acción de fumar.	18
TABLA 2.	Tabla descriptiva del producto, grado adictivo, carcinogénicos, uso seguro demostrado, regulación de las sustancias contenidas para la salud del consumidor.	31
TABLA 3.	Prevalencia de células micronucleadas en de descamación.	46
TABLA 4.	Alteraciones celulares degenerativas.	51
TABLA 5.	Descripción de los epitelios más comunes del cuerpo humano.	56
TABLA 6.	Resultados de la Microscopia.	64

GRAFICAS	TITULO	PAGINA
GRAFICA 1.	Mortandad atribuible al tabaquismo en la Unión Europea (en miles), España 2001.	34
GRAFICA 2.	Mortandad atribuible al tabaquismo en España en población de más de 35 años.	35
GRAFICA 3.	Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 5 MNs representando un daño a nivel citogenético.	68
GRAFICA 4.	Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	69
GRAFICA 5.	Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica dos (2) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	70
GRAFICA 6.	Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	71
GRAFICA 7.	Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica un caso en el cual el individuo presenta 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	72
GRAFICA 8.	Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	73

GRAFICA 9.	Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica dos (2) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	74
GRAFICA 10.	Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	75
GRAFICA 11.	Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica un caso en el que el individuo presenta 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	76
GRAFICA 12.	Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el casos del individuo masculino que presenta 5 MNs representando un daño a nivel citogenético.	77
GRAFICA 13.	Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	78
GRAFICA 14.	Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica un caso en el que el individuo presenta 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	79
GRAFICA 15.	Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	80
GRAFICA 16.	Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica dos (2) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.	81
GRAFICA 17.	Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 2 MNs.	82
GRAFICA 18.	Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 3 MNs Vs 1 MNs del caso femenino.	83
GRAFICA 19.	Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 1 MN Vs 0 MNs del caso femenino	84
GRAFICA 20	Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 2 MNs Vs 1 MN del caso femenino.	85
GRAFICA 21.	Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 1 MN Vs 0 MNs del caso femenino.	86



## **JUSTIFICACIÓN DEL ENSAYO**

Con el interés de determinar de una manera oportuna el daño citogenético en los individuos de estudio, causado por la exposición directa a la abundante mezcla de xenobioticos específicamente del humo del cigarrillo, se aplico el uso de un bioensayo que tuviera tres características principales: practico, accesible y justipreciadle.

Practico en cuanto a la toma de muestra, accesible en el manejo de la misma en el laboratorio, así como justipreciadle en la información oportuna y puntual que nos muestre el incremento de MNs en células del epitelio bucal para evaluar el daño causado por los más de 4,000 componentes oxidantes, nitrantes, metales pesados y vaso constrictores, que resultan de la combustión del tabaco, con antecedentes y características carcinogénicas.

Esta técnica se usa como marcador biológico de exposición, debido a que aporta datos importantes en relación al daño causado por el consumo de cigarrillos, por lo cual un individuo fumador puede evaluar que tan severo es el daño que tiene y considerar la posibilidad que tiene de desarrollar algún tipo de cáncer tomando en cuenta factores como la predisposición genética, antecedentes familiares que hayan presentado casos de cáncer, el tipo de alimentación, zona geográfica de residencia, entre otros.

## Summary.

The micronucleus are the biological markers of the cigarette consumption effect; they are early detector of xenobiotics exposition, which are potential generators of mutational pathologies.

It has been demonstrated a relation between the pulmonary cancer and tobacco's use. Therefore the morbidity attributable relative risk to the smoke habit is higher than 90%, and the detection of cancer in other sites is related to a 60 – 70% the habit of smoke, as the larynx cancer, buccal cavity, esophagus, bladder, kidney, pancreas and other cancers could be for urinary type.

In this way since the buccal cavity mucosa exfoliated cells, it has been observed that the damage is increased in relation with the total number of cigarettes consumed per day and the time in which the individuals were exposed to xenobiotics of the cigarette's smoke.

In such way the finding of MNs by microscopy in the epithelial desquamation cells of the mouth, is a suitable biomarker to detect early effects, and can be used for the monitoring in humans, because this type of cells are the first in the xenobiotics which in this particular study is the tobacco.

Consequently the results showed a higher frequency of cases in individuals of the masculine sex in which the number of MNs is considerably higher.

Associated to this, we have observed that the time of exposition of the cigarettes smoke is the xenobiotics of the smoke of the cigarette is a key factor, because the relation that is observed is proportional to the exposition time to them and the MNs number is increased in a considerable way in men, being this group the one that greater consumer cigarettes a day.

Taking as compassion to the female group, that it consumes less cigarettes to the day and therefore they presents small number of MNs. In this way we validated our initial hypothesis in which we are proposing that to a greater amount of smoked cigarettes and the time of exhibition and consumption, the predisposition to develop some kind of cellular damage in the exposed individuals to this kind of toxins, would be more elevated, like the smoke of the cigarette is.

To present a carcinogenic damage and therefore a possible predisposition to develop some type of cancer, we had to find a number greater to 6 MNs by each 3.000 analyzed cells.

## **PROLOGO.**

Los Micronúcleos resultan ser los biomarcadores del efecto del consumo del cigarrillo, son detectores tempranos de la exposición a xenobióticos, generadores potenciales de patologías de origen mutacional. Se ha demostrado una relación del uso del tabaco con el cáncer pulmonar; por lo que el riesgo relativo de morbilidad atribuido al hábito de fumar, es mayor de 90%, y entre un 60% y 70% atribuible a la aparición de cáncer en otros sitios que se relacionan con la acción de fumar, tal y como es el caso del cáncer de laringe, cavidad bucal, esófago, vejiga, riñón, páncreas y otros cánceres como pueden ser de tipo urinario.

Es así, como a partir de células exfoliadas de la mucosa bucal, hemos observado que el daño se incrementa en relación al número de cigarrillos consumidos por día y el tiempo al que estuvieron expuestos los individuos a los xenobioticos del humo del cigarrillo.

De tal modo que el hallazgo de MNs por microscopía en las células de descamación epitelial de la boca, es un biomarcador adecuado para detectar efectos tempranos y puede ser utilizada para el monitoreo en humanos, debido a que este tipo de células, son las primeras en interactuar con los "xenobióticos", que para este estudio en particular resulta ser – el tabaco-.

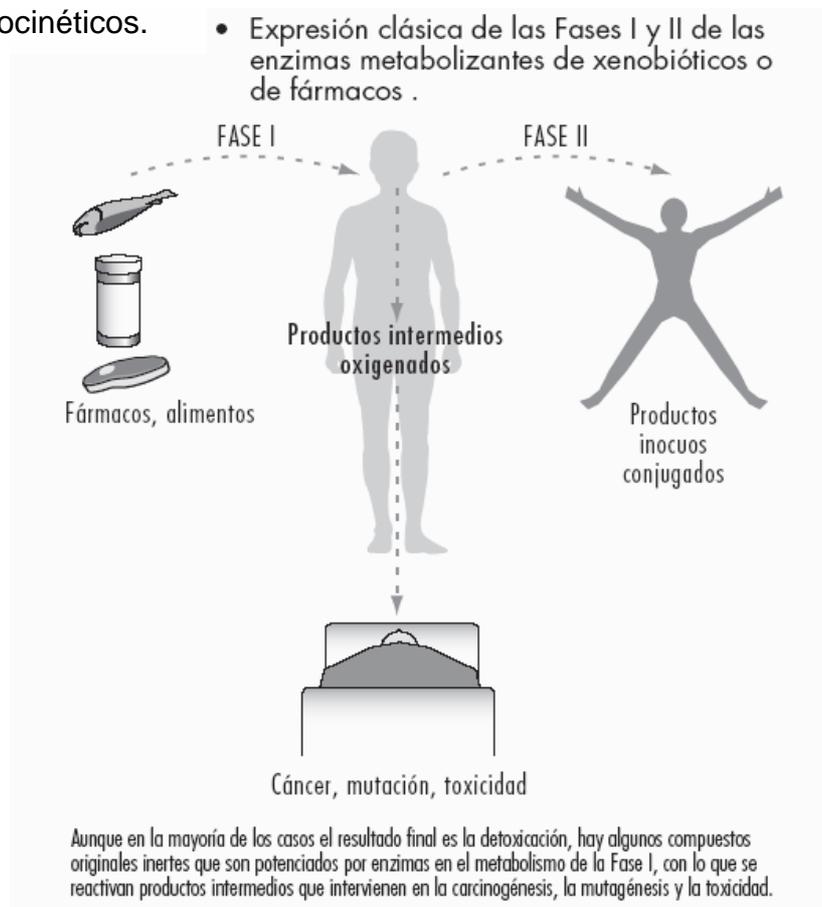
En consecuencia los resultados mostraron una frecuencia mayor de casos en individuos del sexo masculino en los cuales el número de MNs, es considerablemente mayor.

Asociado a esto, hemos observado que el tiempo de exposición a los xenobioticos del humo del cigarrillo es un factor clave, ya que la relación que se observa es proporcional al Tiempo de Exposición a los mismos y el No de MNs se incrementa de forma considerable en el caso de los varones, siendo este grupo el que mayor número de cigarrillos consume al día, esto tomando como patrón de comparación al grupo femenino, que consume menos cigarrillos al día y por ende presentando menor número de MNs, con lo cual validamos nuestra hipótesis inicial en la que se propone que a mayor cantidad de cigarrillos fumados y al tiempo de exposición y consumo, sería más elevada la predisposición a desarrollar algún tipo de daño celular en los individuos expuestos a este tipo de toxinas, como es el humo del cigarrillo.

Para que exista un daño carcinogénico y por ende una posible predisposición a desarrollar algún tipo de cáncer, debíamos encontrar un numero mayor a 6 MNs por cada 3,000 células analizadas.

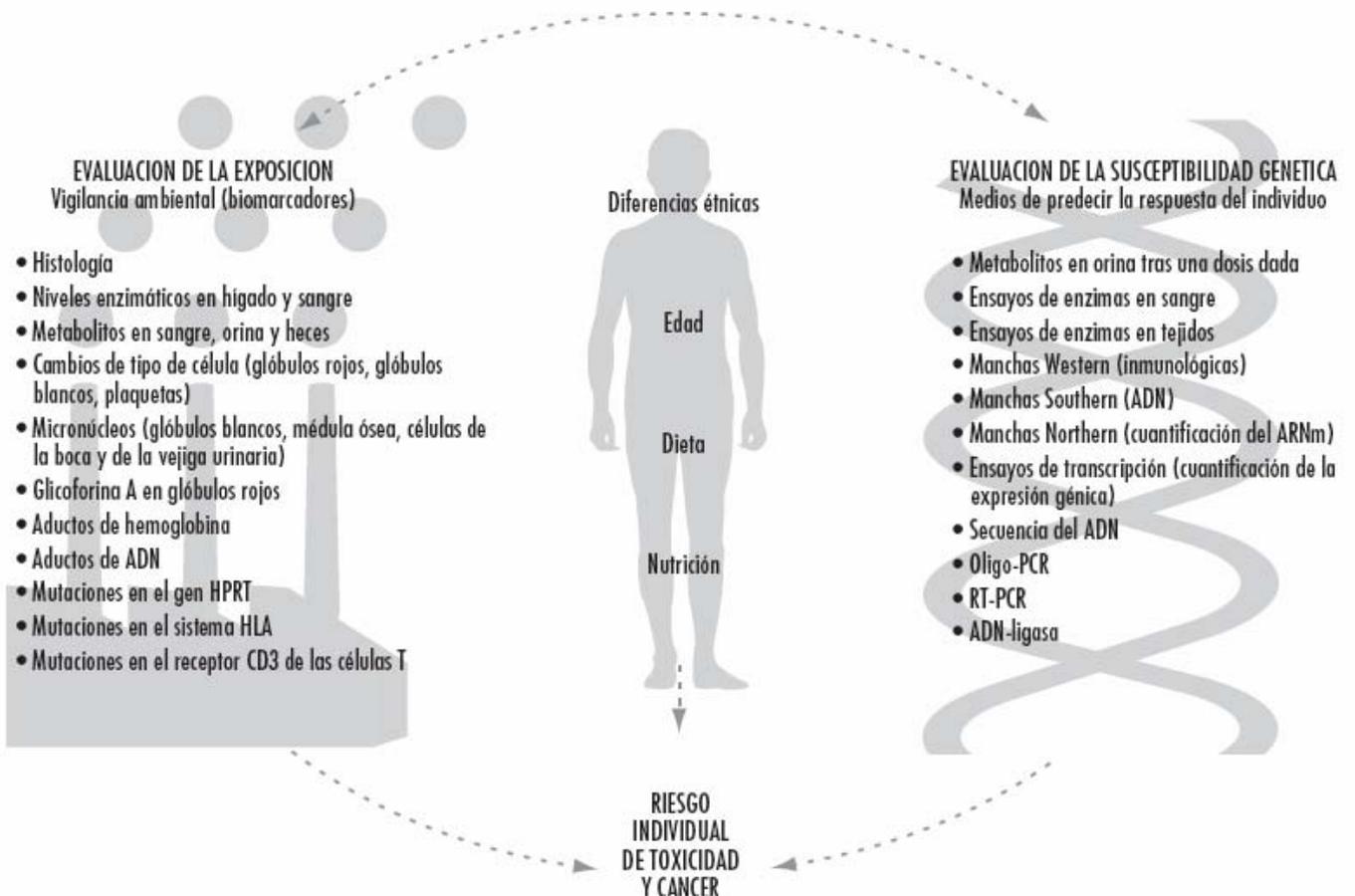
## 1. INTRODUCCIÓN.

Sin lugar a dudas, en la actualidad, el organismo humano suele estar expuesto simultánea y/o consecutivamente a diversos agentes tanto físicos, químicos y biológicos, por tal motivo debemos tener en cuenta que con frecuencia algunas personas consumen fármacos, fuman, beben alcohol o alimentos que contienen ciertos aditivos, además de otros factores tales como el estilo de vida, los cambios climáticos (debido al progresivo debilitamiento de la capa de ozono), los tratamientos médicos, algunos polimorfismos genéticos, por mencionar algunos, son capaces de influir en la integridad cromosómica; es decir, que el organismo está siendo sometido a una exposición múltiple. Dichos agentes tanto físicos, químicos y biológicos, pueden interactuar entre sí en cada fase de los procesos toxicocinéticos y/o toxicodinámicos, por lo que el organismo humano al estar expuesto de manera habitual a dos o más xenobióticos es necesario considerar la posibilidad de que existan algunos efectos combinados, que pueden acelerar o desacelerar los procesos toxicocinéticos.



Es importante, por todo ello, determinar lo que se conoce como un nivel “aceptable” de daño genético en una población concreta, realizando ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria y monitorear aquellos individuos que, por su ocupación laboral o estilo de vida, se encuentran más expuestos o con mayor riesgo de sufrir alteraciones capaces de modificar su estabilidad genética <sup>1</sup>.

Por lo anterior, la mayoría de los agentes que dañan los ácidos nucleicos cuando existen exposiciones a dosis elevadas evocan efectos citotóxicos específicos en un amplio conjunto de procesos celulares, por lo que uno de los objetivos de la toxicología genética es detectar y estimar el riesgo de daño genético que produce la exposición a los agentes que tienen afinidad por dichos ácidos nucleicos y que a la vez son capaces de incluir alteraciones a concentraciones subtóxicas.<sup>2</sup>



## 2.- BIOMARCADORES.

El término biomarcador, o marcador biológico, lo podemos definir como cualquier alteración que se produce en un sistema biológico, en este caso el cuerpo humano, y que puede ser cuantificable en tejidos, células o fluidos corporales. Es importante mencionar que tanto en el ámbito de la salud como en el laboral, los biomarcadores suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o de riesgo de enfermedad.

Los marcadores biológicos se clasifican por lo general en tres tipos concretos:

- **Biomarcadores de exposición:**

Pueden ser compuestos exógenos (o un metabolito) que se introducen en el cuerpo, un producto interactivo entre el compuesto (o metabolito) y un componente endógeno, o cualquier otro hecho relacionado con la exposición.

- **Biomarcadores de efecto:**

Pueden ser componentes endógenos o medidas de la capacidad funcional, o cualquier otro indicador del estado o equilibrio del cuerpo o de un sistema orgánico afectado por la exposición. Suelen utilizarse como indicadores preclínicos de anomalías.

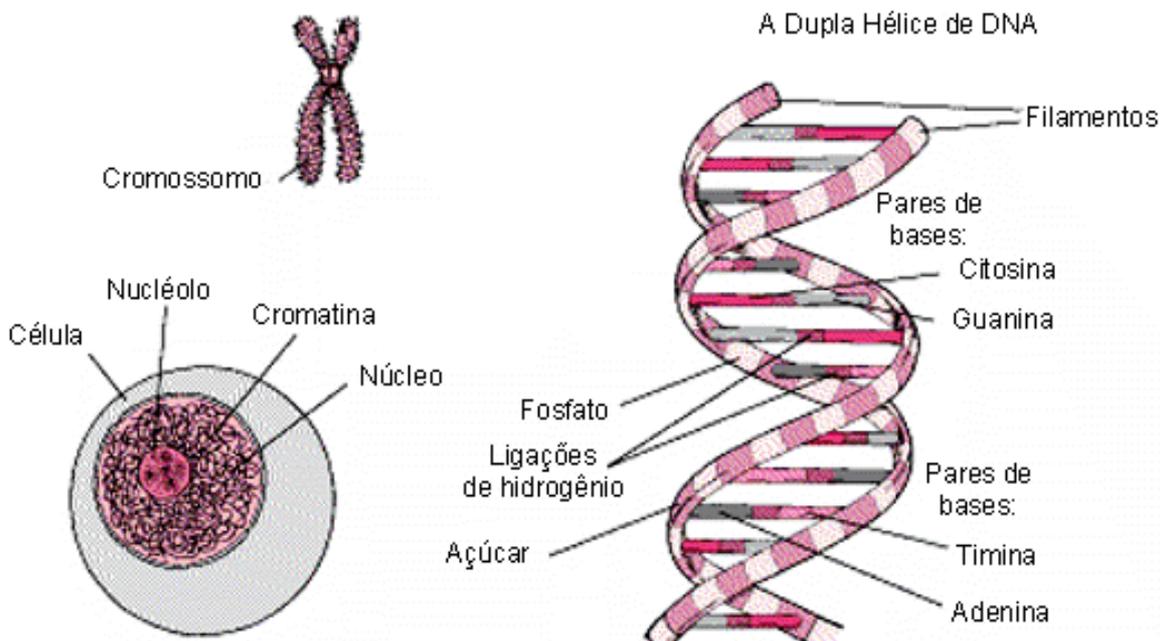
- **Biomarcadores de susceptibilidad:**

Pueden ser heredados o inducidos, es un indicador de que el individuo es especialmente sensible al efecto de uno o varios xenobióticos.

Dado el grado aceptable de validez, los biomarcadores pueden emplearse con varios fines. A nivel individual, un biomarcador puede utilizarse para apoyar o rechazar el diagnóstico de un determinado tipo de intoxicación o de otro efecto adverso inducido por sustancias químicas. En un sujeto sano, un biomarcador puede reflejar también una hipersusceptibilidad individual a determinadas exposiciones químicas y por consiguiente puede tomarse como base para la predicción del riesgo y el asesoramiento.

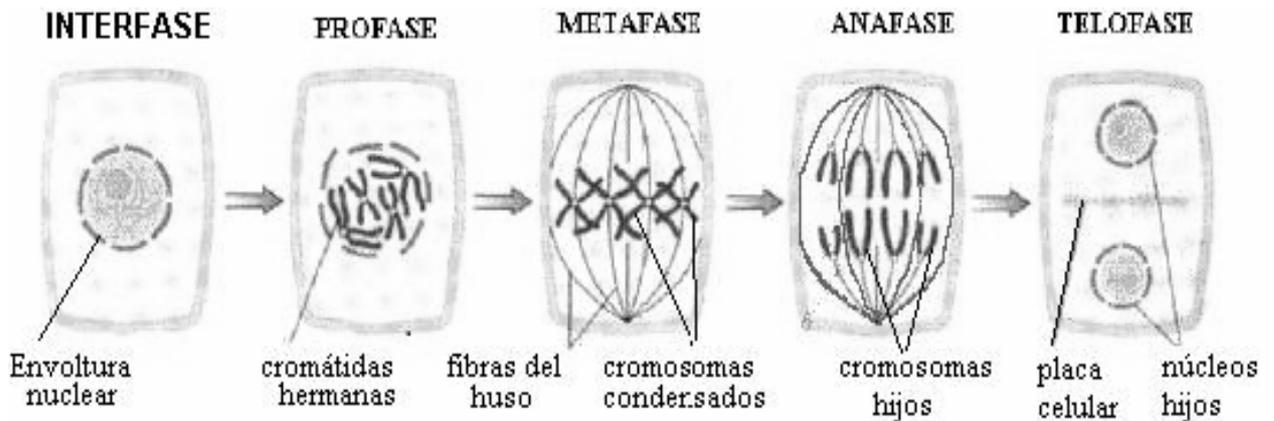
## 2.1.- ORIGEN DE MICRONÚCLEOS.

Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera equivocada debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado “micronúcleo” (MN), visible fácilmente bajo el microscopio óptico<sup>3</sup>.



Copyright © por Trabajo Sin Drogas - CAPLA Derechos Reservados.

El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante anafase mitótica.



*British Medical Journal*  
314: 1.882-1.885 (junio 28), 1997

Los primeros micronúcleos fueron observados hace más de un siglo en el citoplasma de eritrocitos por Neumann en 1869, como pequeñas estructuras redondas que se tiñen como el núcleo de la célula., estas estructuras también se llamaron “fragmentos de material nuclear” o “corpúsculos intraglobulares”. Debido a que el origen de los MNs es heterogéneo, el ensayo no permite caracterizar la naturaleza del daño inducido<sup>4</sup>.

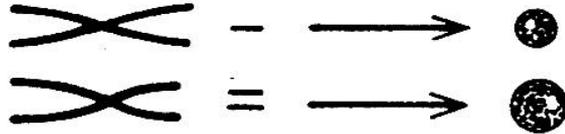
La prueba de micronúcleos puede ser utilizada en tejidos como son de células exfoliadas de epitelio de la cavidad oral, la cavidad nasal, los bronquios, el esófago, cerviz, vejiga y tracto urinario. Stich y Stich cerca del año de 1982 desarrollaron esta prueba con el propósito de detectar daño genotóxico en tejidos humanos, los cuales son blanco de carcinógenos en órganos específicos y en los que se desarrollarán más tarde carcinomas.

La técnica cuenta con la ventaja de ser una prueba *in vivo*, que no requiere de estimulación celular y es poco invasiva en la toma de muestras celulares, lo que permite la realización de muestreos repetidos<sup>5</sup>, además de que el daño evaluado refleja los eventos genotóxicos que ocurrieron en la capa basal en división de las tres últimas semanas.

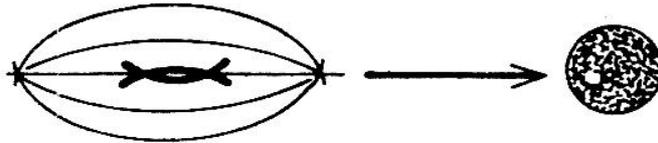
# ORIGEN DE MICRONÚCLEOS

## 1 Fragmentos Acéntricos

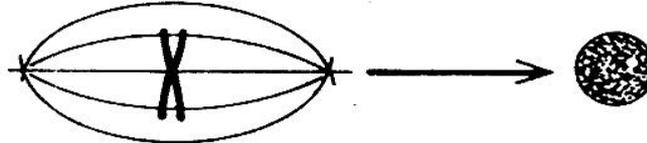
Micronúcleos



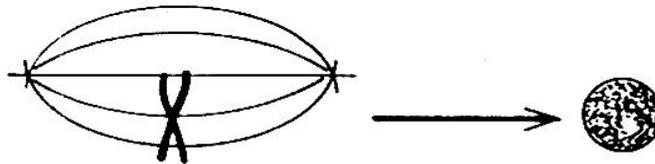
## 2 Cromosomas Multicéntricos



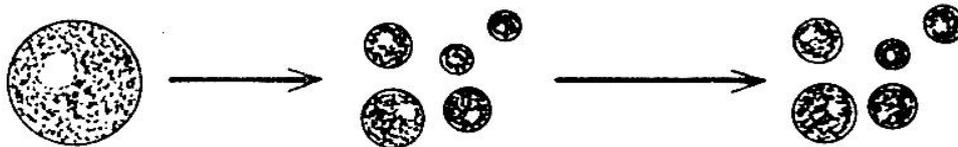
## 3 Daño al Cinetócoro



## 4 Daño al huso



## 5 Cariórresis



## 6 Gemación del Núcleo



Fig. 3.- Origen de los Micronúcleos y de Estructuras que parecen Micronúcleos

Muller y Streffer, 1994.

La bibliografía soporta que el consumo de alcohol y tabaco eleva la frecuencia de células micronucleadas de una manera directamente proporcional al consumo diario de cigarrillos, lo cual coincide con datos de estudios epidemiológicos, los que reportan una interacción sinérgica entre el consumo de alcohol y tabaco en el incremento de riesgo para desarrollar algún tipo de cáncer<sup>5,6</sup>.

Por otra parte, se ha observado que existe un incremento en la frecuencia de MNs en células exfoliadas del tracto genitourinario en individuos expuestos a diversos agentes que de acuerdo a estudios epidemiológicos, se asocian con un riesgo aumentado para el desarrollo de cáncer de vejiga, debido al hábito de fumar<sup>7</sup>.

## **2.2.- ELEMENTOS DE CONFUSIÓN DE MICRONÚCLEOS.**

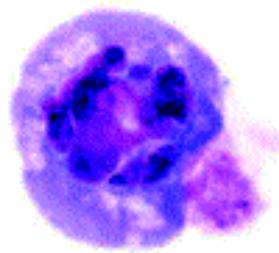
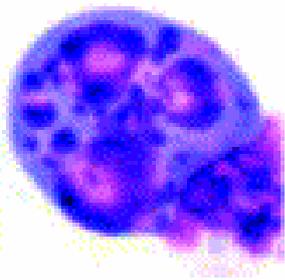
En ocasiones surgen ciertos factores de confusión, que pueden llegar a desviar el objetivo principal de esta prueba, que como ya mencionábamos es la detección oportuna de MNs, para así poder predecir un daño que puede afectar la homeostasis del organismo. Este tipo de confusiones ocurren cuando se realiza el proceso de lectura de laminillas de las células exfoliadas y estas están en procesos degenerativos, como por ejemplo:

Apoptosis, lo cual se refiere a una muerte celular programada.

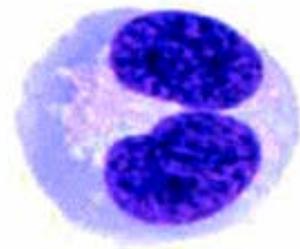
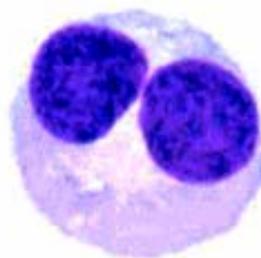
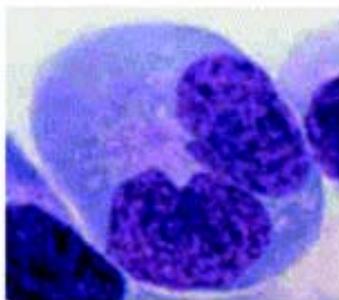
De igual modo puede darse el caso de una cariorresis, cariolisis, picnosis o lo que se conoce como “broken-egg” es decir, una degeneración celular.

Las células en vía de apoptosis se caracterizan por presentar cromatina condensada, que en etapas tempranas de apoptosis puede manifestarse como cromatina marginal y que más tarde, conforme avanza el proceso apoptótico, culmina en la fragmentación del material nuclear, quedando éste disperso en el citoplasma y reflejándose en una tinción más oscura con respecto a la habitual, de igual modo ocurre con la cariorresis, solo que ésta además incluye la desintegración de la membrana nuclear, y por ende estos fragmentos pueden confundirse con MNs durante el análisis de microscopía.

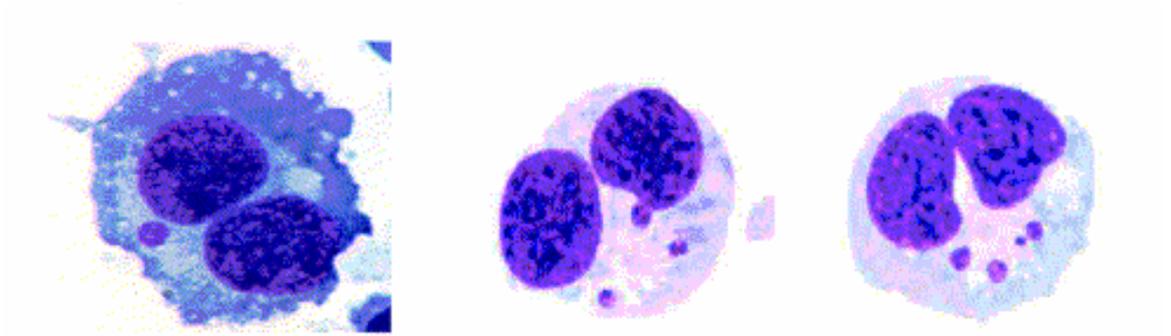
La picnosis y los “broken-eggs” son otros procesos nucleares que pueden dar lugar a estructuras que se pueden confundir con MNs, solo que los primeros se pueden diferenciar porque presentan un cromatina más condensada, y los segundos, porque son fragmentos de material nuclear que aún están unidos al núcleo principal. De tal modo que estas anomalías son el resultado de diversos procesos biológicos, vinculados con el desarrollo de un cáncer.<sup>8</sup>



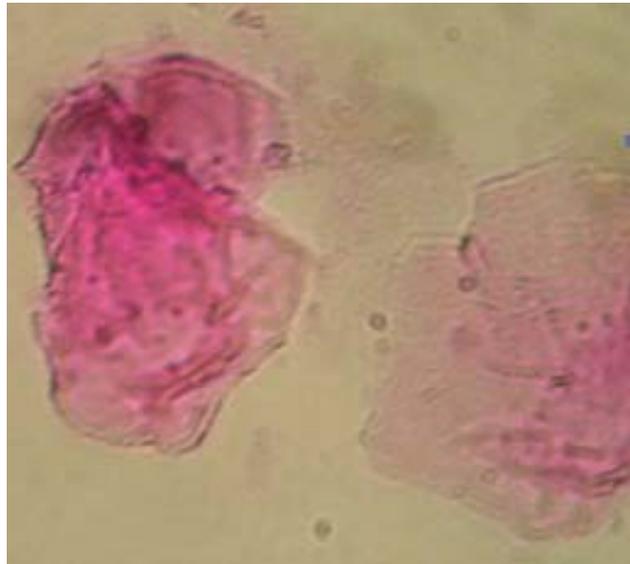
*Cariorrresis en células bucales.*



*Células binucleadas.*



*Células binucleadas con micronúcleos.*



*Células bucales normales.  
Atipias Nucleares*

### 3.- ANTECEDENTES.

#### Influencia del tabaco en los tejidos bucales

El tabaco, planta originaria de América era usada por varias de las culturas prehispánicas existentes en este continente antes de la llegada de Cristóbal Colón. Con el descubrimiento de América, su uso se extendió primero por toda España y posteriormente por toda Europa.

A esta planta se le atribuían diversas propiedades terapéuticas; por otra parte el nacimiento de la palabra tabaco es incierto y múltiples son las terminologías que se han propuesto para esta planta. Según algunos cronistas españoles, el nombre viene por haberse descubierto la planta en Tabasco, una de las pequeñas islas Antillanas; según otros por descubrirse en Tabasco, México

Lo que si consta es que los nativos Amazónicos la utilizaban dentro de un contexto cultural, con fines mágico-religiosos y curativos.



*Drug free america. Foundation, inc. Infocus a clear mesagge about drugs.  
Publicado en: 2004-04-19*

Concomitantemente en 1559 el embajador Francisco II de Portugal, Juan Nicot, envió como regalo especial a Catalina de Médicis, una cantidad de tabaco en polvo, con lo anterior adquirió el nombre de "Hierba de la Reina", en Francia se le llamaba al tabaco "Nicotiana". La base fundamental de esta planta, fue descubierta por Relmann y Posselt en 1829, a la cual le dieron el nombre de su introductor, "Nicotina".

Entre los principales componentes del tabaco se encuentran: N-nitrosamina, N-nitrosornicotina y 4-Metilnitrosamina-1-3-Piridil-1-Butanona, como unos de los elementos más importantes, principalmente, en la génesis de procesos pre-degenerativos y degenerativos en la cavidad bucal.

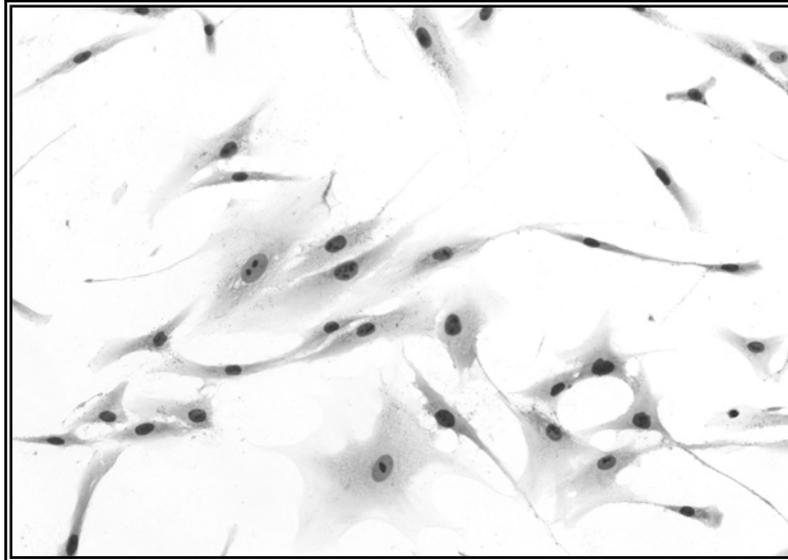


*Drug free america. Foundation, inc. Infocus a clear mesagge about drugs.  
Publicado en: 2004-04-19*

Entre los efectos que el uso del tabaco puede tener en los tejidos bucales, se puede ver desde una susceptibilidad aumentada de los ligamentos que fijan el diente dentro del alveolo óseo del maxilar, así como el retraso cicatrizal, pigmentación de la mucosa, hasta la aparición de procesos pre-degenerativos y degenerativos en la cavidad bucal.

La nicotina afecta a la circulación periférica, causando una vasoconstricción gingival importante, por lo cual se disminuye el aporte de elementos de reparación por parte de la sangre al tejido gingival y por consiguiente se debilita la capacidad de cicatrización de este tejido.

Además la nicotina causa daños a la matriz extracelular de fibroblastos gingivales. Una concentración menor a 0.075% causa muerte celular, una de 0.075% causa una vacuolización de los fibroblastos y una del 0.05% inhibe la producción de fibronectina y colágeno tipo II por lo que se produce una ruptura de la matriz extracelular gingival por consiguiente aumenta la gravedad de la enfermedad periodontal. Con lo anterior podemos pensar que un efecto similar se puede dar en cualquier otro sitio de la mucosa bucal y no solo en el periodonto. El fumar se asocia clínicamente a bolsas profundas, formación de cálculo, pérdida de hueso alveolar, gingivitis ulceronecrotizante aguda grave, y osteoporosis.<sup>9, 10</sup>



*Histología UC © Escuela de Medicina P. Universidad católica de Chile.*  
Tejido conjuntivo en el cuál destacan los núcleos de fibroblastos poco activos rodeados de fibras colágenas.

Lo que es evidente, en la mucosa de fumadores es que en la mayoría de los casos exhibe una mayor cantidad de células anucleadas, en comparación con no fumadores. También es común encontrar células con micronúcleos, las cuales nos pueden indicar la existencia de ciertos cambios en la mucosa bucal.

Entre los efectos más comunes descritos que tiene el tabaco sobre la mucosa oral se encuentran ciertos tipos de carcinomas. El carcinoma in situ, es la forma más leve de este tipo de procesos. Esta caracterizado por una displasia severa en la totalidad del epitelio involucrado. A diferencia del carcinoma epidermoide, en el carcinoma in situ la membrana basal del epitelio esta intacta. Pero como mencionábamos, otro tipo de cambio maligno es el llamado carcinoma epidermoide, el cual es la entidad maligna que más frecuentemente aparece en la cavidad bucal, ocupando el 90% de la totalidad de los carcinomas que se generan en la cavidad bucal.

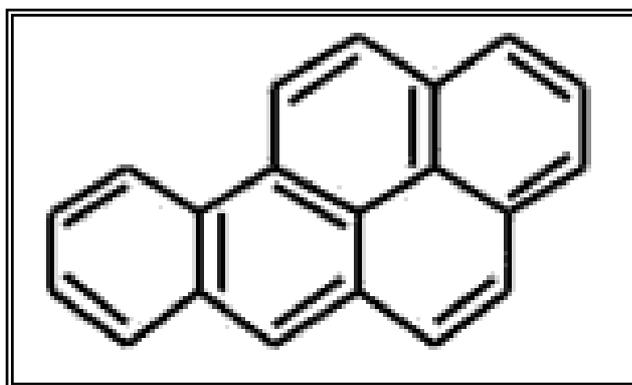
Los sitios en los que generalmente ocurre la aparición son:

- El labio inferior
- Bordes laterales de la lengua
- Y en el piso de boca. <sup>11</sup>

### 3.1.- PRINCIPALES COMPUESTOS TÓXICOS DEL TABACO.

En el caso concreto de los compuestos tóxicos del tabaco, su capacidad carcinogénica depende fundamentalmente de la activación de los componentes neutros de la fase particulada por enzimas halladas en múltiples tejidos, siendo los compuestos más importantes los benzopirenos (hidrocarburos policíclicos aromáticos, los cuales son carcinógenos) y dibenzoantracenos.

Una vez activadas, estas moléculas tóxicas por sí mismas o alguno de sus metabolitos reactivos forman uniones covalentes de alta afinidad con el material genético, dando lugar a la formación de aductos<sup>12, 13</sup>.



*Estructura química de la molécula del  $\alpha$ -benzopireno  
Donald Voet. Ediciones Omega, S.A, 1990. Pag. 325*

Dentro de los benzopirenos uno de los más tóxicos es el  $\alpha$ -benzopireno que, tras un largo periodo de consumo, puede desarrollar cáncer de pulmón, piel, boca y lengua.

La siguiente tabla muestra los resultados expresados en Unidades Gravimétricas (ug), (equivalente a  $0.0001 \text{ cm}^3/\text{s}^2$ ) de un estudio clínico publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el cual se describen algunos de los compuestos químicos que un sujeto inhalaría directamente en un área de  $300 \text{ m}^2$  durante una jornada de trabajo de 8 hrs. Lo anterior en base a número total de 10 fumadores por  $300 \text{ m}^2$  que fuman cada uno dos cigarrillos por hora y condiciones estándares de ventilación.

Tabla 1.

Producto químico	Cantidad (ug)	Producto químico	Cantidad (ug)
Alquitrán	3128	Propionaldehído	17
Nicotina	678	Resoles	15
<b>Acetaldehído</b>	<b>207</b>	Cianuro	14
Óxido nítrico	190	Estireno	13
Isopreno	151	Butiraldehído	12
Resorcinol	123	<b>Acrilonitrilo</b>	<b>11</b>
Acetona	121	<b>Crotonaldehído</b>	<b>10</b>
Tolueno	66	<b>Cadmio</b>	<b>9,7</b>
<b>Formaldehído</b>	<b>54</b>	1-aminonaftaleno	8,5
Fenol	44	<b>Cromo</b>	<b>7,1</b>
Acroleína	40	<b>Plomo</b>	<b>6,0</b>
<b>Benceno</b>	<b>36</b>	<b>2-aminonaftaleno</b>	<b>5,2</b>
Piridina	33	<b>Níquel</b>	<b>4,2</b>
<b>1,3-butadieno</b>	<b>25</b>	3-aminobifenilo	2,4
Hidroquinona	24	<b>4-aminobifenilo</b>	<b>1,4</b>
Metil etil cetona	23	<b>Quinolina</b>	<b>1,3</b>
Catecol	22	<b>Benzo[a]pireno</b>	<b>18</b>
Alquitrán	3128	Monóxido de carbono	5606

Los compuestos químicos en negrita son los productos de la combustión del tabaco y con cierta tendencia a ser de carácter carcinogénicos. En esta lista figuran compuestos irritantes de mucosas, agentes mutagénicos, productos tóxicos y sustancias vaso constrictoras que tienden a aumentar la presión arterial, afectando sistema nervioso central, pulmones y pueden llegar a causar algún tipo de disfunción renal.<sup>14</sup>

En el mes de octubre de 2004 Montebello, Canadá fue la sede en donde un Grupo de Estudio de la OMS sobre la Reglamentación de los Productos del Tabaco realizó un documento denominado como:

**Recomendación 1:** *Principios orientativos para el desarrollo de la capacidad de investigación y análisis de los productos de tabaco, y protocolos propuestos para la iniciación del análisis de estos productos.*

En dicha recomendación se establece un listado sobre el contenido de compuestos químicos correspondientes para el caso de los productos del tabaco que experimentan combustión, sin embargo debido a la complejidad para enumerar los centenares de ingredientes del producto antes de la combustión los cuales pueden originar más de 4000 compuestos en el humo emitido, y muchos de esos nuevos productos se encuentran entre los más genotóxicos y letales solo se mencionan los que se consideran en base a las investigaciones y estudios realizados por dicho grupo de investigación como los más propensos a causar algún tipo de daño a la salud.

Las disposiciones del Convenio Marco, reflejan los esfuerzos emprendidos por varios países y estados para someter los productos de tabaco a un marco de reglamentación.

En Canadá, disposiciones reglamentarias recientes obligan a los fabricantes a enumerar seis componentes tóxicos, junto con sus emisiones, en la parte exterior del envase de los productos de tabaco, y a notificar al Gobierno de Canadá una lista ampliada de sustancias químicas tóxicas presentes en el humo del tabaco.<sup>15</sup>

A continuación un ejemplo dicha lista:

### ***Contenido del producto***

- Nicotina/nicotina en estado libre (productos sin humo)
- Amoniaco/ion amonio
- Metales (arsénico, cadmio, cromo, plomo, mercurio, níquel, selenio)
- Nitrosaminas [N-nitrosornicotina (NNN), 4-(N-nitrosometilamino)-1-(3-piridilo)-1-butanona (NNK), N-nitrosoanatabina (NAT), y N-nitrosoanabasina (NAB)]
- Mentol

### ***Emisiones de los productos (directas y laterales)***

Los resultados de las mediciones del contenido de los componentes tóxicos que se enumeran a continuación debería notificarse por mg de alquitrán.

- Nicotina/nicotina en estado libre
- Alquitrán
- Monóxido de carbono
- Razón entre partículas secas sin nicotina y contenido de nicotina
- Hidrocarburos aromáticos polinucleares: a-benzoapireno
- Sustancias volátiles: benceno, 1,3-butadieno, formaldehído, acetaldehído
- Nitrosaminas: NNN, NNK, NAT, NAB
- Metales: arsénico, cadmio, cromo, plomo, mercurio, níquel, selenio
- Compuestos en fase gaseosa: óxidos de nitrógeno, ácido cianhídrico.

### 3.2.- PRINCIPALES VARIEDADES DE CIGARRILLOS.

Existe una gran variedad de cigarrillos en todo el mundo de tal modo que a continuación se enumeran algunas de las principales maneras en que se conocen, la forma en la que se elaboran y algunos otros datos sobre los mismos.

Comencemos con los **Bidis y kreteks**.

En las regiones del Sudeste Asiático y Oriente Medio, el tabaco se ha fumado tradicionalmente en una variedad de formas distintas a los cigarrillos convencionales. Estas formas incluyen los Bidis y los Kreteks, los cuales son más pequeños y a menudo hechos a mano, y son realizados en las diversas regiones utilizando diversas especias y hierbas, utilizando el tabaco como uno de los ingredientes principales. Se conoce que en algunas regiones incluso los niños y las mujeres los fabrican en pequeñas tiendas, siendo luego vendidos por individuos en las calles por unidades. Algo que vale la pena mencionar es que estas formas de productos para fumar son promocionadas local e internacionalmente como menos dañinas que los cigarrillos, lo cual como es de esperarse no tiene un fundamento científico.<sup>16, 17</sup>

Como sucede con los llamados cigarrillos “orgánicos”, los Bidis y los Kreteks se venden con frecuencia en los arbolarios en todo el mundo incluyendo México.

## **Bidis**

Los Bidis son cigarrillos pequeños liados a mano, hechos típicamente en India y en otros países del Sudeste Asiático. A pesar de que los Bidis tienden a ser más pequeños que los cigarrillos convencionales y de que tienen aromas exóticos de ingredientes naturales, pueden resultar desde todos los puntos de vista tan mortíferos y adictivos como los cigarrillos convencionales. Este tipo de cigarrillos suelen contener algunos miligramos de tabaco envuelto en una hoja de Tendu o Temburni (*Diospyros melanoxylon*), plantas oriundas de Asia.

De tal modo que a pesar de que su uso está más generalizado en los países del Sudeste Asiático, se exportan cada vez más como alternativas exóticas y menos perjudiciales a los cigarrillos convencionales.

Las especias y aromatizantes que incorporan los Bidis varían ampliamente, sabores que sin lugar a dudas prometen complacer hasta el gusto más exótico como son: mango, cereza y hasta chocolate. Una encuesta realizada entre jóvenes de Massachussets indica que de los 642 jóvenes encuestados, el 40% había probado a fumar Bidis, mientras que el 16% afirmaba fumarlos actualmente <sup>18</sup>. Una falsa percepción común entre estos jóvenes era que los bidis eran menos peligrosos que los cigarrillos, sin embargo un estudio realizado en la India<sup>19</sup> estima que alrededor de una cuarta parte de los fumadores varones de este tipo de cigarrillos con edades que oscilan entre los 25-69 años de edad tenían un mayor número de enfermedades relacionadas a problemas respiratorios de pulmón y esófago, en cuyos casos más extremos hasta principios de enficéma pulmonar y cáncer causando el tabaquismo, en general 552,000 muertes entre los varones indios de 25 a 69 años de edad.

Estudios recientes indican que la nicotina y otras sustancias que los bidis liberan alcanzan al menos los mismos niveles que un cigarrillo común <sup>18, 20</sup>.

De hecho el consumo de bidis ha demostrado tener como resultado un riesgo de morbilidad superiores en relación con el consumo de cigarrillos comunes <sup>21</sup>. El consumo de bidis ha sido asociado a un riesgo tres veces mayor de cáncer bucal en comparación con personas que nunca hayan fumado <sup>22, 23</sup>, y un mayor riesgo de cáncer de pulmón, estómago y esófago <sup>23, 24</sup>. Los estudios han demostrado también que fumar bidis es un factor de riesgo importante de enfermedad cardiovascular. <sup>25, 26</sup>

Ahora sigamos con otra variedad de cigarrillos estos son los:

### **Kreteks o cigarrillos de clavo.**

A los kreteks se les conoce también como cigarrillos de clavo, ya que suelen contener un 40% de la especie aromática llamada clavo y un 60% de tabaco. Estos cigarrillos se encuentran principalmente en Indonesia.

En cuanto a la toxicología del humo de clavo inhalado podemos decir que el clavo proporciona un aroma que puede encubrir las cualidades irritantes del humo del tabaco, permitiendo así la inhalación de grandes cantidades de humo, lo cual incrementa el número de toxinas que ingresan al organismo.

Asimismo, el clavo libera un compuesto llamado Eugenol, el cual puede mitigar los efectos sensoriales y también facilitar la inhalación profunda de grandes cantidades de humo.

Podemos citar, un estudio reciente realizado en Indonesia el cual concluyo que el riesgo de cáncer de pulmón entre los fumadores de kretek se incrementaba con el número de cigarrillos por día, los años de consumo y la edad <sup>27</sup>. Hallazgos similares han sido documentados repetidamente en relación con el consumo de los cigarrillos convencionales. <sup>28</sup>

El consumo de kreteks ha sido asociado con un mayor riesgo de lesión pulmonar aguda, especialmente entre personas susceptibles a enfermedades tales como el asma e infecciones respiratorias. <sup>29</sup>

Investigación llevada a cabo en Indonesia ha demostrado que los fumadores habituales de kreteks corren entre 13 y 20 veces más, el riesgo de sufrir una disfunción pulmonar en comparación con los no fumadores.<sup>30</sup>

Por tal motivo no está claro que los altos niveles de clavo que contienen los kreteks aumenten su toxicidad en comparación con los cigarrillos convencionales de tabaco, no existe una base científica que permita llegar a la conclusión de que los kreteks sean en alguna medida menos peligrosos que los cigarrillos.

### **Pipas**

El consumo de tabaco en pipa ha sido objeto de menos estudios que el consumo de cigarrillos; sin embargo en gran parte de aquello que es verdad para los cigarrillos parece ser también verdad para el consumo de tabaco en pipa.

Por ejemplo, el humo tiende a ser más alcalino que el humo del cigarrillo, no teniendo así que ser inhalado directamente para sostener altos niveles de adicción a la nicotina. Debido a las cantidades relativamente grandes de tabaco que se suelen poner en la pipa, el fumador en pipa y los no fumadores pueden estar expuestos a una cantidad de humo equivalente a la de varios cigarrillos.

Los fumadores en pipa corren un riesgo considerablemente mayor de enfermedades, que incluyen bronconeumopatía crónica, cáncer cerebral y de cuello, cáncer de laringe, cáncer de esófago y cáncer de pulmón.<sup>31</sup>

Un estudio realizado en China llegó a la conclusión de que el riesgo relativo de padecer un cáncer bucal entre los fumadores en pipa es de 5,7% en los varones y de 4,9% en las mujeres. De hecho, estas estimaciones son incluso superiores que aquellas que se asocian al consumo de cigarrillos.<sup>32</sup>

La frecuencia del hábito de fumar en pipa, y posiblemente el nivel de inhalación, evidentemente son determinantes en relación al riesgo que existe para la salud.

**Otra variedad de pipas son las llamadas Pipas de agua (Hookahs, Bhangs, Narghiles).**

Las pipas de agua tienen gran aceptación en todo el Sudeste Asiático y el Medio Oriente, se conocen con los nombres regionales de “Hookah”, “Bhang” y “Narghile”. Como referencia podemos decir que han sido utilizadas durante muchos siglos con la falsa creencia de que eran una forma segura de fumar tabaco.<sup>33, 34</sup>

Las pipas de agua se fabrican en una variedad de diseños en los que el humo de la sustancia pasa a través ya sea de agua o de algún tipo de licor produciendo una especie de “burbujeo” antes de ser inhalado.

La sustancia se coloca en un tazón pequeño con agujeros en el fondo, al que se conecta un tubo o manguera larga y flexible que permite que el humo pase al fondo de un recipiente de agua, es decir el cuerpo de la pipa.

El tabaco u otra sustancia no se queman independientemente, sino que se calientan y se queman parcialmente añadiendo al tazón carbón o brasas que arden sin llama. A la parte superior del recipiente que contiene el líquido se pueden conectar uno o más tubos para permitir que el(los) usuario(s) inhale(n), extrayendo así humo del tazón, a través del agua y hacia los pulmones.

La errónea creencia de que las pipas de agua son una forma segura de fumar tabaco se remonta al menos al siglo XVI, cuando el físico Abul Fath sugirió que el humo debía pasar primero por un pequeño recipiente con agua para ser así menos perjudicial.<sup>35</sup>

Además, a consecuencia de la introducción del tabaco aromatizado, el uso de la pipa de agua está aumentando espectacularmente entre los jóvenes de Medio Oriente, al tiempo que adquiere una gran popularidad en los campos universitarios y otros lugares en todo el mundo, debido en parte a su mística, supuesta seguridad y a la socialización que posibilita el uso de las pipas por usuarios múltiples.<sup>34</sup>

La ausencia en la mayoría de los países y regiones de las advertencias sanitaria estandarizadas que se utilizan con los cigarrillos puede reforzar el supuesto de relativa seguridad. Se venden mezclas de tabacos especiales, con frecuencia muy aromatizados con fruta, miel, melaza y hierbas. Algunas de estas mezclas vienen etiquetadas con el enunciado técnicamente preciso, pero extremadamente engañoso, de que no contiene alquitrán. Esto es técnicamente veraz, debido a que el alquitrán se produce durante la combustión del tabaco.

No obstante, debido a que el tazón de la pipa de agua se suele llenar con varias veces la cantidad de tabaco que contienen los cigarrillos, una vez encendida la pipa, se pueden producir grandes cantidades de alquitrán cuando el tabaco se quema.

Es probable que las sustancias tóxicas y carcinógenas para el pulmón se reduzcan poco, si es que lo hacen, cuando el humo pasa a través del agua. La absorción del veneno cardiovascular, el monóxido de carbono, puede ser muy elevada, debido a los grandes volúmenes inhalados y al hecho de que la fuente de calor suele ser carbón o brasas que arden sin llama, lo cual genera niveles muy altos de monóxido de carbono.

Mientras que un cigarrillo se suele fumar durante unos cinco minutos aproximadamente con una inhalación de entre 300-500 mL de humo, las sesiones durante las que se fuma una pipa de agua pueden durar fácilmente entre 20 y 60 minutos con volúmenes de 10 litros o más inhalados.

Es factible que algunas sustancias hidrosolubles sean parcialmente absorbidas por el agua, reduciéndose así su concentración, pero se desconoce si la toxicidad se reduce suficientemente como para disminuir los efectos adversos para la salud. Podría ser que la concentración de nicotina del humo se reduzca, tal como sugieren los extraordinariamente altos volúmenes de humo inhalados en comparación con los cigarrillos. El efecto en la salud puede ser negativo, puesto que todavía se puede absorber suficiente nicotina para producir adicción, mientras que la menor concentración se podría traducir en una inspiración mucho mayor de sustancias que producen algún tipo de carcinoma u otras enfermedades citogenéticas.

Daños pulmonares graves, cáncer y otros efectos adversos para la salud han sido documentados y asociados al hábito de fumar en pipa de agua. Sin embargo, la información sobre cantidad de uso, contenido y efectos para la salud es más limitada que en el caso de los cigarrillos.

A fin de cuentas, fumar en pipa de agua es fumar tabaco, y un volumen creciente de pruebas científicas confirma que los efectos para la salud son en gran medida aquellos que se esperan de la exposición al humo del tabaco, incluidos enfermedad pulmonar, cardiovascular y cáncer.

Por ejemplo, un trabajo reciente llevado a cabo en Egipto revela que, en relación con los no fumadores, los usuarios de pipas de agua tenían niveles más altos de insuficiencia pulmonar, evaluados mediante espirometría.<sup>36 - 39.</sup> Es probable que estas insuficiencias se reflejen en la mayor incidencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica que se observa en los usuarios de pipas de agua en relación con los no fumadores.<sup>40, 41</sup>

En cuanto a la enfermedad cardiovascular, un informe preliminar realizado entre 292 usuarios de pipas de agua y 233 no fumadores aquejados de cardiopatía coronaria apunta que el 31% de los casos había utilizado alguna vez pipas de agua en comparación con el 19% de los controles.<sup>42</sup>

El uso de pipas de agua ha sido asociado a carcinoma bronquial, al igual que a cáncer bucal y de vejiga <sup>43, 44, 45</sup>.

Por otra parte la exposición a monóxido de carbono durante el embarazo puede perjudicar al feto, y se piensa que es una de las causas al bajo peso al nacer. Está claro que el síndrome de tabaquismo fetal es un riesgo para los niños nacidos de madres que utilizan pipas de agua durante el embarazo: estas mujeres se enfrentan a un mayor riesgo de dar a luz niños con bajo peso.

### **Productos de tabaco de uso oral o sin combustión**

Ahora bien no siempre es necesario que exista una combustión del tabaco para que exista la posibilidad que conlleve a algún tipo de enfermedad como es el caso del consumo de tabaco oral sin combustión alguna, la cual sigue siendo la forma dominante de uso del tabaco. Los productos orales sin combustión son altamente adictivos y pueden producir cáncer de cuello, garganta y esófago, al igual que numerosas dolencias bucales y dentales graves.

La popularidad del tabaco de uso oral sin combustión está creciendo gracias a los crecientes esfuerzos de marketing realizados por la industria tabaquera. En un estudio reciente publicado por el Journal of School Health, el análisis de informes realizados por los Centros de Control de Enfermedades (CDC) estadounidenses y la OMS sobre las diferencias de género en el consumo de tabaco entre jóvenes de todas las regiones del mundo revelaron un uso sorprendentemente alto de otros productos de tabaco en comparación con el consumo de cigarrillos, incluido el tabaco sin combustión. A esto se añade el que se llegó a la conclusión de que existía poca diferencia entre el uso de cigarrillos y otros productos de tabaco. <sup>46</sup>

De tal modo que existen cuatro formas principales de tabaco de uso oral sin combustión:

- El **tabaco de mascar**, que se corta de la misma manera que el césped, siendo por lo general moderadamente ácido y estando destinado a consumirse mascado durante gran parte del día.
- El **rapé**, que se corta en partículas del tamaño de granos de café grandes, siendo hidratado y utilizado manteniéndolo entre la encía y la mejilla.
- El **snus** sueco, que es una variante del rapé y se trata de manera diferente generalmente suele ser más húmedo, y en algunos casos algunas variantes deben mantenerse refrigeradas.
- El **gutkha** y otros productos de tabaco de uso oral sin combustión, que se consumen en India y en el Sudeste Asiático.

Combinar tabaco con diversas mezclas principalmente de hierbas, especias, nuez de areca, hoja de betel y otras sustancias es un hábito cuya adopción se remonta a los siglos XVI y XVII en la región del Sudeste Asiático, existiendo numerosas variedades. El tabaco deshidratado en polvo que se inhalaba por la nariz era especialmente popular en Inglaterra, el Norte de Europa y en partes de China en los siglos XVIII y XIX.

El tabaco de uso oral y sin combustión es la forma dominante de consumo de tabaco en India, lo habitual es añadir el tabaco a una nuez de betel, que es una mezcla de nuez de areca, cal y otras especias envueltas en una hoja de betel.

47-48

La nuez de areca contiene alcaloides como arecolina, muscarina y pilocarpina, que en pequeñas dosis son tranquilizantes y en concentraciones mayores moderadamente estimulantes. También se considera que estas mezclas ayudan a la digestión, siendo común tomarlas después de las comidas.

La incorporación del tabaco a la nuez de betel incrementa su potencial de adicción y contribuye a sus efectos adversos para la salud, debido al uso más persistente producido por la adicción.<sup>49-50</sup>

La rapidez de absorción de la nicotina depende del pH. Con frecuencia, se añaden sustancias buffer, como cenizas, hidróxido de calcio o carbonato de sodio, más recientemente, para aumentar el pH y permitir una absorción más rápida y, en consecuencia, un efecto más intenso de la nicotina.

Desde al menos la década de los ochenta, se ha reconocido que el tabaco produce adicción, varias formas de cáncer y diversas enfermedades dentales<sup>51</sup>. Los productos de tabaco de uso oral o sin combustión contienen niveles adictivos de nicotina, numerosos carcinógenos, metales pesados y otras sustancias genotóxicas, aunque se reconoce que los niveles de nicotina y sustancias tóxicas varían ampliamente según los productos. En términos generales, los productos de tabaco de uso oral son altamente adictivos, siendo común que contengan varios carcinógenos que producen cáncer oral y de garganta con altas tasas de mortalidad prematura.<sup>52-53</sup>

El consumo de tabaco, incluido el tabaco sin combustión, junto con el consumo excesivo de alcohol, constituyen importantes factores de riesgo de desarrollar cáncer oral, estimándose que representan alrededor del 90% de este tipo de cánceres.<sup>54</sup>

Para darnos una idea más concisa se estima que en todo el mundo, se producen aproximadamente 274,000 nuevos casos de cáncer oral cada año<sup>55</sup>. En los países del Sur y del Sudeste Asiático, el cáncer oral es un problema de salud pública de primer orden<sup>56</sup>. India posee una incidencia alta de cáncer oral, que representa un tercio de la carga mundial<sup>57</sup>. Este tipo de cáncer es una de las cinco causas principales de cáncer en cinco localizaciones principales del cuerpo en cualquier sexo, y lo alarmante de este caso es que se está incrementando entre la población más joven.<sup>58-59</sup>

Vale la pena destacar que, a pesar de las diferencias en materia de riesgos relativos para la salud en comparación con otros productos de tabaco, una revisión reciente del tabaco sin combustión realizada por la Agencia Internacional de Investigación Oncológica (IARC) llegó a la conclusión de que el tabaco sin combustión es carcinogénico, no estableciendo excepción alguna respecto al Snus Sueco, como se pensaba no llegaba a ser cancerígeno debido a su composición.<sup>32</sup>

Producto	¿Adictivo?	¿Contiene carcinógenos	¿Contiene otras	¿Uso seguro demostrado? sustancias tóxicas?	¿Regulación sus contenidos para la seguridad del consumidor?
Cigarrillos	Sí	Sí	Sí	No	No
Cig. con filtro	Sí	Sí	Sí	No	No
Cig. con «poco alquitrán»	Sí	Sí	Sí	No	No
Cig. de liar (Roll-your-own)	Sí	Sí	Sí	No	No
Cig. «orgánicos», «naturales», «no adictivos»	Sí	Sí	Sí	No	No
Bidis	Sí	Sí	Sí	No	No
Kreteks	Sí	Sí	Sí	No	No
Cigarros	Sí	Sí	Sí	No	No
Pipas	Sí	Sí	Sí	No	No
Pipas de agua	Sí	Sí	Sí	No	No
Productos de tabaco orales o sin humo	Sí	Sí	Sí	No	No
Gutkha	Sí	Sí	Sí	No	No

Tabla 2. Publicación del artículo "Tabaco: Mortífero en todas sus formas" el 21 de Mayo de 2006, por la OMS y el Ministerio de sanidad y consumo, en el Foro del Día Mundial sin Tabaco.

### 3.3.- INFLUENCIA DEL HUMO DEL CIGARRILLO EN LA SALUD.

Algo importante que debemos mencionar en relación a la Influencia en la salud que provoca el consumo de tabaco, es que la OMS reconoce en 2006, que actualmente estima que existen en el mundo un promedio de 1,300 millones de fumadores, esta cifra nos revela que el número de víctimas debido al consumo de tabaco es ahora de 5 millones al año; de continuar la pauta actual de consumo desmedido de tabaco, esta mortalidad podría llegar a duplicarse, llegando casi a alcanzar los 10 millones para el año 2020.

A pesar del conocimiento que hoy en día tenemos sobre el tabaco, su consumo continúa aumentando en todo el mundo, especialmente en los países de bajos y medianos ingresos en donde la industria tabacalera tiene un enorme mercado potencial, en estos países, donde suelen existir medidas un poco menos estrictas sobre el control del tabaco, y donde sin duda encuentran un gran número de posibles nuevos clientes, especialmente entre las mujeres.

El tabaquismo se ha extendido en los últimos tiempos en todo el mundo, y como ya mencionábamos especialmente entre las mujeres. Encuestas recientes muestran que el consumo de tabaco entre las niñas está aumentando de una manera impresionante, y que la prevalencia es, en muchos de los casos, comparable o incluso superior que entre los niños.<sup>60</sup>

### EFFECTOS DEL TABACO EN LA SALUD.

El consumo de tabaco sigue siendo ***una de las principales causas de muertes evitables*** a nivel mundial, sin embargo, la lista de afecciones que causa el consumo de tabaco ha aumentado considerablemente. Actualmente se sabe que el tabaco contribuye a enfermedades como ***cataratas, neumonía, leucemia mieloide aguda, aneurisma de la aorta abdominal, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de útero, cáncer de riñón, periodontitis entre otras.***<sup>61</sup>

Estas enfermedades se unen a la conocida y extensa lista de enfermedades relacionadas con el consumo de tabaco, que incluyen los ***cáncer de pulmón, vesícula, esófago, laringe, boca y garganta; bronconeumopatía crónica, enfisema y bronquitis; apoplejía, ataques cardíacos y otras enfermedades cardiovasculares.***

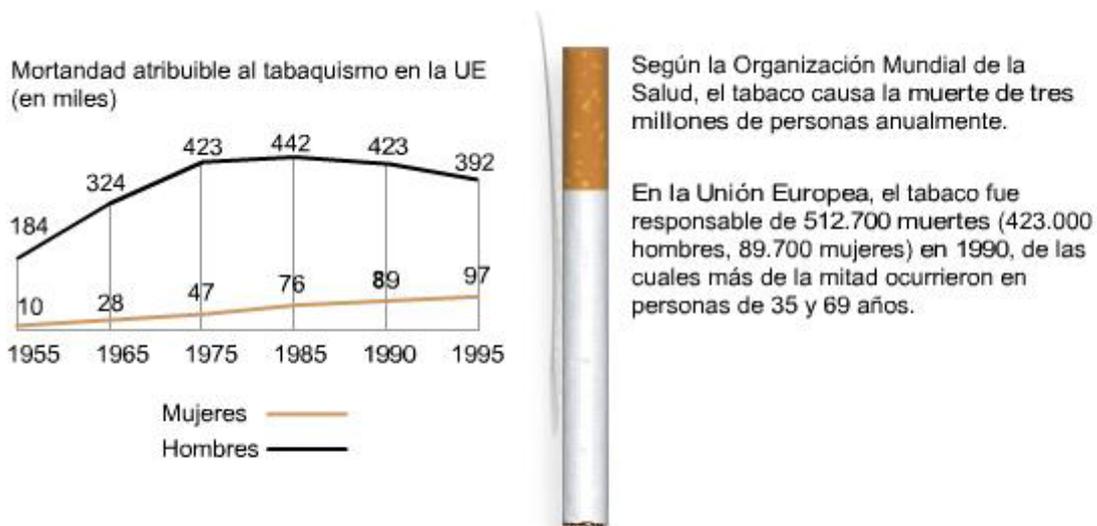
De hecho, gracias a un gran número de estudios clínicos realizados a nivel mundial, hoy sabemos que el tabaco es el causante del 90% de todos los cánceres de pulmón.<sup>32</sup>

Asimismo, en el caso de las mujeres el tabaco deteriora severamente el sistema reproductivo, contribuyendo a abortos, partos prematuros, bajo peso al nacer, muerte súbita del lactante y a enfermedades pediátricas, como son los trastornos de déficit de atención con hiperactividad. Es así como estudios demuestran que los niños nacidos de madres fumadoras llegan a pesar una media de 200 gramos menos que aquellos nacidos madres comparables no fumadoras.<sup>61</sup>

No obstante, aquellos que consumen tabaco no son los únicos expuestos a sus efectos negativos.

Como es de nuestro conocimiento millones de personas, incluida la mitad de los niños del mundo, están expuestos al humo ambiental del tabaco, lo que conocemos como ***tabaquismo pasivo***. En la actualidad existen pruebas científicas concluyentes en las que se asocia el tabaquismo pasivo a un incremento significativo del riesgo de desarrollar enfermedades como son: cardiovasculares, cáncer de pulmón, asma además de enfermedades respiratorias en los adultos como es el asma y otras como infecciones de oído y en algunos casos la muerte súbita del lactante en los niños, por nombrar tan sólo algunos efectos perjudiciales causantes por el tabaquismo pasivo.<sup>62-63</sup>

Como ya se ha mencionado anteriormente, los efectos que el humo del cigarrillo puede tener para la salud son demasiados al igual que su asociación con diversos tipos de cáncer, sin embargo la ciencia no se ha conformado con lo anterior, y por tal motivo las investigaciones continúan con el objeto de determinar los mecanismos moleculares del daño.



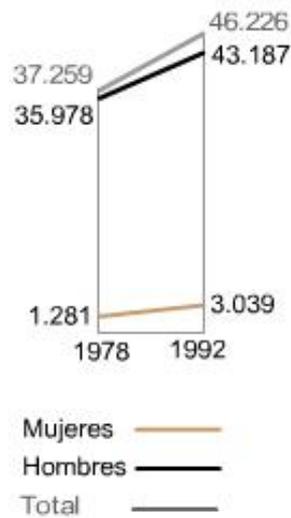
Grafica 1. Fuente: Diario.Esp, España 2001

Según la Organización Mundial de la Salud, el tabaco causa la muerte de tres millones de personas anualmente.

En la Unión Europea, el tabaco fue responsable de más de 512,700 muertes de las cuales 423,000 fueron hombres y 89,700 mujeres esto en el año de 1990, de las cuales más de la mitad ocurrieron en personas de entre 35 y 69 años de edad.

En España el tabaco ha provocado la muerte de 621, 678 personas durante el periodo del 1978 – 1992. Es importante recalcar que en este mismo periodo, las muertes atribuidas al consumo del tabaco en población de 35 y más años de edad, han provocado el aumento a las cifras de mortandad durante los años antes mencionados, pasando de 37.259 a 46.226 % el índice por consumo de tabaco.

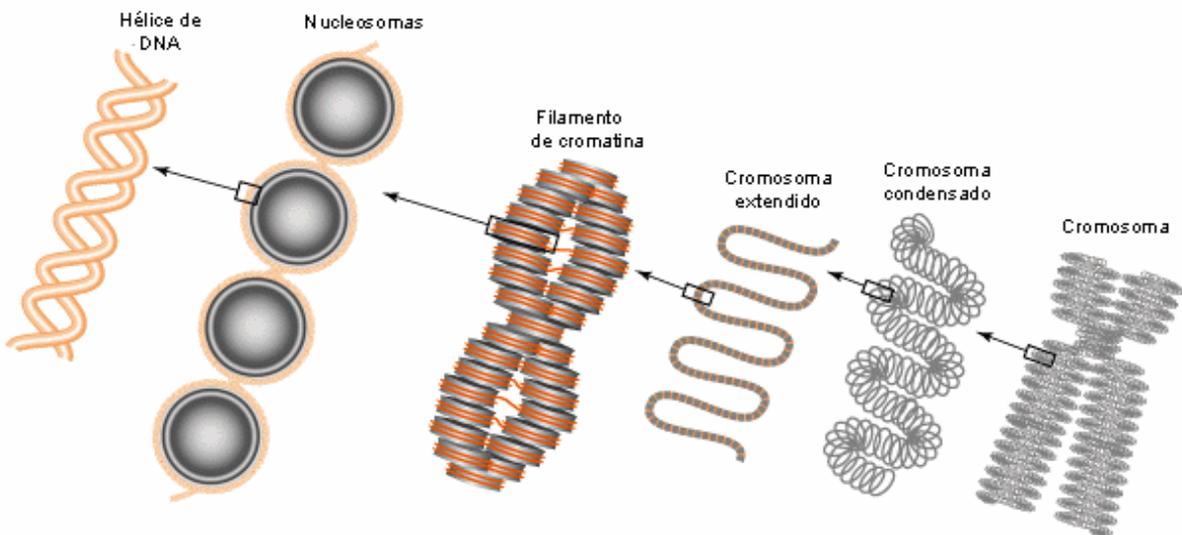
Mortandad atribuible al tabaquismo en España.  
población de 35 más años.



Grafica 2. Fuente: Diario.Esp, España 2001

Es por eso que un grupo de investigación estadounidense ha encontrado que un componente específico del tabaco es el responsable de una de las mutaciones más comunes en muchos tipos de cáncer. Se trata de la alteración del gen K-ras.

Dicho grupo de investigación ha comprobado, además, que la mutación se produce en una zona especialmente vulnerable y muy difícil de reparar. Este hallazgo constituye la prueba molecular de que el tabaco es una de las causas que provoca cáncer a nivel pulmonar.



Compactación progresiva del DNA dentro de los cromosomas en diferentes niveles identificables de organización. Los nucleosomas son el primer paso y le siguen el plegamiento en fibras de cromatina y la condensación progresiva hacia cromosomas. No se conocen todos los detalles, pero los cambios regionales en la estructura están relacionados a menudo con la expresión de cada gen.

Medical Genetics

Copyright © 1999 by the McGraw-Hill Companies, Inc. All Rights Reserved. Capítulo 3

### 3.4.- Genes RAS

Dicho sea lo anterior, RAS es una familia de tres genes cuya función consiste en controlar el crecimiento de las células y su desarrollo. Las mutaciones en cualquiera de ellos pueden conducir a la aparición de cáncer, aunque algunos parecen ser más susceptibles que otros.

El K-ras está alterado en el 90% de los tumores de páncreas, el 50% de los de colon y el 30% de los de pulmón asociados al consumo de cigarrillos. Además, el error se localiza preferentemente en una región específica, el codón 12. Se le llama codón a cada grupo de tres bases adyacentes en una molécula de mRNA (ARN mensajero) que constituyen una unidad de información genética.

En lo que se refiere al tabaco, este tipo de mutación sólo se da en un 5% de los casos de cáncer de pulmón que no están asociados al consumo de cigarrillos. El experimento consistió en exponer las células pulmonares al carcinógeno del humo del cigarrillo, el benzopireno diol expóxido (BPDE) durante un lapso de 30 minutos. Transcurrido este tiempo observaron que el BPDE se unía principalmente al gen K-ras y no a los otros miembros de la familia.

Además, los investigadores observaron que el agente químico se acoplaba específicamente al codón 12, un área muy vulnerable a las mutaciones.

Por otra parte, los científicos pudieron constatar que las alteraciones en esa zona del ADN (codón 12) se reparan mucho menos que las que se producen en otras regiones del K-ras.

Aún se desconoce por qué el codón 12 del gen K-ras es más susceptible de sufrir daños, por lo cual las investigaciones continúan por parte del autor principal del estudio. Otra de las vías de investigación es explorar la posibilidad de que existan diferencias individuales en la vulnerabilidad de esta región del gen, de modo que algunas personas serían más propensas que otras a ciertos tipos de cáncer.

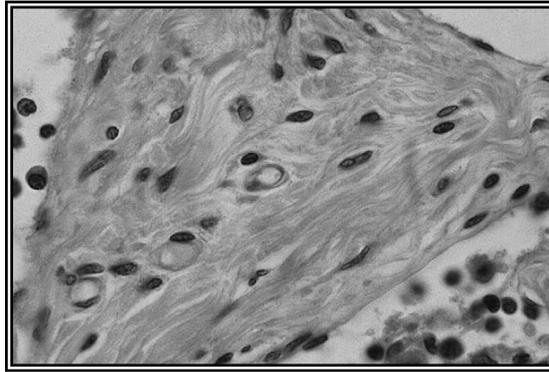
Es aquí donde entra en juego la predisposición genética de cada individuo para ser propensos a sufrir algún tipo de anomalía como es el caso del cáncer.<sup>64</sup>

Aunado a esto, diversos estudios revelan que el humo del tabaco daña y destruye los fibroblastos en los pulmones, conduciendo a enfisema pulmonar, dado que fumar es la principal causa de enfisema pulmonar, enfermedad que afecta a 2 de cada 1,000 estadounidenses; un estudio realizado por investigadores de la Universidad de Pisa, en Italia, explica que el humo del cigarrillo es una potente fuente de estrés oxidativo, daño celular y apoptosis para los fibroblastos, lo cual es una de las causas que conduce al desarrollo del enfisema pulmonar en los fumadores.

Asimismo, este hallazgo confirma que el tabaquismo pasivo o exposición prolongada al humo del tabaco en el ambiente puede también causar dicha enfermedad.

Los autores expusieron fibroblastos humanos a distintas concentraciones de extracto de humo de tabaco durante 3 horas. Midieron el estrés oxidativo y la apoptosis en estas células, cruciales en el proceso de reparación del tejido pulmonar.

Los resultados mostraron que el humo del tabaco es capaz de inducir estrés oxidativo y que el grado de oxidación depende de las concentraciones del extracto de humo de cigarrillos. También observaron que el humo induce la apoptosis de los fibroblastos, paralelamente a la oxidación, posiblemente porque las sustancias oxidantes desencadenan el proceso de autodestrucción en dichas células.<sup>65</sup>



*Departamento de Biología Celular y Farmacología. ESPAÑA  
Objetivo 40x. Fibroblastos con sus prolongaciones, núcleo celular, nucleolo y citoplasma.*

### **3.5.- FUENTES DE BENZOPIRENO**

Los mayores agentes contaminantes por benzopireno son, además de las combustiones (madera, carbón, petróleo, grasas), el tabaco, la industria, las aguas contaminadas y algunos alimentos, entre estos últimos los que contienen mayor cantidad.

El a-benzopireno que es muy tóxico, a largo plazo es cancerígeno ya que es tóxico por acumulación dado que nuestro organismo no lo elimina con facilidad. Su concentración va aumentando con el tiempo dando lugar a cánceres, frecuentemente afectan pulmón, páncreas, vejiga, hígado y boca, pero también deterioran el sistema inmunológico y causan mutaciones en las células, específicamente a nivel cromosómico.

Científicos del Centro del Cáncer M.D. Anderson en Houston (Texas) y el Instituto de investigación Beckham de California en un trabajo aparecido en Science sobre el benzopireno encontrado en el tabaco, demostraron que producía alteraciones en el gen p53 responsable del control del crecimiento celular y que al que se le atribuye el 60% de los casos de proliferación incontrolada de las células.<sup>66</sup>

Este y otros carcinógenos son *lipofílicos* (aquellos que el cuerpo puede absorber con más facilidad), por lo que son metabolizados hacia metabolitos *hidrofílicos* para facilitar su excreción mediante la adición de grupos funcionales polares lo que **se realiza por reacciones de oxidación** llevadas a cabo por monooxigenasas(MAO), como las del citocromo P450.

Aunque el principal órgano del metabolismo de los fármacos es el hígado, algunas enzimas metabolizantes de fármacos se encuentran con niveles bastante altos en el tracto gastrointestinal, las gónadas, el pulmón, el cerebro y el riñón, y enzimas de ese tipo están sin duda presentes en cierto modo en todas las células vivas.

- Citocromos P450
- Monooxigenasas flavínicas
  - Monoaminoxidasas
- UDP-glucuroniltransferasas
  - Sulfottransferasas
  - Glutación S-transferasas
- Aldehído deshidrogenasas
- Alcohol deshidrogenasas
  - N-acetiltransferasas
  - Quinona reductasas
  - Aldocetorreductasas
- Diversas metiltransferasas, transaminasas, glicosilasas, hidrolasas y esterasas

*Ellen K. Silbergeld, Directora del capítulo, Toxicología, Herramientas y Enfoques. Pag. 24.*

Es importante mencionar que, todas estas reacciones oxidativas pueden también generar **RADICALES LIBRES (RL)** que son capaces junto a las originadas por el propio humo de provocar **MUTACIONES**.<sup>67,68</sup>

Existen varios sistemas de destoxificación y eliminación que participan en la protección frente a estos agentes tóxicos, uno de los más eficientes en la eliminación de electrófilos es el del glutatión reducido (GSH) y glutatión 1transferasa (GST).<sup>69</sup>

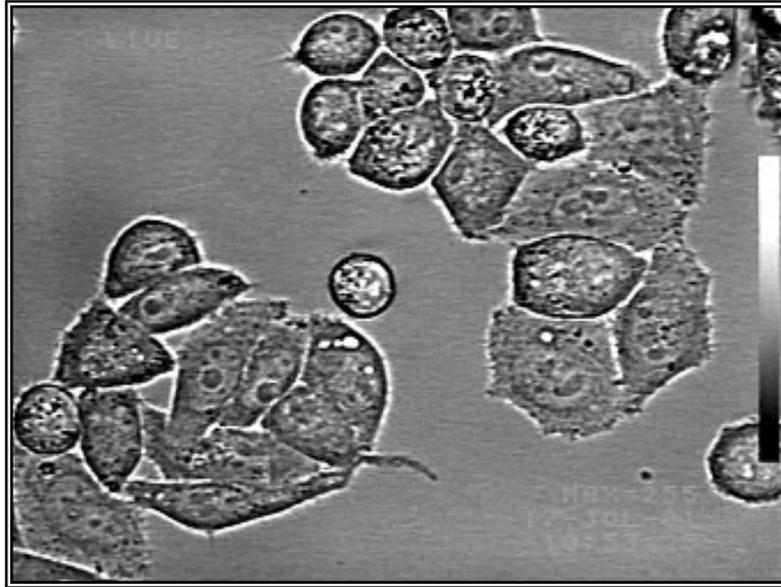
En la actualidad se sabe que la variabilidad genética en las enzimas está implicada en la susceptibilidad individual a sufrir diferentes tipos de tumores.

El humo del tabaco está formado por una **compleja mezcla** de más de **4,000 compuestos** diferentes, algunos de ellos además de ser *mutagénicos* son agentes *carcinogénicos* y están considerados como precursores de cáncer que influyen en el proceso de carcinogenicidad.<sup>70</sup>



Fuente: Diario.Esp, España 2001

- Se estima que en cada bocanada de humo ingresa al organismo la impresionante cifra de **1,015 RL.**<sup>71</sup>
- Estudios realizados con extractos de aire saturado con humo de tabaco han demostrado que existen altas concentraciones de **nicotina**, la sustancia orgánica más abundante en el humo del cigarrillo, tiene un efecto fundamental mediante una **producción muy alta de RL**, particularmente de los radicales: **superóxido (O<sup>2-</sup>), hidroxilo (OH-)**.<sup>72</sup>



*Rudolf Virchow (1821-1902)*

*En la imagen puede verse células sometidas a la acción de radicales libres, la aparición de blebs en la célula y su posterior encogimiento.*

Entre los radicales libres, el superóxido es el más poderoso y dañino para el organismo. Esto es porque debido a su estructura química requiere 3 electrones para reequilibrarse.

Cuando roba esos 3 electrones de otras moléculas, se crea un desequilibrio aún mayor que cuando hay un desequilibrio convencional producido por un solo electrón. También tiende a reequilibrarse así mismo más rápidamente creando más superóxidos con el potencial de causar mucho más daño.

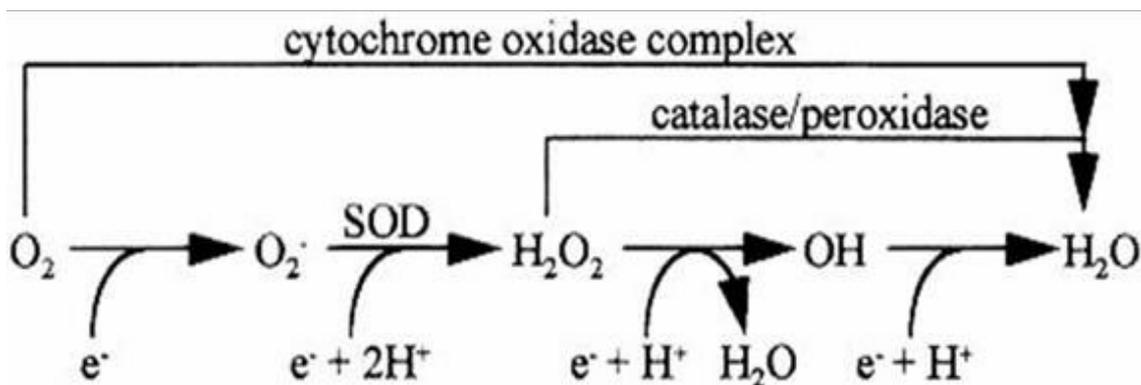
El **NO** de la fase gaseosa y el producido en los pulmones (a partir del aminoácido L-arginina, gracias a la acción de la enzima sintetasa de óxido nítrico,) **Al reaccionar** con el **superóxido** ( $O^{2-}$ ) originado por la auto-oxidación de los compuestos polifenólicos de la fase sólida **Forman rápidamente el peroxinitrito** ( $ONOO^-$ ), el cual es un fuerte agente oxidante y nitrante que junto a otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ( $NO$ ,  $NO_2$ ), es responsable de la muerte celular y puede desempeñar un importante papel en las enfermedades relacionadas directamente con el cigarrillo, tal y como es el caso del **cáncer**.

### 3.6.- SUPERÓXIDO DISMUTASA, COMO POTENTE INHIBIDOR DE OXIDACIÓN CELULAR.

Un estudio clínico realizado por el Dr. Héctor E. Solórzano del Río, Profesor de Farmacología del CUCS de la Universidad de Guadalajara<sup>73</sup>, explica que debido a diversos agentes oxidantes como es el caso del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), forman radicales libres que atacan al ADN, y que una de las enzimas antioxidantes más importante es la **superóxido dismutasa** o **SOD**. La SOD es verdaderamente el mecanismo maestro de defensa de las células para atrapar a los radicales libres y prevenir la oxidación celular.

La SOD ha provocado un gran interés por parte de los investigadores médicos desde su descubrimiento en 1968. Primero se utilizó en forma inyectable para tratar la artritis en adultos y problemas respiratorios en los infantes y para servir como una terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer.

Una mutasa es un tipo de enzima que inicia la reorganización de los átomos en una molécula y la función primaria de la SOD es convertir al radical libre superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un radical libre menos dañino.



*McIntyre: Hypertension, Volume 34(4, Part 1).October 1999.539-545*

Debido a que el superóxido es tan potencialmente dañino, la SOD existe en 2 formas a nivel celular.

En las mitocondrias, las cuales son las estructuras productoras de energía de la célula, la SOD está presente como un enzima que contiene manganeso. En el citoplasma de la célula, el cobre y el zinc son los metales principales encontrados en la estructura de la SOD. De tal modo que para que la enzima sea activa, necesita de un grupo prostético, cuya unión es de tipo covalente, a este grupo prostético se le llama “cofactor”, el cual es de naturaleza no proteica, y suelen ser iones metálicos, tal y como son manganeso, el cobre y el zinc, para el caso específico de la SOD. A esta unión entre la enzima y el cofactor, se le llama “Holoenzima”.<sup>73</sup>

La presencia de la SOD en ambos lugares, en la mitocondria y el citoplasma asegura que mucho del superóxido sea convertido en peróxido de hidrógeno. Una medida de inestabilidad genética inducida por compuestos genotóxicos, además de la presencia de mutaciones en genes diana asociados con el hábito fumador, es el incremento en la formación de micronúcleos.

Por lo cual, una de las causas de aparición de cáncer se debe a un factor genético. Eso no significa que si alguno de nuestros padres tuvo cáncer, estamos condenados a sufrirlo, aunque se tendrá mayor riesgo que si no tuviéramos una historia familiar de cáncer. Al decir que una posible causa de cáncer es el factor genético, se refiere que de ser maligno se debe a un gen. Una vez que un gen que normalmente es responsable de producir células sanas, muta y empieza a producir células enfermas, se llama “oncogen”. Ese gen dañado estimula el crecimiento rápido e incontrolado de células cancerosas. Por el contrario, otra clase de genes llamados genes supresores de tumor se dedica a prevenir crecimientos malignos en el cuerpo.

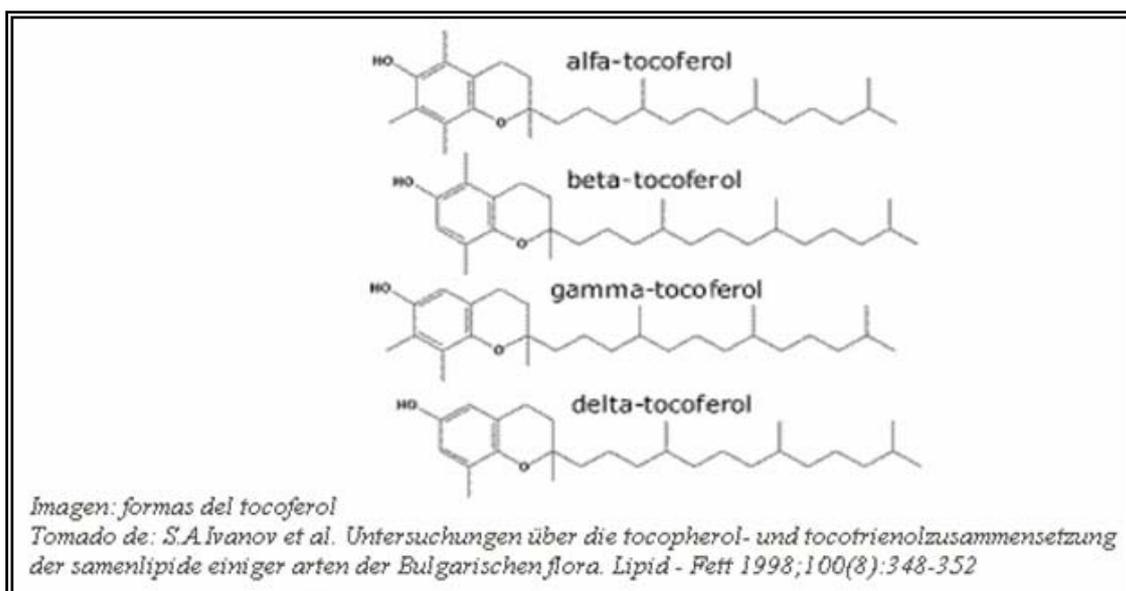
La tarea de estos genes es detener la reproducción de estas células con estructuras de ADN anormales. Pero si los genes supresores de tumor se dañan por los radicales libres, puede que sean incapaces de detener el crecimiento celular irregular, de tal modo que los radicales libres pueden alterar el ADN y la membrana de las células resultando en un código genético mutado dentro de la célula. Esto al final puede conducir al desarrollo de un cáncer.

Es así como las investigaciones sobre este estudio, concluyen que la SOD puede inhibir la metástasis, retrasar el crecimiento tumoral y prevenir el daño celular inicial que puede llevar al desarrollo de un cáncer. Además, la SOD puede ayudar a proteger y reparar el tejido sano que es dañado por los tratamientos de quimioterapia y radioterapia. Algunos estudios han demostrado que la SOD no solamente inhibe la propagación de los tumores sino que además cuando se combina con la quimioterapia la hace más efectiva.<sup>74</sup>

### 3.7.- FACTORES DE VARIABILIDAD EN FUMADORES.

Como es de esperarse diversos factores pueden influir en la frecuencia basal de MNs; la edad ha sido ampliamente estudiada, relacionándose mayor edad con mayor índice de MNs.<sup>75-77</sup>

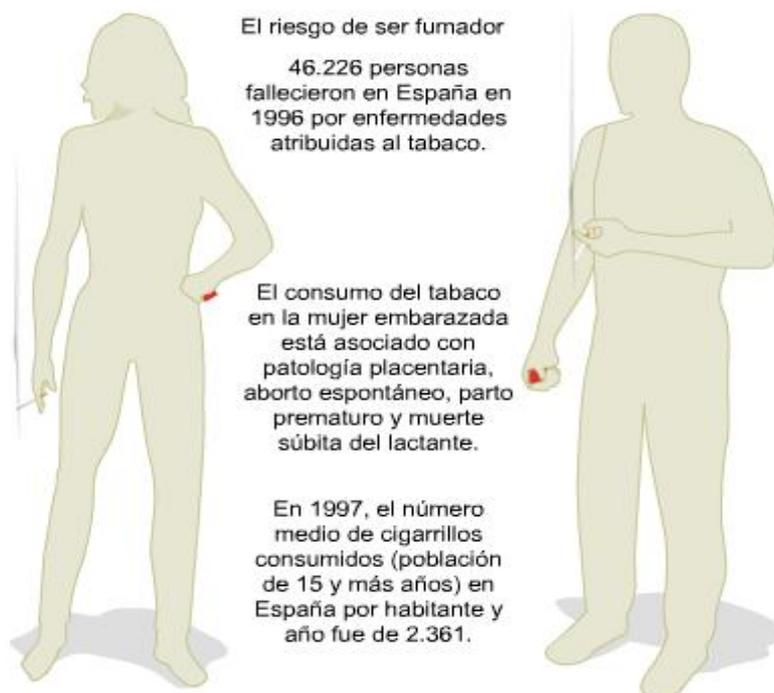
En el caso de las mujeres, la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis se relacionan con un mayor índice de MNs<sup>78</sup>. Otros estudios relacionan un descenso del número de MNs al suplementar la dieta con agentes antioxidantes como la vitamina E, vitamina C,  $\beta$  carotenos, ginseng e incluso infusiones de té, como por ejemplo té verde.<sup>79, 80</sup>



En el caso del análisis del género, las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres y el número de MNs incrementa cuando se superan los 35 años de edad. La presencia de homocisteína en plasma, el déficit de Ácido fólico y Vitamina B12 conducen a un incremento de la frecuencia basal de MNs.<sup>1, 3, 81</sup>

Diversos estudios se han centrado en el estudio de las drogas citostáticas utilizadas en los protocolos antitumorales en pacientes con cáncer, cuya acción está dirigida a frenar la proliferación celular. La exposición reiterada a agentes citotóxicos puede causar efectos adversos tales como mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer debido a que pueden inducir daños genéticos y alterar los mecanismos de división en células que se multiplican rápidamente. El resultado de estos trabajos demostró que los complejos químicos utilizados incrementan de modo significativo el número de MNs.<sup>82, 83</sup>

Estudios realizados a nivel mundial, concluyen que la frecuencia de células micronucleadas en el grupo de fumadores es 70% más alta que el observado en el grupo de no fumadores<sup>84</sup>. El mismo resultado fue observado por otros autores quienes concluyeron que el consumo de alcohol sumado al hecho de ser fumador activo incrementaba significativamente el número de MNs.<sup>79</sup>



La importancia por parte de laboratorios de investigación, con la finalidad de demostrar que existen diferencias significativas en la frecuencia de MNs entre diversos grupos de fumadores y no fumadores, demostraron que los fumadores habituales que consumían 30 o más cigarrillos/día y que no estaban expuestos a ningún otro agente tóxico externo manifestaban un incremento significativo en el número de MNs; y un estudio más reciente obtuvo las mismas conclusiones siendo el límite de consumo de tabaco 20 cigarrillos/día.<sup>85, 86</sup>

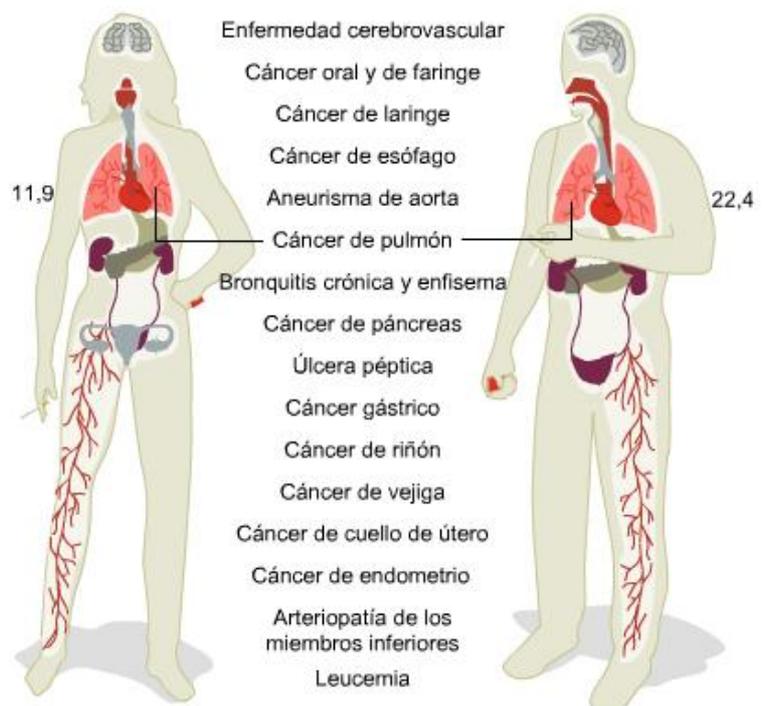
Tabla 3. Prevalencia de células micronucleadas en descamación.

Tipo de Exposición.	Tipo celular	Control %	Expuesto %	Células analizadas
Fumadores <sup>34</sup>	Bucal	3.3	26.3	1000
Plaguicidas <sup>35</sup>	Bucal	4.0	34.0	1000
Arsénico <sup>36</sup>	Bucal	0.4	3.4	1000
Oxido de Etileno <sup>37</sup>	Bucal	0.23	0.48	3042

### 3.8.- Cáncer de pulmón, como efecto colateral por consumo de cigarrillo.

El cáncer de pulmón es una de las enfermedades más graves y uno de los cánceres con mayor incidencia en el ser humano.

El cáncer de pulmón es el responsable de los mayores índices de mortalidad a escala mundial. Es la primera causa de mortalidad por cáncer en el varón y la tercera, después del de colon y mama, en la mujer.



Veces por las que hay que multiplicar (11,9 Vs 22,4) la posibilidad de contraer la enfermedad por tabaquismo.  
Fuente: Diario.Esp, España 2001

## **DEMOSTRACIÓN CLÍNICA.**

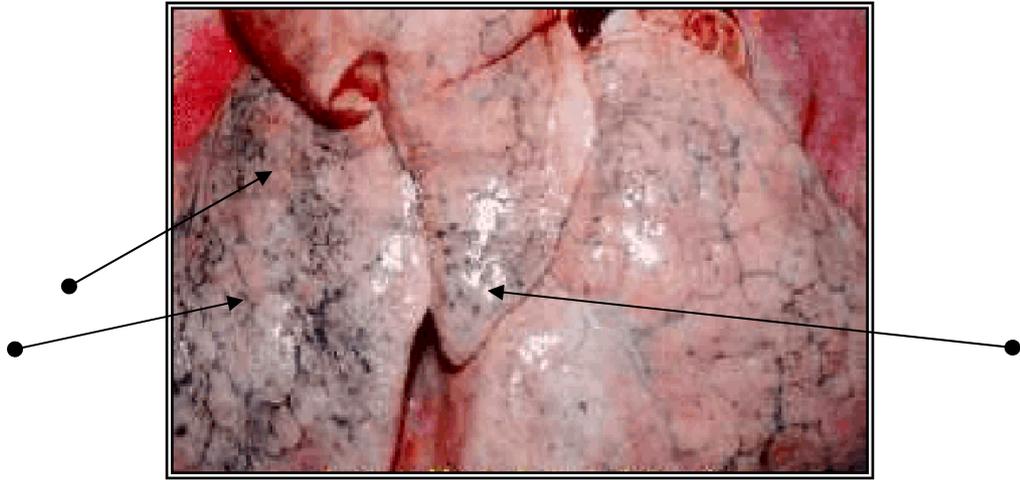
Procede en gran parte de la observación de los cambios histológicos en el epitelio respiratorio de los fumadores donde existen en más del 90% células atípicas frente al 0,9% de los no fumadores, la patogenia fue la siguiente:

El humo del tabaco llega a los alvéolos y allí los componentes hidrosolubles son absorbidos por la mucosa, no siendo absorbibles los liposolubles, tal y como son la brea o el alquitrán que contienen los hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos.

La brea es fagocitada por los macrófagos alveolares y eliminada con los mismos en el esputo, pero no todos los macrófagos alveolares se van a eliminar en él, muchos de ellos en su recorrido hacia la glotis se rompen dejando la brea libre.

Esta se deposita en las “carinas”, que es la agrupación de dos bronquios, sobre todo en los más superiores y periféricos, produciendo irritación de los mismos. La brea irrita la mucosa y destruye la superficie del epitelio respiratorio obligando a la membrana basal a aumentar su capacidad de proliferación.

La membrana basal aumenta tanto su hiperplasia (que es el aumento controlado del número de células en un órgano o tejido) de células basales o estratificación del epitelio, que termina produciendo metaplasia (el cual es un proceso por el que las células del organismo tienen la capacidad de cambiar de un tipo a otro) de células escamosas, que evolucionará a displasia (una anomalía en el desarrollo de un órgano), lo que es un carcinoma in situ y finalmente a anaplasia (llamada así a la pérdida de las características propias de una célula cuando sufre diferenciación tumoral.) como carcinoma in situ y carcinoma invasor.



*Carcinomas pulmonares causados por el humo del tabaco y sus componentes.*

#### **4.- ASPECTOS GENERALES DE LA CAVIDAD BUCAL.**

Al hablar de micronúcleos, y específicamente, en el epitelio de la cavidad bucal, debemos mencionar las principales generalidades que la componen, de tal modo que la cavidad bucal consta de dos partes, las cuales corresponden al vestíbulo externo el cual esta limitado por los labios y mejillas, y la cavidad bucal, la cual esta separada del vestíbulo por los rebordes alveolares, portadores de los dientes y las encías. Es importante mencionar que el limite superior de la cavidad bucal está formado por los paladares tanto blando como duro, el piso de la boca y la base de la lengua, de tal modo que el limite posterior esta limitado por los pilares de las fauces y las amígdalas.

Podemos separar a las estructuras principales de la mucosa bucal en tres, las cuales son:

- Mucosa masticatoria
- Mucosa de revestimiento
- Mucosa sensorial

De tal modo que la mucosa presente en encías y paladar duro, las cuales son zonas que se encuentran en la cavidad bucal y que constantemente están expuestas a las fuerzas abrasivas de la masticación, se denomina “Mucosa Masticatoria”; y que por tal motivo el epitelio de esta zona es grueso, con poca flexibilidad y además duro, esto debido al proceso de queratinización, el cual es un proceso natural de maduración celular. Por otra parte, tenemos a la mucosa de revestimiento, la cual se localiza en la superficie bucal del labio, paladar blando piso de la boca, cara inferior de la lengua y en los carrillos, y cuya principal cualidad es ser mucho más grueso que la mucosa masticatoria y generalmente no se encuentra queratinizado, además de presentar movimiento y/o distensión de la misma.

Y finalmente hablaremos de la mucosa sensorial, por lo que debemos especificar que se localiza en el dorso de la lengua, presentando diversos tipos de papilas linguales, las cuales realizan funciones tanto sensoriales como mecánicas, por lo que podemos decir que también tiene funciones semejantes a la mucosa masticatoria, pero con las diferencias que antes mencionadas.

Sin embargo, en general la función principal de la mucosa bucal, es la de brindarle protección a los tejidos más profundos de dicha cavidad, sin embargo no podemos olvidar que también proporciona cierta regulación térmica, secreción de saliva y la de brindar sensibilidad.

Ahora bien, hablemos de los dos tejidos principales de la mucosa bucal, los cuales son:

- El epitelio escamoso estratificado, llamado epitelio bucal.
- Y un tejido conectivo subyacente, llamado lámina propia o corion.

De tal modo que, el epitelio bucal es un epitelio plano estratificado que consta de células estrechamente adosadas entre sí, las cuales se encuentran dispuestas en una serie de capas o estratos distintos que forman una barrera primaria entre el medio bucal y los tejidos más profundos, las cuales son:

- Capa basal (*stratum basale*), esta formada por una capa de células cúbicas o cilíndricas adyacentes a la membrana basal.
- Enseguida tenemos, la capa de células espinosas (*stratum spinosum*), la cual esta formada por células más grandes, esféricas o elípticas que se encuentran intercomunicadas por numerosos puentes intercelulares llamados desmosomas.

- Posteriormente se encuentra la capa glandular (*stratum granulosum*), dicha capa esta formada por células más grandes y aplanadas que contienen una serie de pequeños gránulos intensamente basófilos.
- Y Finalmente tenemos la capa córnea (*stratum corneum*), la cual es la capa queratinizada compuesta por células eosinófilas muy aplanadas.

## 5.- ASPECTOS GENERALES SOBRE EL EPITELIO BUCAL.

La matriz de donde obtuvimos las respectivas muestras para realizarles una preparación específica y posteriormente realizarles una microscopia, fue el epitelio bucal, el cual básicamente es el revestimiento húmedo del tracto intestinal, el pasaje nasal y otras actividades corporales que se comunican con el exterior.

En la cavidad bucal este revestimiento se llama mucosa oral o mucosa bucal la cumple con varias funciones, siendo una de las más importantes la protección que otorga a los tejidos más profundos de dicha cavidad, otra de las funciones de dicha mucosa bucal es la de órgano sensorial, ya que es considerado un regulador de temperatura corporal y un medio a través del cual se segrega saliva. De igual modo actúa como barrera contra algunos microorganismos.<sup>87</sup>

### 5.1.- RENOVACIÓN EPITELIAL.

Los epitelios son tejidos cuyas células tienen vida limitada. En consecuencia, hay una renovación constante de estas células gracias a una actividad mitótica continua. La velocidad de esta renovación es variable, pudiendo ser muy rápida en ciertos casos y lenta en otros. Como ejemplos extremos puede citarse el epitelio de revestimiento intestinal, que se renueva cada dos o tres días, y el de las glándulas salivales y del páncreas que tardan más de dos meses para renovarse. La morfología celular, se deteriora progresivamente.<sup>88</sup>

El punto final de la degeneración, es decir, la muerte celular, conduce a tres acontecimientos:

Cariopícnosis, cariorresis, cariólisis. (Tabla 12)

Tabla 4. Alteraciones celulares degenerativas.<sup>89</sup>

<b>ETAPA INICIAL</b>	<b>ETAPA FINAL</b>
Agrandamiento nuclear	Cariorresis
Engrosamiento del borde nuclear	Cariopícnosis
Clarificación Nuclear	Cariólisis
Tumefacción nucleolar	Coagulación (acidofilia)
Mitosis anormales (multinucleación)	Licuefacción del citoplasma

Por otra parte, al hablar de renovación epitelial, es importante mencionar el proceso de proliferación que lleva a cabo este tejido, y es aquí justamente donde debemos señalar que del mismo modo que la epidermis y el revestimiento del tracto gastrointestinal, el epitelio bucal mantiene su integridad estructural mediante un sistema de renovación celular de manera continua, lo anterior mediante un proceso de mitosis a nivel celular específicamente en la capa basal, de tal modo que dichas células migran hacia la superficie para reemplazar a aquellas que se pierden durante el proceso de descamación natural, propio del organismo, de esta forma las células de las capas basales corresponden a la población celular progenitora, que en los epitelios gruesos, como los de los carrillos y el paladar, están formadas por dos o hasta tres capas celulares.

Por lo anterior decimos que las células madre se dividen en dos subpoblaciones celulares funcionalmente distintas:

- Células germinativas, las cuales son células madre que se caracterizan por renovarse muy lentamente y cuya función es la de reproducir células basales y retener así el potencial proliferativo del tejido.
- Así mismo tenemos las células amplificadoras, cuya función es la de aumentar el número de células disponibles para una maduración posterior.

Sin embargo, y sin importar los subtipos celulares de la capa basal, después de realizar el proceso de mitosis celular, cada célula hija puede renovarse en la población madre o entrar al compartimiento de maduración.<sup>90</sup>

Es importante mencionar, que el tiempo de recambio, dicho en otras palabras, ***el tiempo que le lleva a una célula dividirse y atravesar todo el epitelio durante su diferenciación en el carrillo, es de 25 días.***<sup>90, 91</sup>

Mencionábamos, el proceso de maduración celular, el cual propiamente es llamado queratinización, es decir, se refiere a la maduración epitelial, por lo que dicho proceso incluye, la síntesis de una proteína fibrosa, la cual es insoluble en agua llamada queratina, es rica en enlaces disulfuro y que pertenece a la clasificación de las  $\alpha$  queratinas, las cuales son ricas en restos Cys (Cisteína), con las cadenas adyacentes entre cruzadas, lo cual explica la insolubilidad y la resistencia a la estricción, dos de las propiedades biológicas más importantes de las  $\alpha$  queratinas.

Así mismo se clasifican en duras y blandas, en este caso nos evocaremos a las queratinas blandas tales como la piel y los callos, por que los enlaces disulfuro resisten cualquier clase de fuerzas que tiendan a deformarlos.<sup>73</sup>

También se incluye la división, diferenciación, maduración, migración y la exfoliación celular.

## **5.2.- FORMACIÓN DE QUERATINA**

Cabe mencionar, que la formación de queratina se da principalmente en las células del tercer estrato de los epitelios y se acompaña de la aparición de los elementos estructurales específicos como son: los tonofilamentos, las tonofibrillas, los gránulos de queratohialina, los querainosomas y el engrosamiento de las membranas celulares, en especial de su cara citoplasmática.<sup>87</sup>

Las células que actúan en la queratinización reciben el nombre de queratinocitos e incluyen a células de los cuatro estratos celulares tanto de los

epitelios que queratinizan como de los que no lo hacen. El empaquetamiento intracelular de los tonofilamentos determina el grado de queratinización.

Por tal motivo, dependiendo de la región de la cavidad bucal que se estudie este epitelio puede ser grueso o delgado; completamente queratinizado (ortoqueratinizado) o no queratinizado (para queratinizado).

De tal modo que el epitelio de la mucosa bucal está constituido por tejido conectivo (Cn) laxo que lo sostiene y nutre, llamado lámina propia o corium.

De acuerdo a las características funcionales se pueden observar variaciones histológicas y podrán encontrarse mucosas queratinizadas en paladar o encías y con gran variedad papilar, como ocurre en lengua cubierta por una mucosa especializada.

Los epitelios de la cavidad bucal se dividen en queratinizados y no queratinizados, dependiendo si superficialmente están protegidos o no por esta capa cornea o queratina; a su vez la capa queratinizada se llamará ortoqueratina (si las células no muestran núcleos) y paraqueratina (si los muestran), lo más común dentro de la cavidad bucal es que los epitelios queratinizados sean constituidos por paraqueratina, estos son epitelios estratificados al estar conformados por varias capas o estratos. Se les denomina de planos por la apariencia de sus capas más superficiales. El último apelativo es el de descamativo, lo describe el alto índice de renovación celular, las células "muertas" descaman y son constantes y aceleradamente reemplazadas. De tal forma que el epitelio de la mucosa bucal es estratificado, plano y descamativo, pudiendo ser también queratinizado.

### **5.3.- CAPAS DEL EPITELIO BUCAL.**

El epitelio bucal, este tipo de epitelio en general consta de 3 capas cuando no son queratinizados y de 4 cuando la capa final de recubrimiento es queratinizada.

Es muy común que se observen algunas prolongaciones de tejidos epiteliales hacia el tejido conectivo, las cuales también suelen ser denominadas digitaciones, sin embargo esta condición puede ser diversa ya que en algunas condiciones patológicas esta imagen puede variar.

## **EPITELIO DE REVESTIMIENTO.**

En la superficie de contacto con el tejido conjuntivo, los epitelios presentan una estructura llamada lámina basal. Esta estructura está formada, principalmente, por colágeno y glicoproteínas. En algunos epitelios sometidos a rozamiento, como la piel, por ejemplo, la lámina basal se fija al tejido conjuntivo subyacente por medio de finas fibrillas de colágeno, llamadas fibrillas de anclaje.

Esta lámina separa y une el epitelio al tejido conjuntivo, pero permite el paso de diversas moléculas.

La superficie libre del tejido epitelial recibe el nombre de superficie apical, que presenta estructuras que aumentan su superficie y/o les dan movimiento.

Las dimensiones y formas de las células epiteliales de revestimiento varían considerablemente: desde células aplanadas hasta células prismáticas altas, pasando por todas las formas intermedias. Los epitelios pueden ser:

Por su número de capas: simples, es decir de una sola capa, estratificados con varias capas o pseudoestratificados, las cuales tienen núcleos de diversas alturas pero las células se implantan en la misma lámina basal.

Por las formas de sus células: **escamosos, cúbico, cilíndrico.**

A continuación se describen los epitelios más comunes del cuerpo humano:





Ejemplos de epitelio de mucosa bucal.

Tabla 5. Descripción de los epitelios más comunes del cuerpo humano.

<i>Según el número de capas</i>	<i>Según la forma de las células</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Función</i>
Simple	Escamoso	Revestimiento de los vasos	Facilita la movilización de las vísceras
	Cúbico	Revestimiento ovárico	Revestimiento
	Cilíndrico	Revestimiento intestinal	Protección, lubricación, absorción y digestión
Estratificado	Escamoso	Revestimiento de la piel, esófago y boca	Protección
	Cilíndrico	Conjuntiva del ojo	Protección
Seudo-estratificado	Cilíndrico	Revestimiento de la tráquea y los bronquios	Protección, transporte de partículas extrañas al exterior y secreción

## **EPITELIO QUERATINIZADO.**

En términos generales el epitelio queratinizado, presenta gránulos de queratohialina en el estrato granuloso que aparece como partículas basófilas al

realizar una microscopia y como estructuras electrodensadas en cortes ultra finos. Son de forma irregular, su tamaño habitual es de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$ , y son sintetizados por los ribosomas.<sup>90</sup>

En un corte histológico, un epitelio queratinizado, como el de la piel, muestra los cuatro estratos celulares mencionados.

### **EPITELIO NO QUERATINIZADO.**

Hablando sobre las características del epitelio no queratinizado, podemos decir que presenta modificaciones en las capas celulares, además de encontrarse en los labios, carrillos, mucosa alveolar y piso de la boca y en algunos casos es mucho más grueso que el queratinizado, por ejemplo en los carrillos es de 500  $\mu\text{m}$  de espesor.<sup>90</sup>

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Sin lugar a dudas, las células que conforman la mucosa bucal representan un tejido blanco de exposición a ciertos agentes tóxicos tanto físicos como químicos y biológicos.

El determinar el daño a nivel cromosómico, mediante células epiteliales exfoliadas de la mucosa bucal esto por determinación de micronúcleos, es sumamente importante ya que esto nos permite obtener información del daño citogenético que pudiera llegar a causar daño posterior al individuo, de tal modo que esta prueba tenga carácter preventivo.

### **6.1.- HIPÓTESIS.**

A mayor cantidad de cigarrillos fumados y en relación al tiempo de exposición, se presentará una frecuencia mayor de MNs y por lo tanto un riesgo más elevado a desarrollar daño a nivel citogenético en los individuos expuestos a este tipo de toxinas, como es el humo del cigarrillo.

### **6.2.- OBJETIVO GENERAL.**

Realizar una evaluación en diferentes muestras de células exfoliadas del epitelio bucal de jóvenes fumadores para determinar el número de micronúcleos presentes y establecer la relación dosis-frecuencia, entre jóvenes fumadores, respecto al daño carcinógeno así como también el efecto citotóxico, con tendencia a desarrollar algún tipo de cáncer.

## 7.- METODOLOGÍA.

Antes de comenzar con la toma de muestra se les pidió a los voluntarios leer y firmar el siguiente consentimiento en el cual se le informa sobre el procedimiento general, además de realizarle algunas preguntas sobre sus antecedentes ocupacionales, tabaquismo, alcoholismo, dieta, edad, sexo y tiempo de exposición.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRA.

Se le ha pedido que participe voluntariamente como parte de este estudio de investigación que se realizara en los laboratorios de la Universidad del Valle de México Campus Chapultepec en la Ciudad de México, Distrito Federal; este estudio consiste en determinar el efecto citotóxico del humo del cigarrillo en células exfoliadas del epitelio bucal causante de la formación de Micronúcleos (MNs) como marcadores biológicos del daño carcinogénico.

El procedimiento para que usted participe es mediante la toma de una muestra con ayuda de un hisopo o abate lenguas, con el cual se realizara un raspado inocuo y suave de epitelio de la mucosa bucal.

Esta muestra se realizara con material nuevo y limpio, respetando en todo momento los derechos de usted y de igual modo los datos acerca de su participación serán **ESTRICTAMENTE CONFIDENCIALES**, por lo que se utilizarán únicamente iniciales y números en lugar de su nombre propio.

\_\_\_\_\_  
Nombre del voluntario.

Masculino

Femenino

Edad: \_\_\_\_\_ años.

\_\_\_\_\_  
Fecha (dd-mmm-aaaa)

Estudia

Trabaja

Ambas

¿Fuma cigarrillos? Si  No

¿Cuántos cigarrillos consume al día? \_\_\_\_\_

¿Padece alguna enfermedad? Si  No

¿Esta bajo algún tratamiento farmacológico? Si  No

¿Tiene problemas relacionados con el consumo de alcohol? Si  No

¿Cuáles son los tipos de alimentos que incluye en su dieta diaria?

\_\_\_\_\_  
Firma y fecha de aceptación o huella digital.

FOLIO: 00101

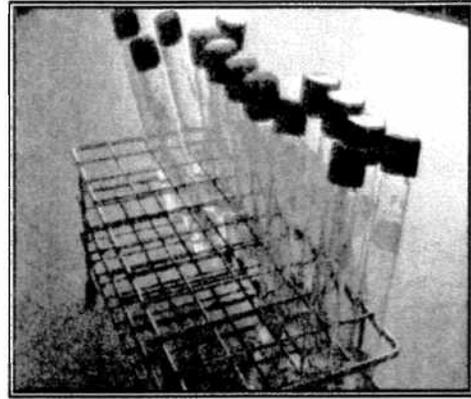
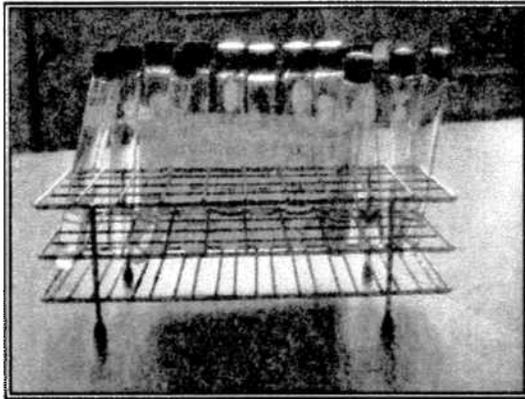
## 7.1.- SUJETOS DE ESTUDIO.

Los voluntarios a estudiar, fueron un total de 40 individuos de ambos sexos (de los cuales 30 de ellos eran individuos expuestos directamente al humo del cigarrillo, otro grupo de 6 individuos que no estaban expuestos al agente tóxico del humo del cigarrillo sirvió como nuestro control negativo y 4 individuos más que de igual modo no estaban expuestos al humo del cigarrillo pero que además consumían grandes cantidades de picante como parte de su dieta diaria.) y cuyas edades oscilaban entre 13 y 16 años de edad, todos ellos estudiantes de la escuela secundaria técnica 94 "Ciro González Blacayer", y que ninguno de ellos estaba bajo tratamiento medico de algún fármaco de ningún tipo y no presentaban ninguna enfermedad viral o bacteriana aparente.

## 7.2.- TOMA DE MUESTRAS.

Para todos los casos, las muestras se obtuvieron de la mucosa bucal, de tal modo que a cada voluntario se le pidió que se enjuagara la boca con un poco de agua, para eliminar cualquier tipo de residuo de alimentos que pudiera interferir con la determinación, posteriormente se realizo el raspado en los carrillos de la cavidad bucal con ayuda de un abate lenguas de madera, a modo de que una vez realizado el raspado las muestras se colocaron en metanol absoluto contenido en tubos de ensaye con tapa de baquelita previamente identificados, lo anterior con la finalidad de evitar cualquier tipo de crecimiento bacteriano o contaminación de las mismas, una vez recolectadas las muestras se almacenaron en refrigeración, para posteriormente realizar el proceso de fijación.



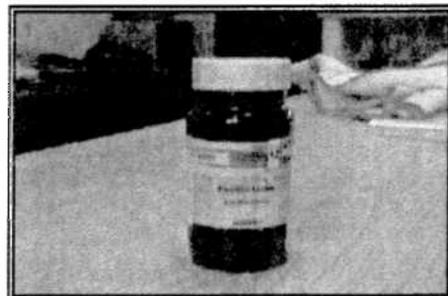
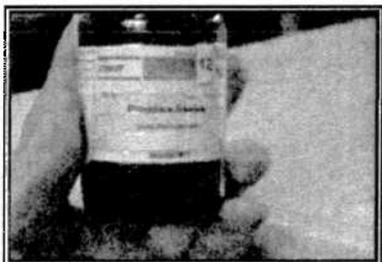


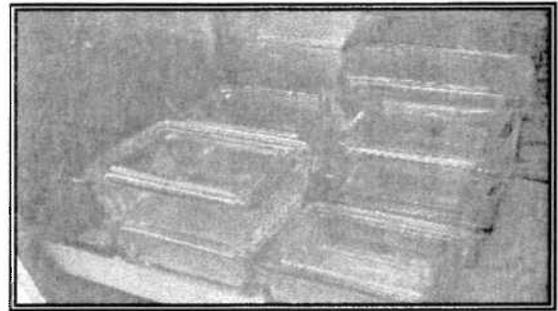
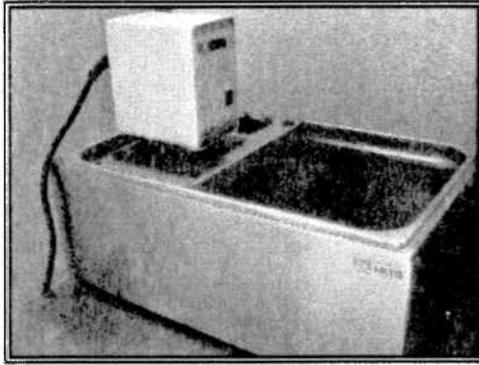
### 7.3.- FIJACIÓN DE MUESTRAS.

Las muestras se centrifugaron, después se resuspendió el botón celular con ayuda de una pipeta Pasteur, y se colocó una cantidad no muy grande de muestra, y se realizó un frotis en un portaobjetos limpio y desengrasado previamente marcado y se dejaron fijar durante 20 minutos, de tal modo que las trazas de metanol se evaporaran. Las muestras no fueron teñidas de inmediato por lo que se almacenaron en refrigeración a aproximadamente unos 4 °C hasta su tinción.

### 7.4.- TINCIÓN CON FUCSINA BÁSICA

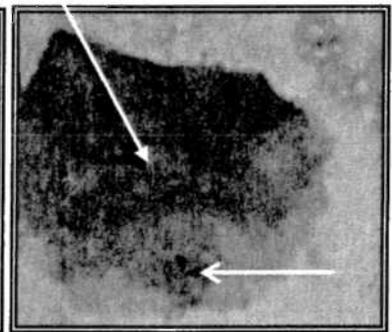
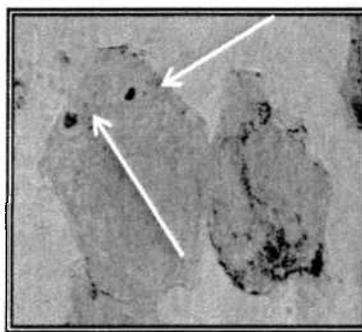
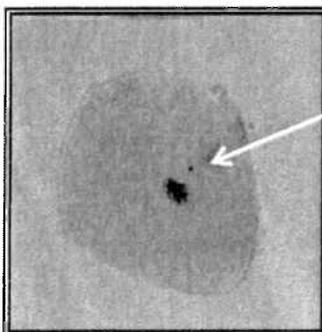
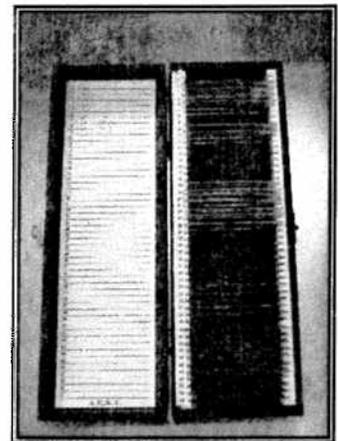
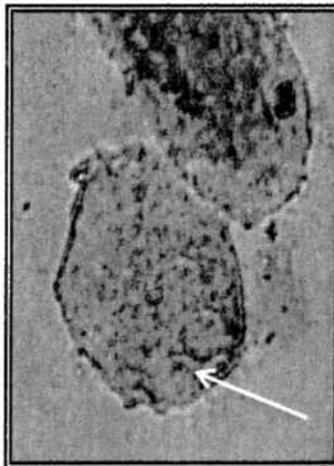
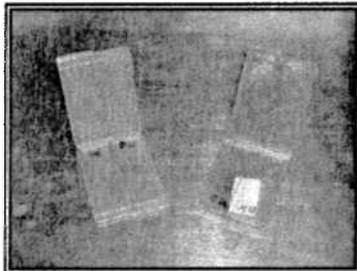
Una vez que las muestras fueron fijadas en sus respectivas laminillas, estas se lavaron con agua destilada, para posteriormente ser hidrolizadas en un baño con HCl [1N] en cajas Koplín. Una vez realizada la hidrólisis, las muestras se enjuagaron con agua destilada, se dejaron escurrir y se colocaron en una cámara con fucsina básica, para después nuevamente enjuagar con agua destilada y dejar secar al aire.





### 7.5.- MICROSCOPIA DE MUESTRAS.

El análisis microscópico de las muestras se realizó con un lente de 10X y objetivos de 10 y 40X, sin embargo en algunos casos fue necesario utilizar el objetivo de 100X aplicando un poco de aceite de inmersión para facilitar la lectura de las muestras.



Células de epitelio bucal con presencia de Micronúcleos (MNs)

## 7.6.- CRITERIO DE IDENTIFICACIÓN DE MNs.

Los criterios que se utilizaron para estimar las frecuencias de MNs fueron establecidos previamente por Heddle y Salamote en 1981; Heddle y Cols en 1981; Stich y Rosin en 1983; Livingston y Cols en 1990; dichos criterios son los siguientes:

- Morfológico. Esto abarca la textura, forma y tamaño de MNs. De tal modo que la textura debe ser comparable a la del núcleo principal, en cuanto a la forma y tamaño de los MNs deben ser redondos u ovalados, y su tamaño, 1/3 en comparación del núcleo principal.
- Citoquímico. Este criterio se basa en la relación positiva del ADN con el reactivo de fucsina básica.
- Localización en la célula. Finalmente este ultimo criterio se refiere a que los MNs se encuentren en el mismo plano focal y separados físicamente del núcleo principal.

Además de los criterios anteriores, se tomaron en cuenta otras aberraciones.<sup>8</sup>

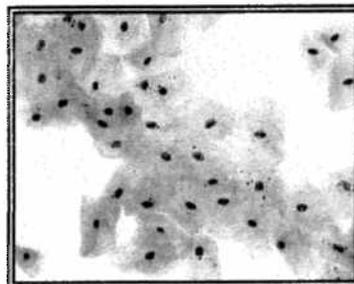
- Células binucleadas: Presencia de dos núcleos en una célula.
- "Broken egg": Se refiere a un fragmento nuclear unido al núcleo principal por material nuclear, este termino fue aplicado por Sarto, cerca del año de 1988.
- Picnosis: En donde el núcleo se encuentra contraído.
- Cromatina condensada: La cromatina aparece en forma agregada.

- Cariorresis: En este caso existe desintegración de la membrana nuclear.
- Cariolisis: En esta última, se presenta una disolución de la cromatina o material nuclear sin que exista una desintegración de la membrana nuclear, de tal modo que se aprecia una especie de núcleo remanente o fantasma.

### **7.7.- CRITERIO PARA CUANTIFICACIÓN.**

Durante este proyecto se analizaron un aproximado de 1,000 células por cada individuo, de tal modo que si la frecuencia de MNs era menor a 3, se volvían a analizar otras 1,000 células, así hasta un máximo de 3,000 células, lo anterior con la finalidad de eliminar la probabilidad de que el análisis microscópico para la identificación de MNs pudiera haber sido azarosa.

Sin embargo en algunas ocasiones el número de células en la laminilla fueron menores a 1,000, por tal motivo se volvió a tomar un poco más de la muestra inicial que se almaceno en refrigeración, precisamente por cualquier problema que pudiera surgir durante el análisis. Es así, que las células con más de un MN fueron cuantificadas como células micronucleadas.<sup>91</sup> Las atipias celulares se cuantificaron simultáneamente con el análisis de las células micronucleadas.



**Micronúcleos en células de epitelio bucal.**

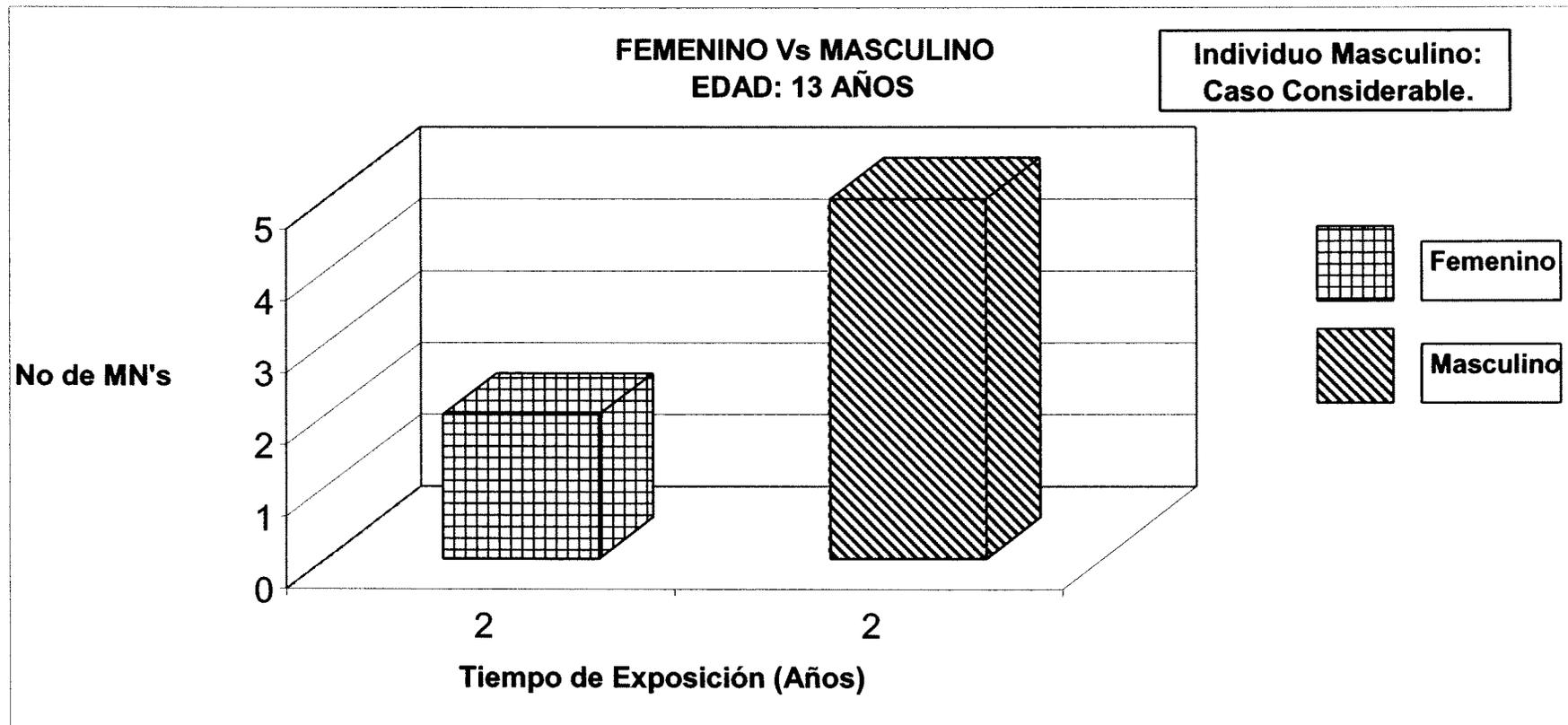
## 8.- RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA.

Tabla 6.

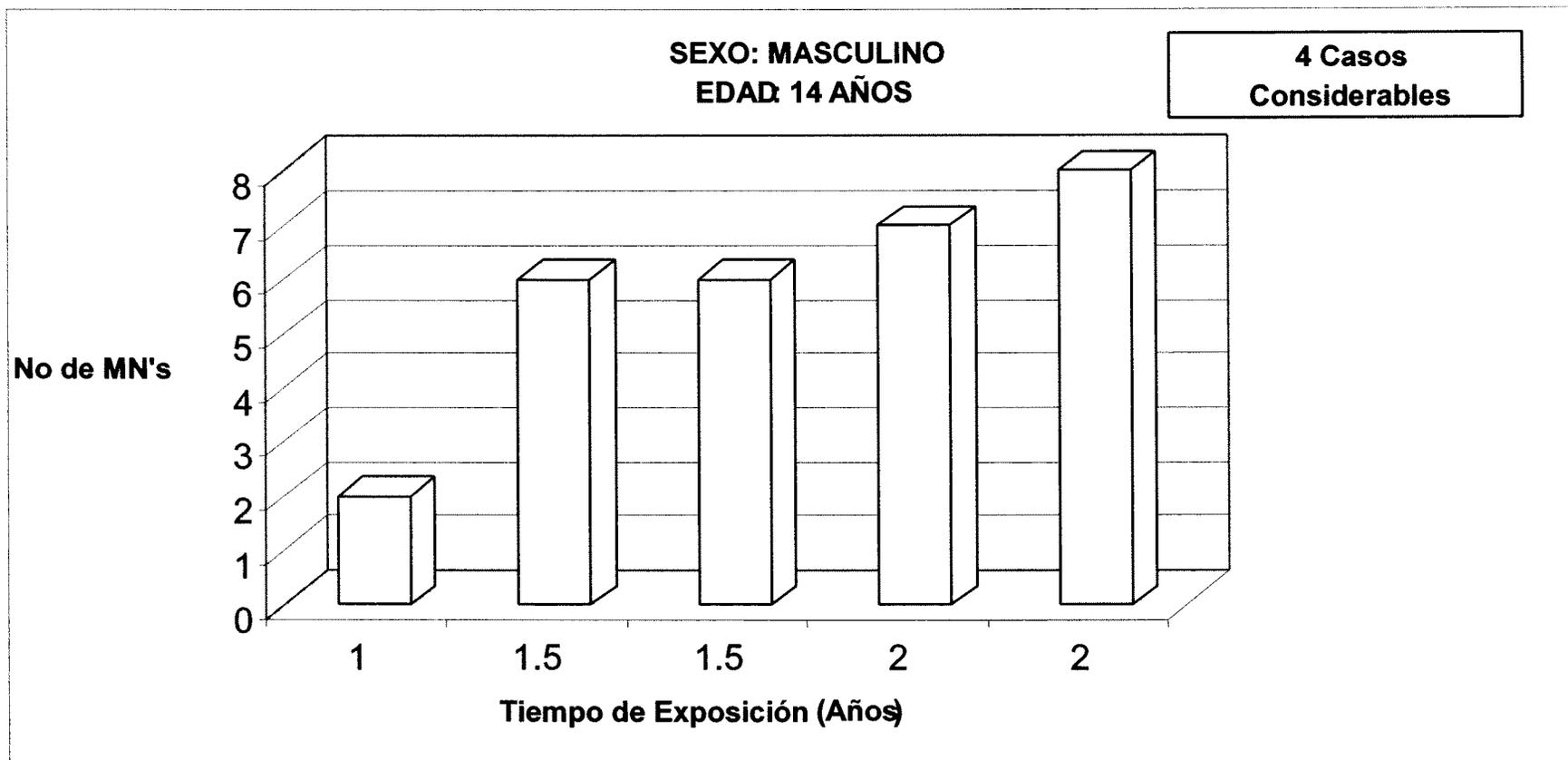
Individuo	Sexo	Edad (Años)	Cigarrillos por día	Tiempo de exposición (Años)	Nº de MNs
101	Femenino	13	7	2	2
102	Masculino	13	6	2	5
103	Femenino	14	3	1	2
104	Femenino	14	9	1	5
105	Femenino	14	11	1.5	5
106	Femenino	14	16	1.5	6
107	Femenino	14	22	1.5	7
108	Masculino	14	4	1	2
109	Masculino	14	12	1.5	6
110	Masculino	14	10	1.5	6
111	Masculino	14	18	2	7
112	Masculino	14	23	2	8
113	Femenino	15	7	2	0
114	Femenino	15	2	2	2
115	Femenino	15	5	2.5	2
116	Femenino	15	6	2.5	2
117	Femenino	15	11	2.5	3
118	Femenino	15	15	2.5	5
119	Femenino	15	17	3	5
120	Femenino	15	19	3.5	6
121	Masculino	15	5	2	0
122	Masculino	15	9	2	2
123	Masculino	15	14	2.5	5
124	Masculino	15	15	3	4
125	Masculino	15	19	3	6
126	Masculino	15	20	3	7
127	Masculino	15	22	3	7
128	Masculino	15	25	3.5	9
129	Femenino	16	10	4	1
130	Masculino	16	10	4	5
Blanco	Masculino	14	0	0	2
Blanco	Masculino	15	0	0	3

<b>Blanco</b>	<b>Masculino</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Blanco</b>	<b>Femenino</b>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Blanco</b>	<b>Femenino</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Blanco</b>	<b>Femenino</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Blanco (Picante)</b>	<b>Femenino</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Blanco (Picante)</b>	<b>Femenino</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>Blanco (Picante)</b>	<b>Masculino</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>Blanco (Picante)</b>	<b>Masculino</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>

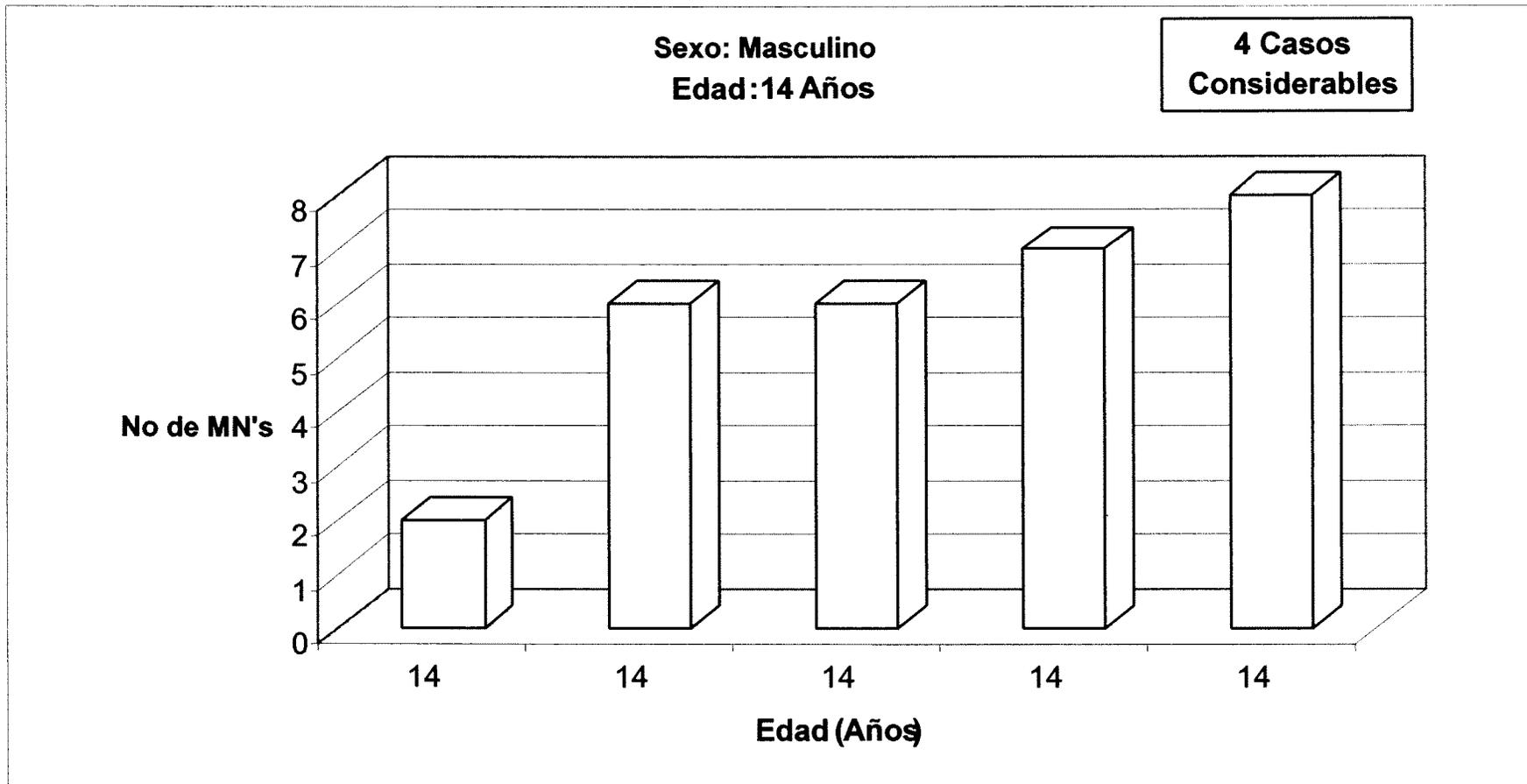
## 8.1.- GRAFICAS COMPARATIVAS.



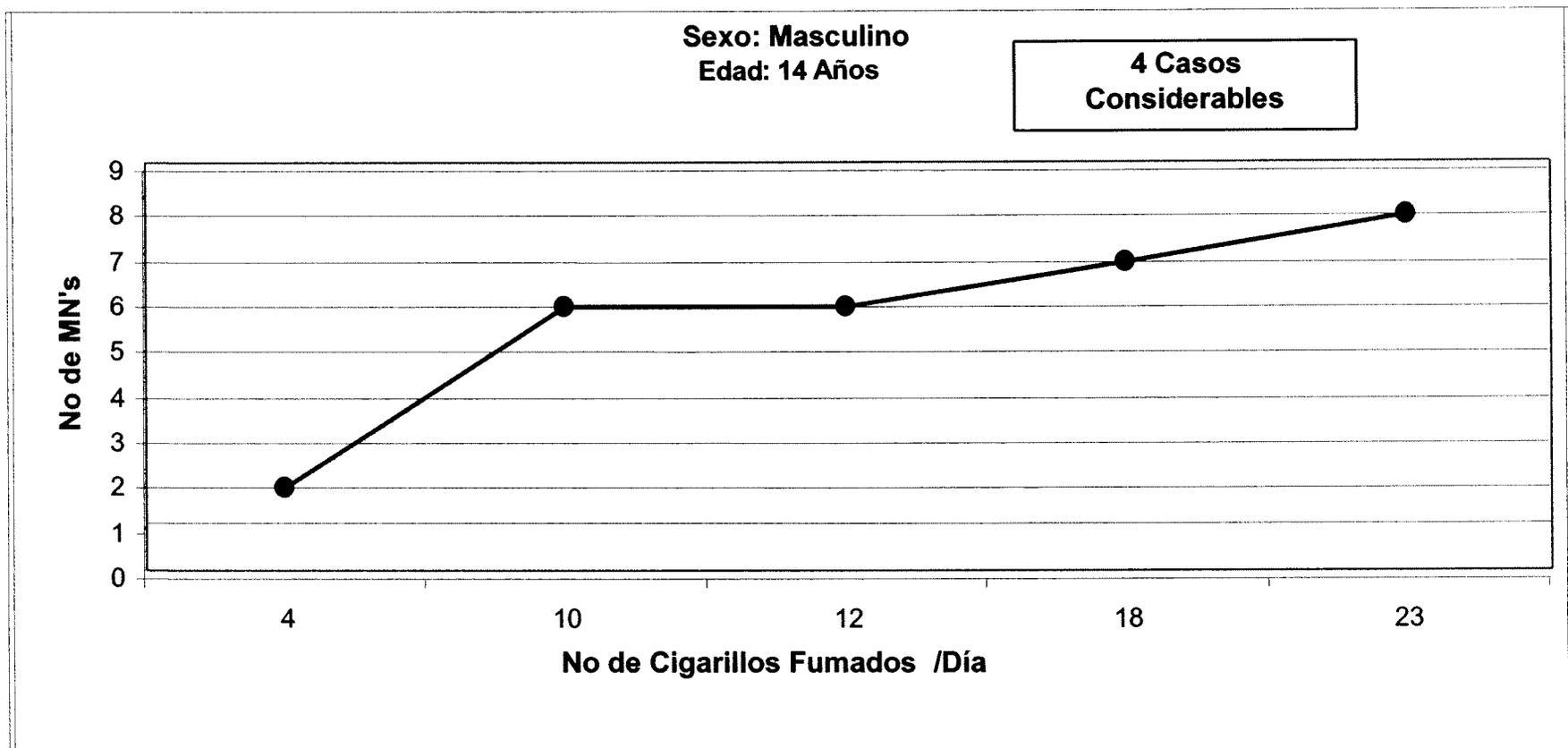
Grafica 3. Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 5 MNs representando un daño a nivel citogenético.



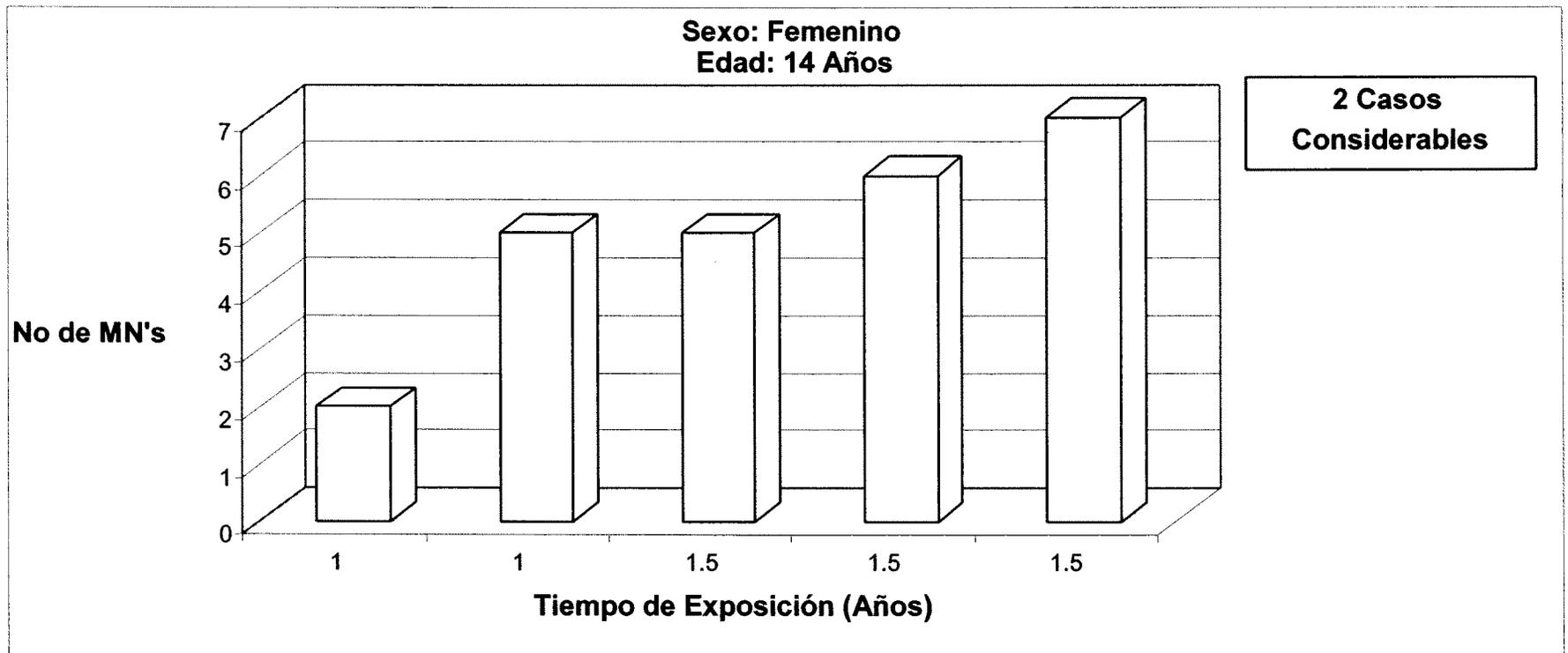
Grafica 4. Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



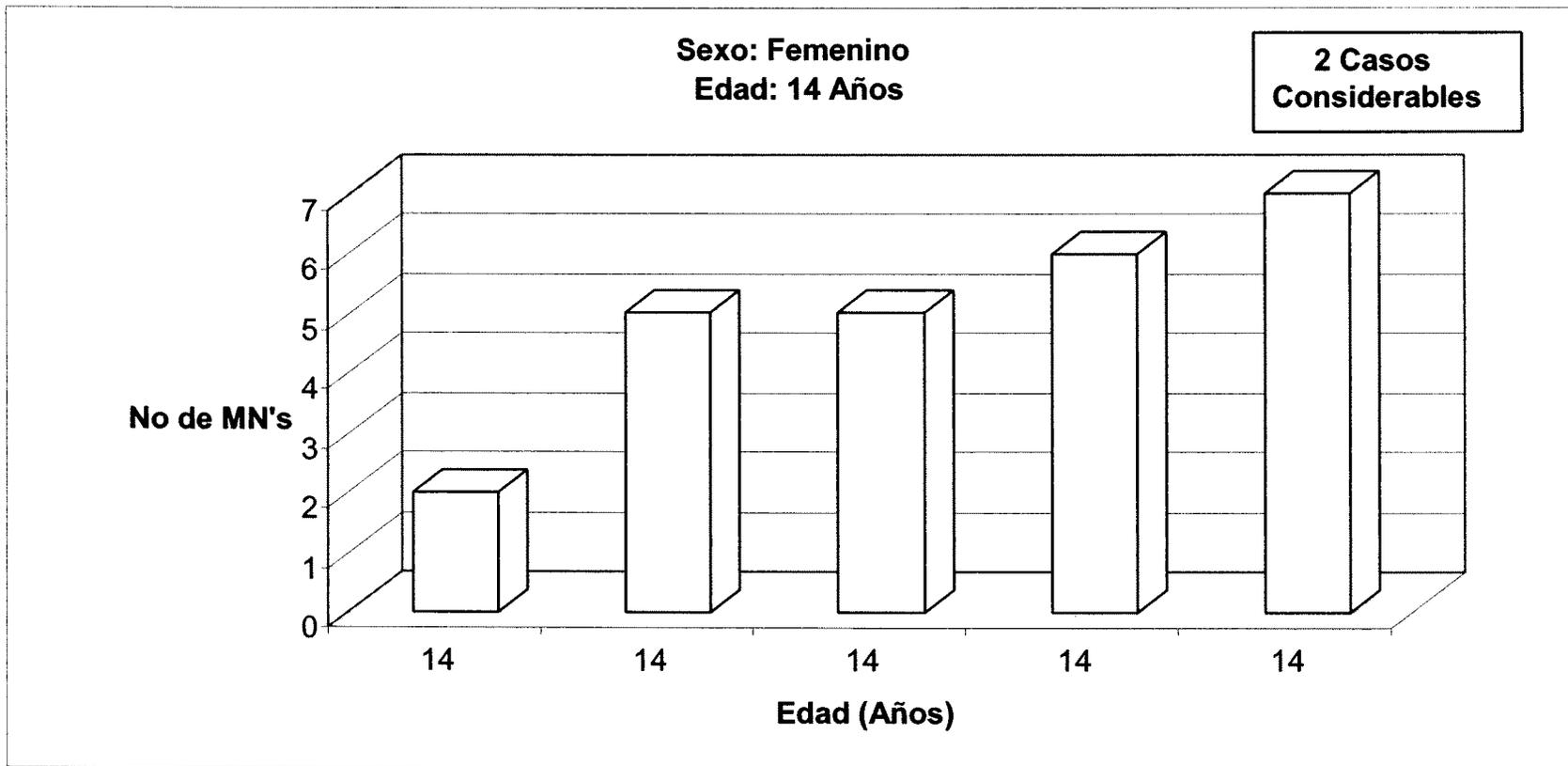
Grafica 8. Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



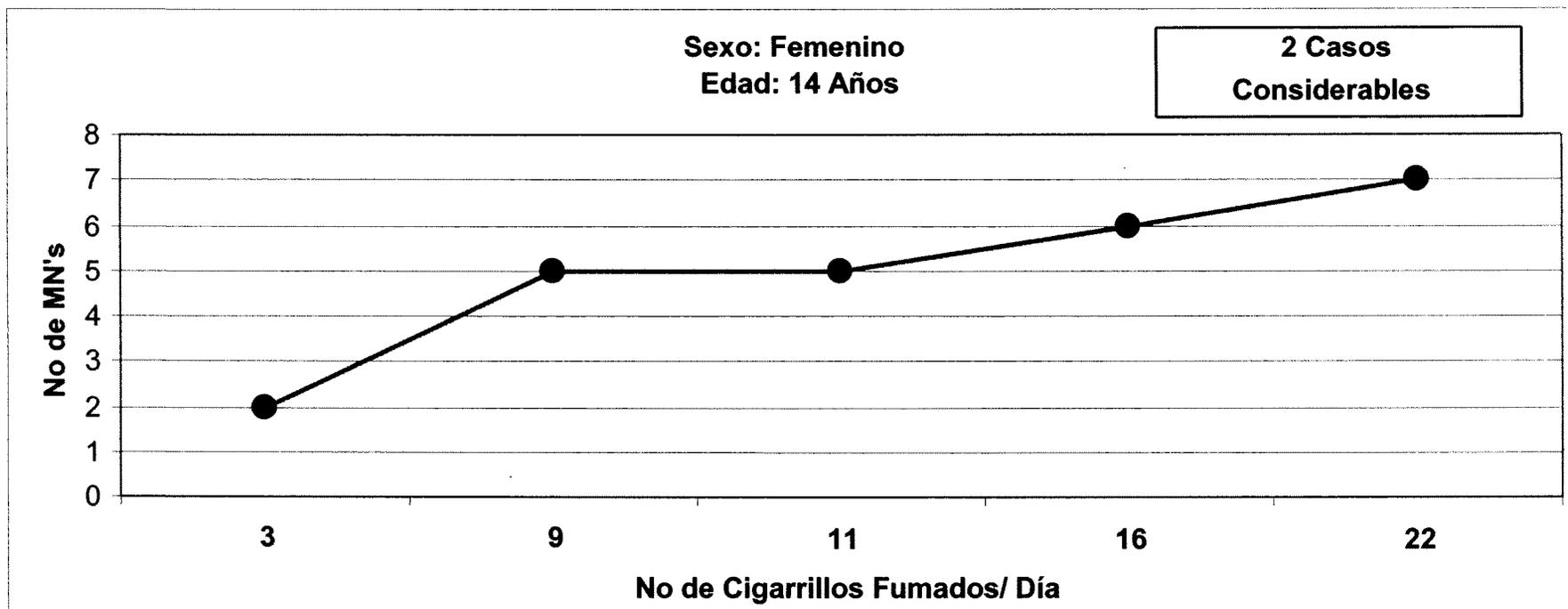
Grafica 15. Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



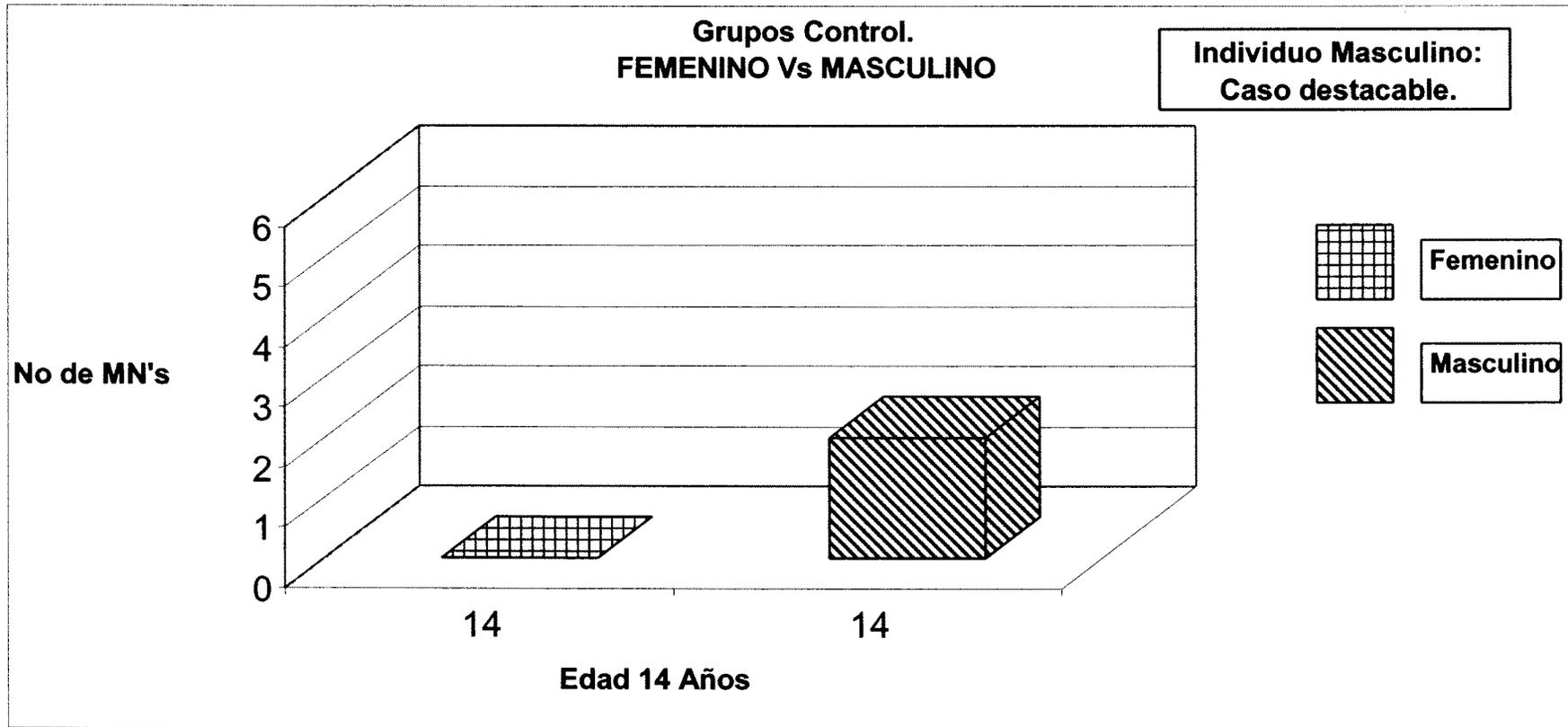
Grafica 5. Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica dos (2) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



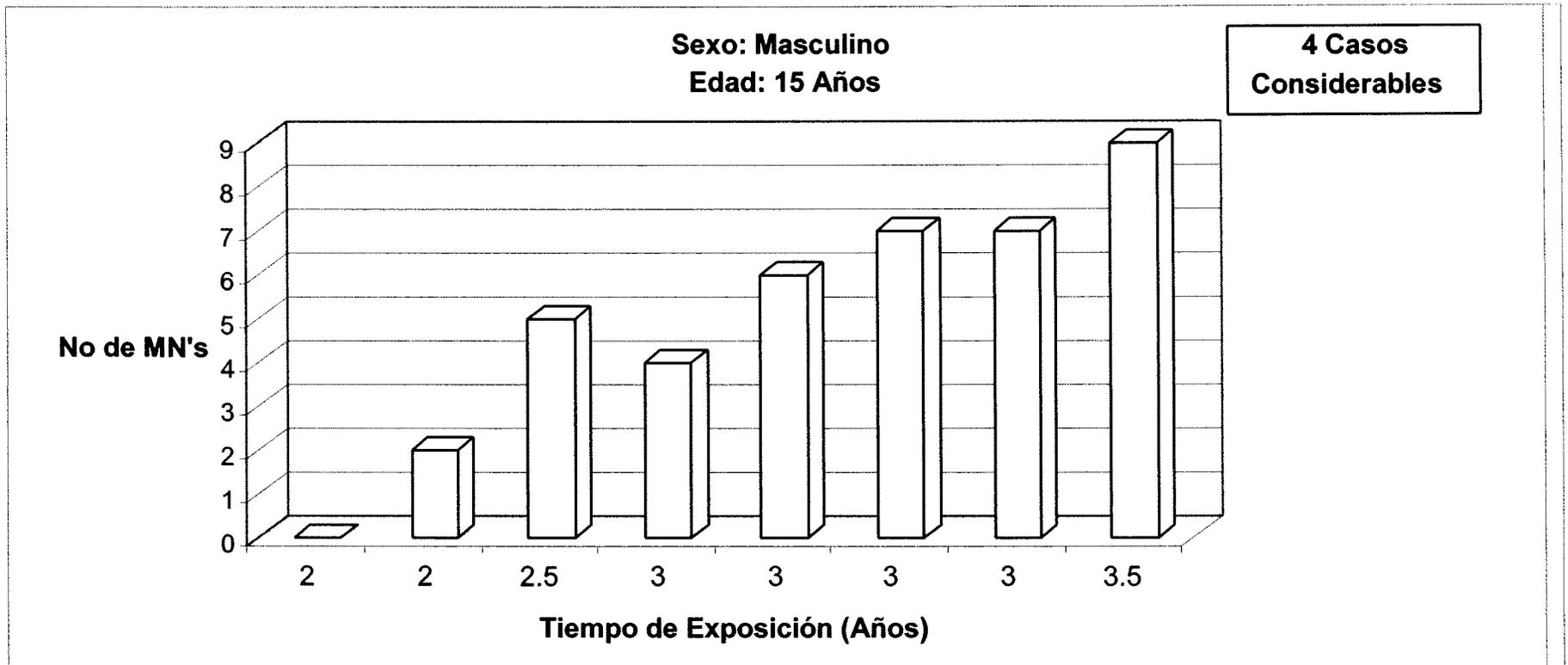
Grafica 9. Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica dos (2) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



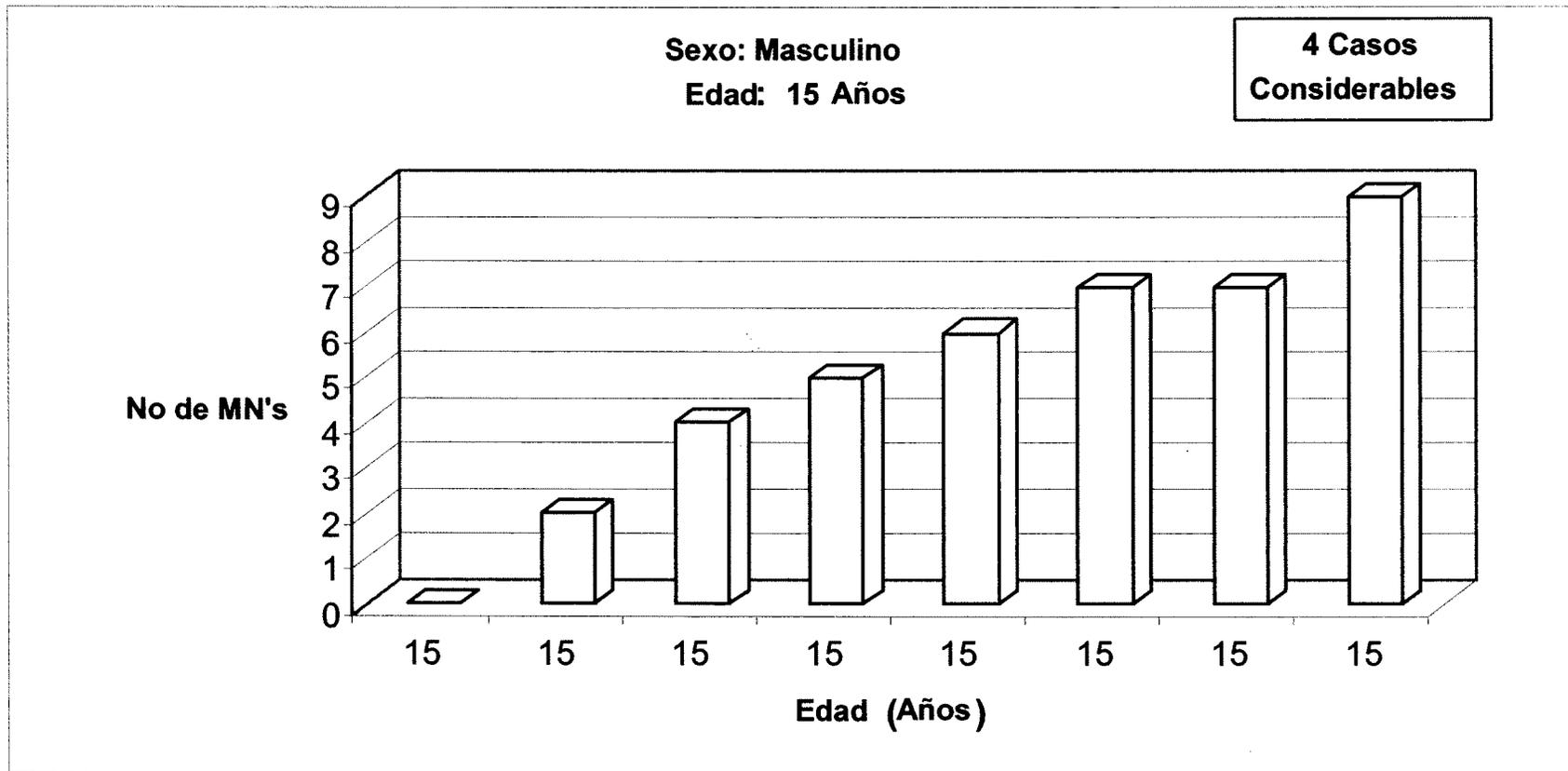
Grafica 16. Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica dos (2) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



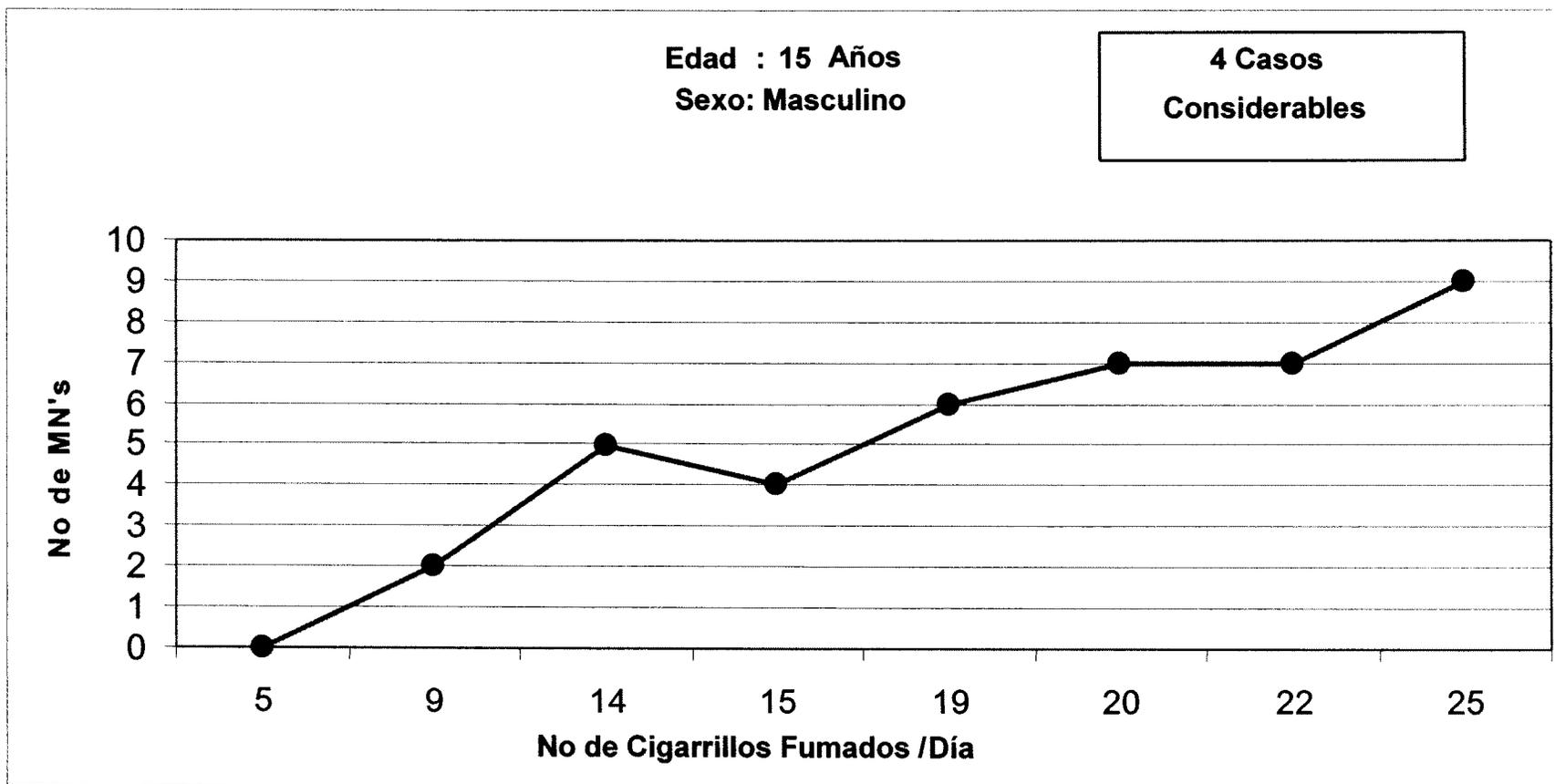
Grafica 17. Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 2 MNs.



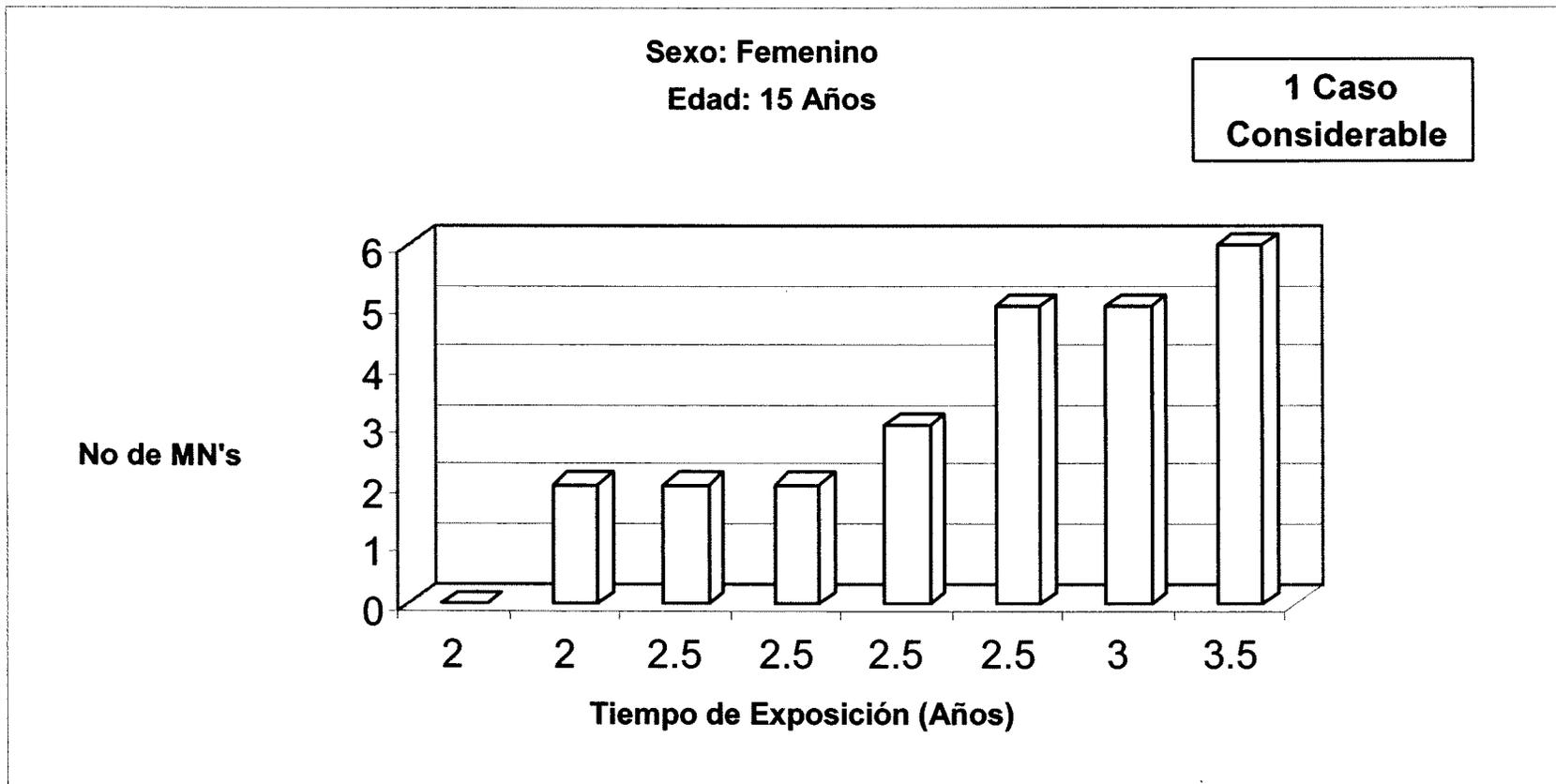
Grafica 6. Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



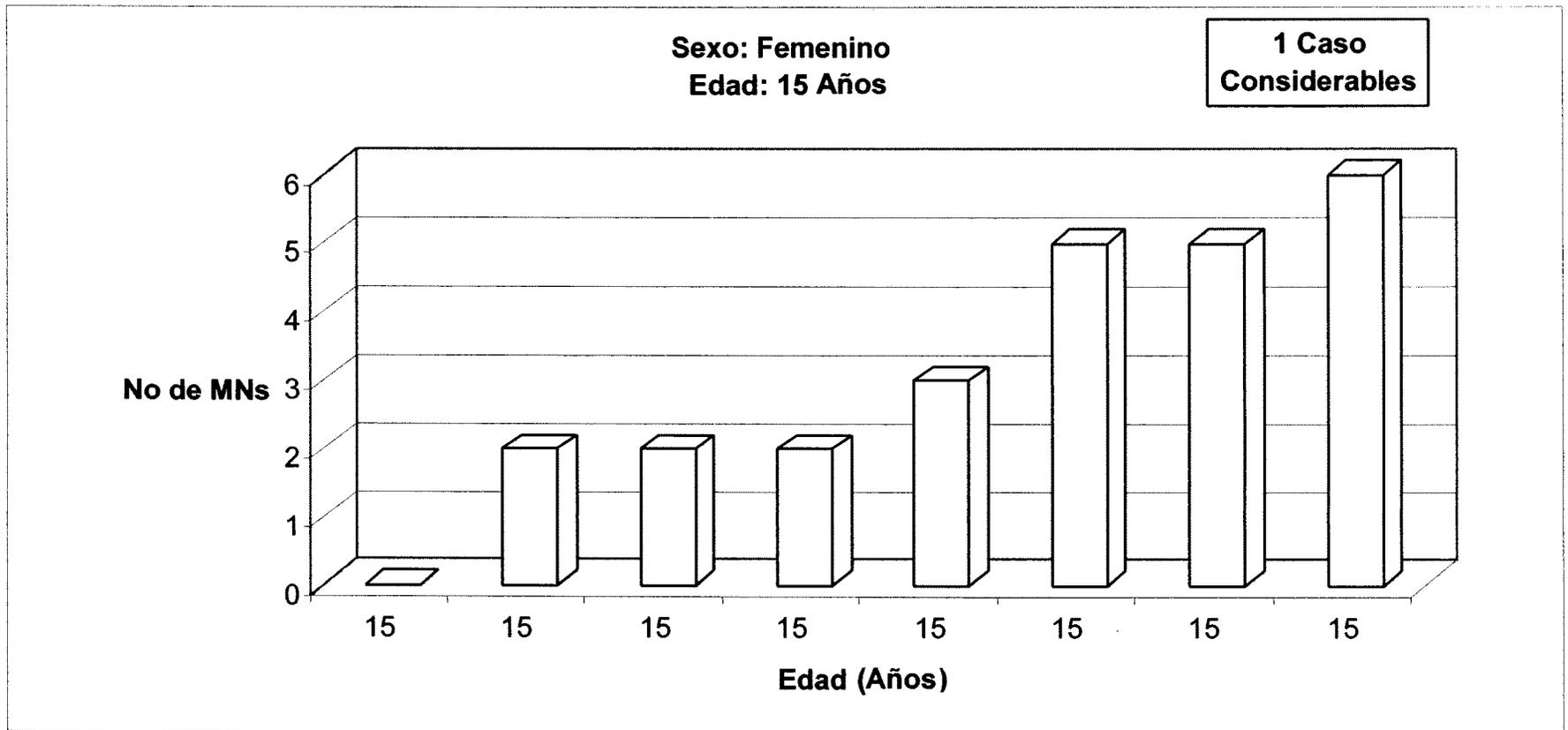
Grafica 10. Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



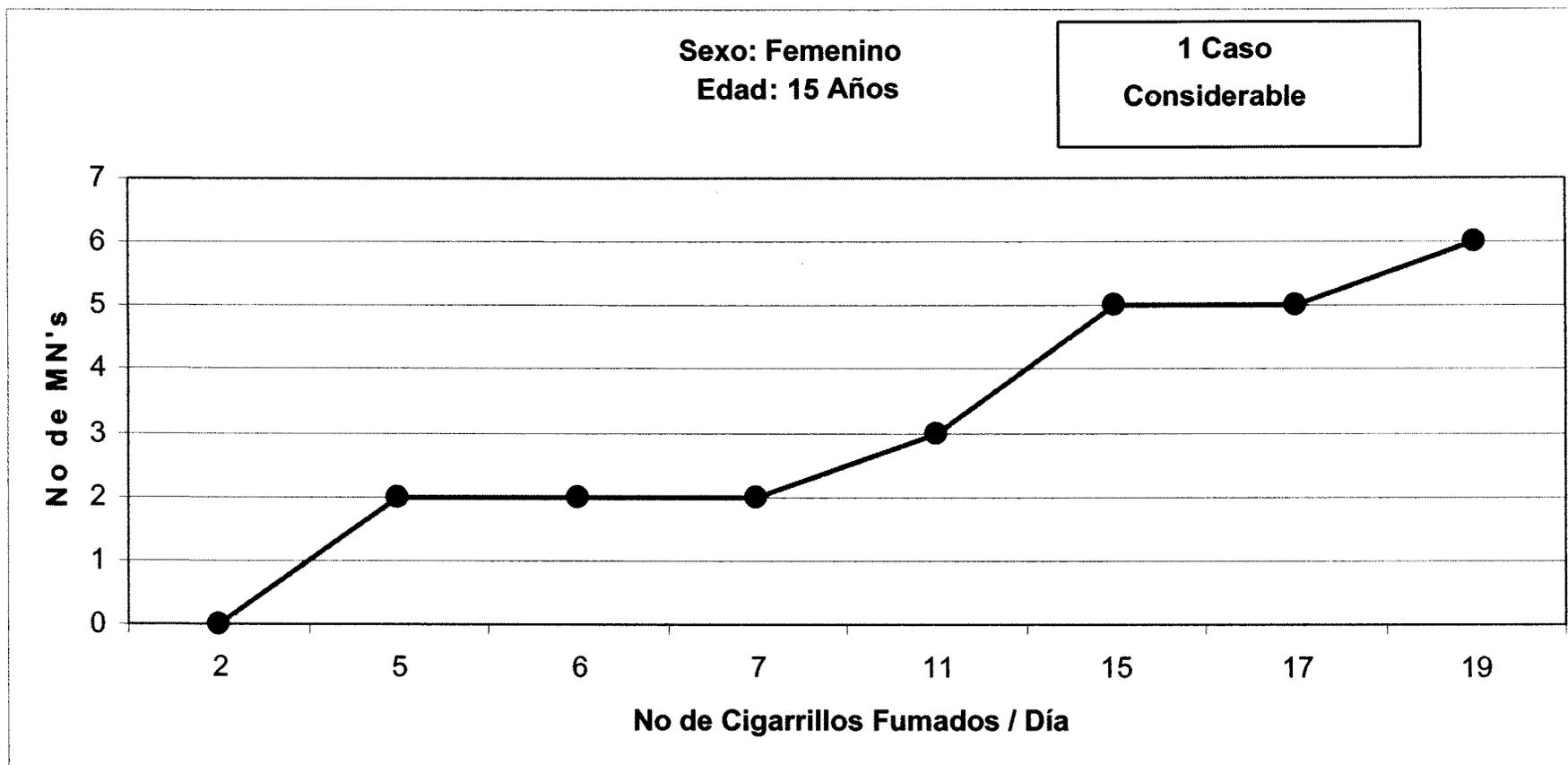
Grafica 13. Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica cuatro (4) casos de individuos que presentan 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



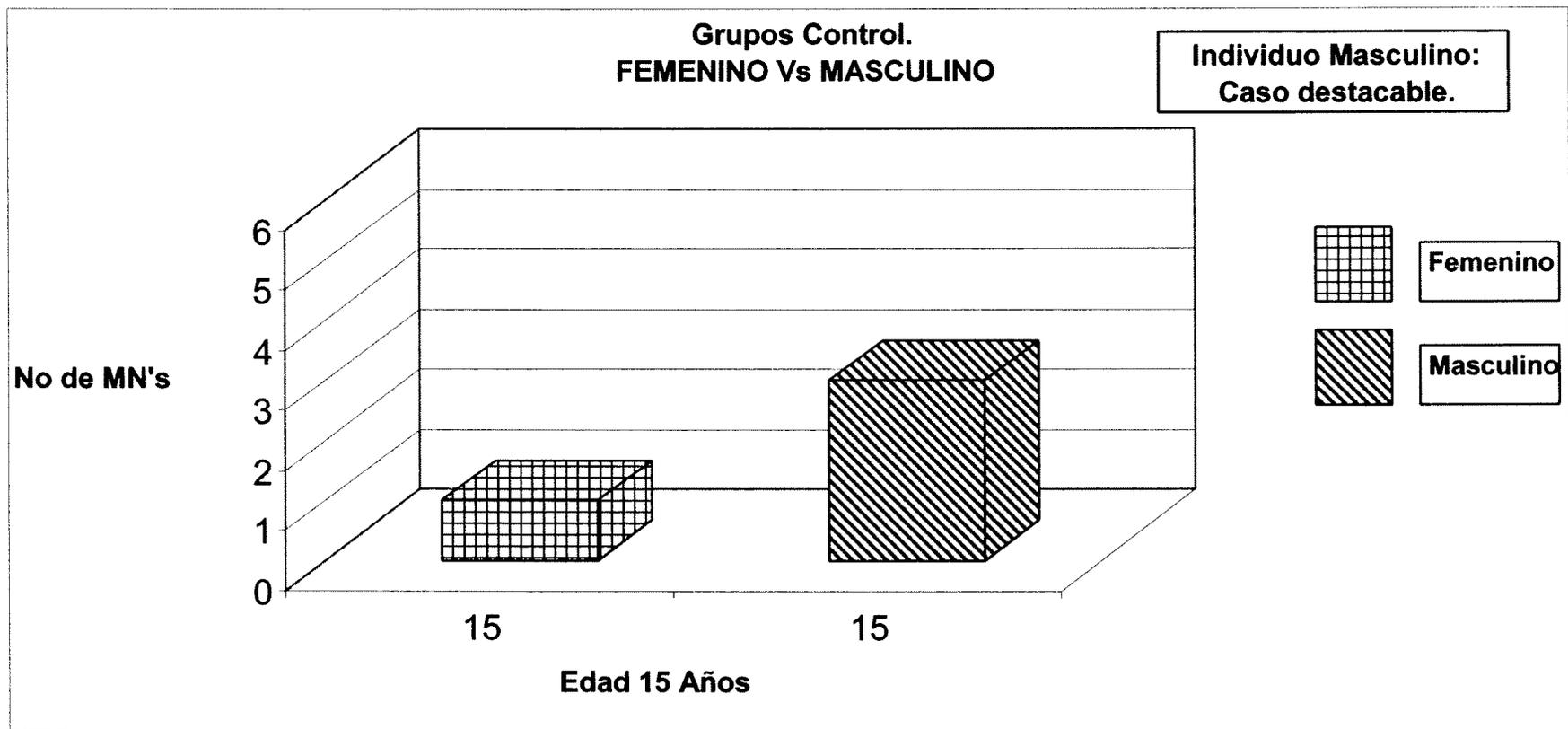
Grafica 7. Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica un caso en el cual el individuo presenta 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



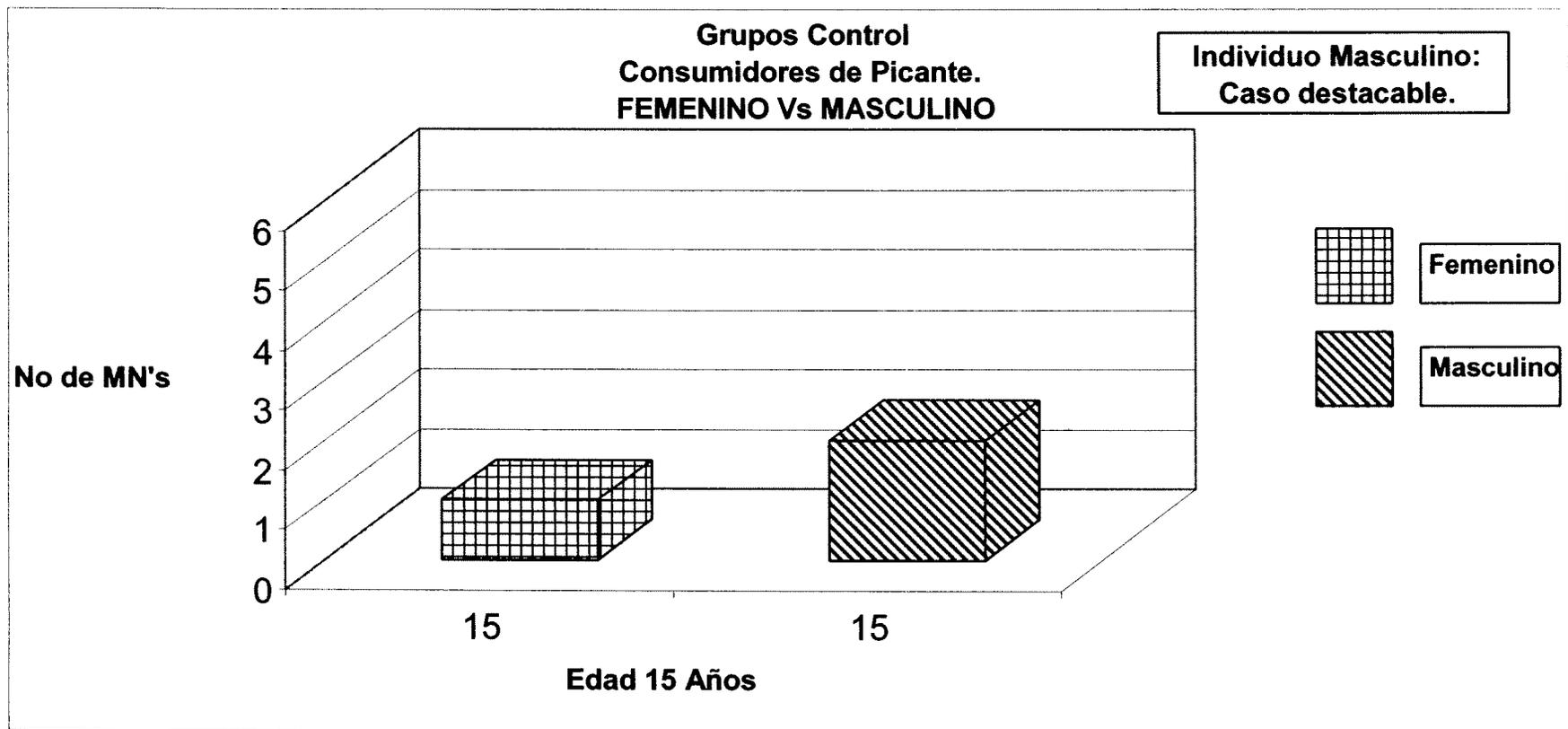
Grafica 11. Relación entre la Edad de los Individuos y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica un caso en el que el individuo presenta 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



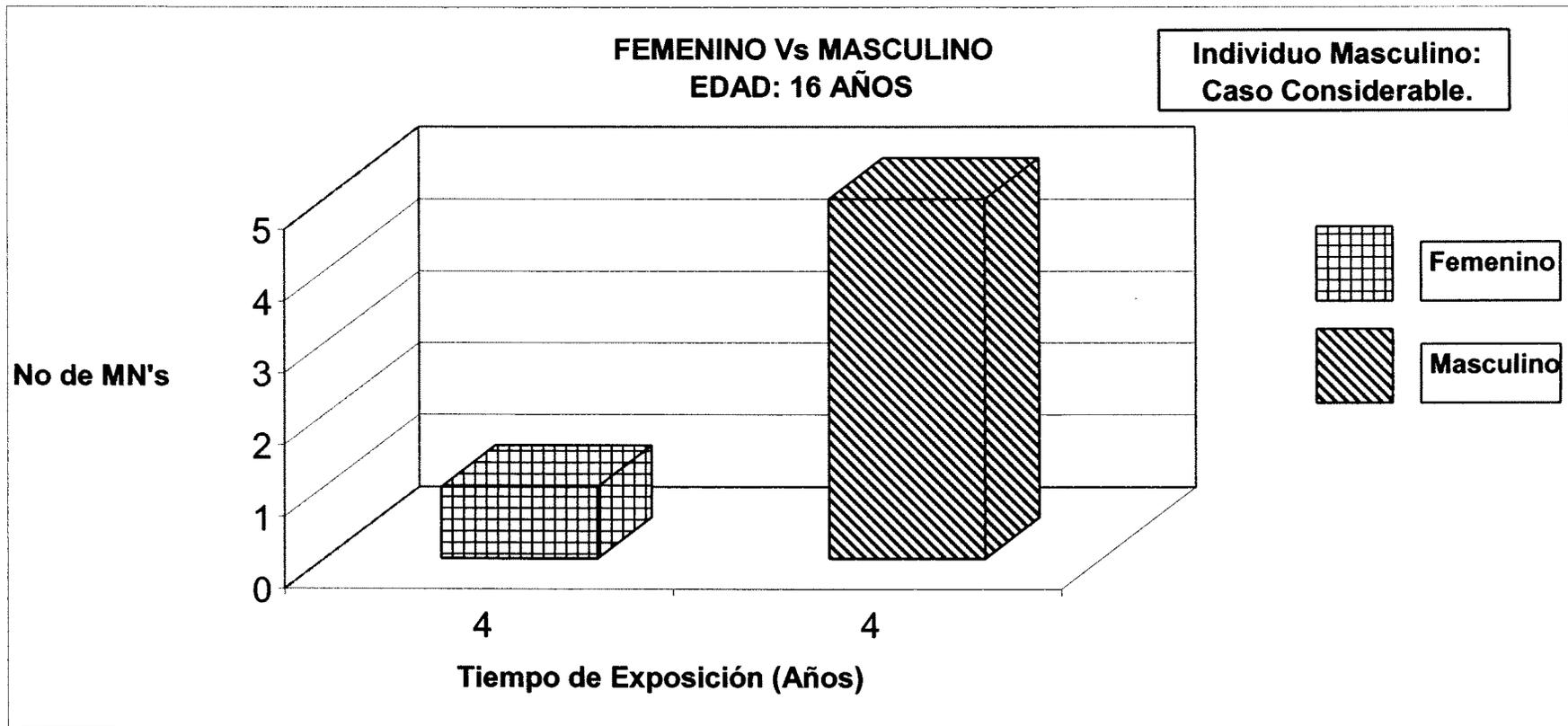
Grafica 14. Relación entre el No de cigarrillos fumados al día y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera gráfica un caso en el que el individuo presenta 6 o más MNs representando un daño a nivel citogenético.



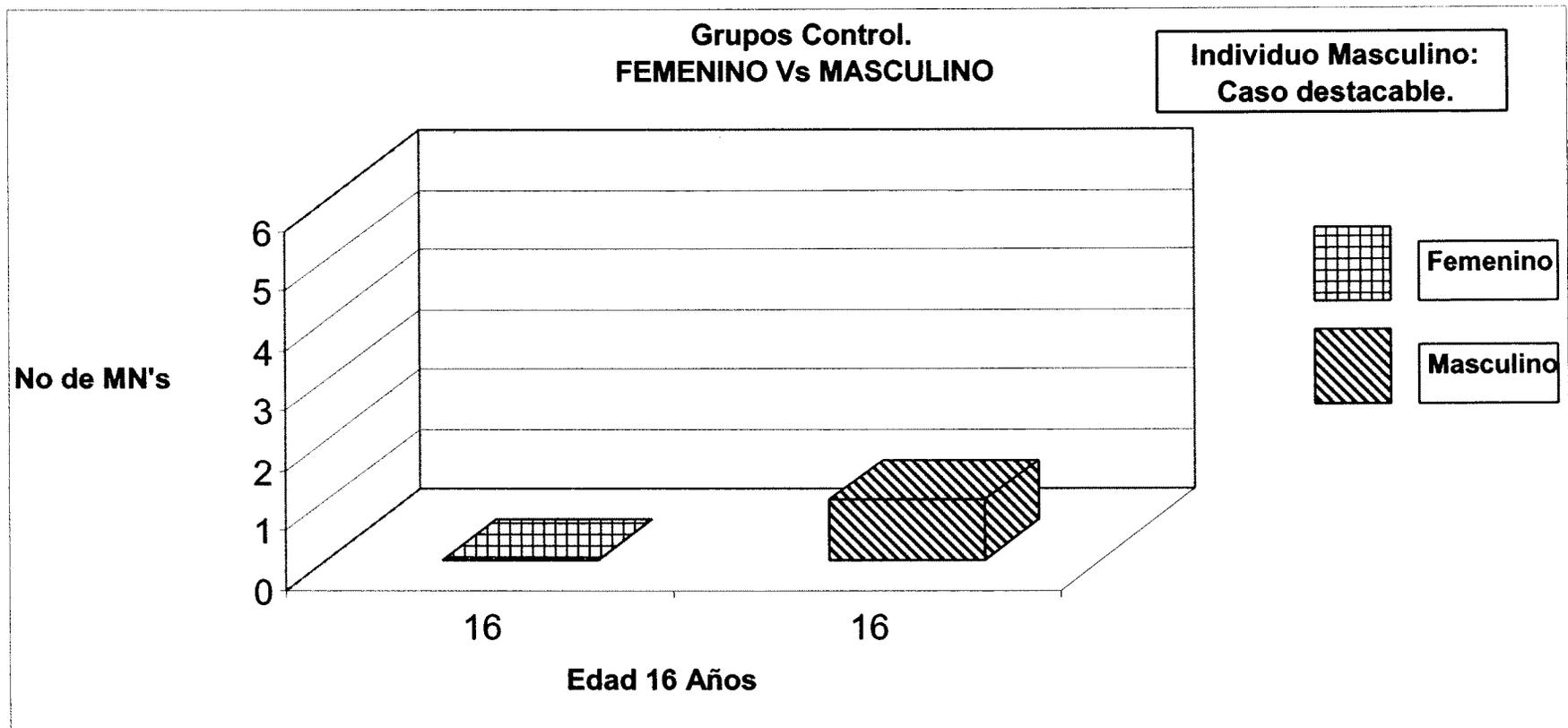
Grafica 18. Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 3 MNs Vs 1 MNs del caso femenino.



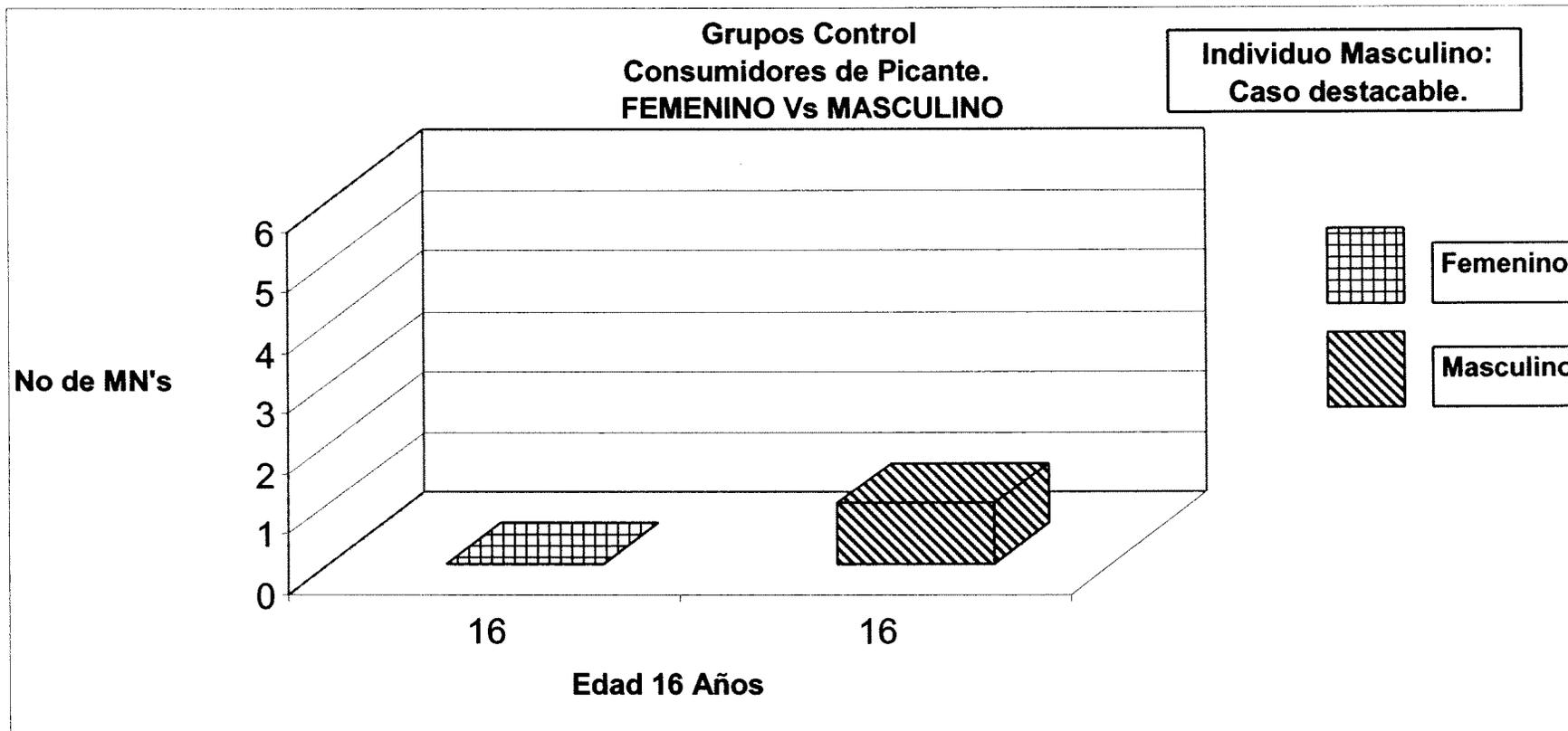
Grafica 20. Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 2 MNs Vs 1 MN del caso femenino.



Grafica 12. Relación entre el Tiempo de Exposición y el No de Micronúcleos observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el casos del individuo masculino que presenta 5 MNs representando un daño a nivel citogenético.



Grafica 19. Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 1 MN Vs 0 MNs del caso femenino



Grafica 21. Relación entre edad y el No de Micronúcleos del Grupo Control observados en la microscopia, misma en la que se representan de manera grafica el caso del individuo masculino que presenta 1 MN Vs 0 MNs del caso femenino.

## 9. ANALISIS DE RESULTADOS

***Una vez cubierto el objetivo general planteado al inicio y en base a los resultados obtenidos tenemos lo siguiente:***

El ensayo de MNs resultó una metodología práctica, fácil de implementar y poco invasiva, que permitió evaluar el daño citogenético en tejidos de contacto directo con el humo del cigarrillo como el epitelio bucal.

Los resultados obtenidos en este estudio, permitieron observar una presencia mayor de MNs en el caso de los individuos del sexo masculino.

Así mismo las graficas obtenidas se derivan del cotejo numeral realizado tanto para el grupo de individuos del sexo femenino como masculino, dentro de las cuales tenemos:

El tiempo de exposición Vs el número de MNs, la edad de los individuos Vs el número de MNs y el número de cigarrillos fumados al día Vs el número de MNs.

Teniendo para los tres casos un incremento considerable en el número de MNs para el caso de los individuos del sexo masculino, lo anterior es factible dado que las enzimas implicadas en el metabolismo y detoxificación de los compuestos tóxicos dan como resultado las diversas reacciones de oxidación catalizadas por las enzimas de la fase I.

Es así como muchos productos son transformados en intermediarios de naturaleza electrofílica muy reactivos capaces de atacar rápidamente a moléculas celulares nucleofílicas, como proteínas y ácidos nucleicos, por lo que tomando en consideración que en el caso de los individuos masculinos su metabolismo es más acelerado y aún más en esta edad de la adolescencia observándose un sentido y correlación con lo estipulado al inicio.

En cuanto a nuestro grupo control de no fumadores, causo controversia el que algunos de ellos presentaran MNs aunque no en cifras mayores a 6 MNs, y este hecho causa aún mas sorpresa dado que este grupo consumía cantidades elevadas de picante, y que como esta reportado en diversos estudios de investigación clínica tanto en México como en el extranjero, el picante reduce considerablemente el riesgo de presentar algún tipo de cáncer.

Desafortunadamente nuestro ritmo de vida y el tipo de actividades que realizamos a diario ha reducido significativamente el consumo de picante como parte de nuestra dieta diaria, y lo pudiera ser un motivo de la aparición de este tipo de carcinogénesis en el ser humano, además de otros factores cancerigenos ambientales o la predisposición genética en los cuales podría encontrarse este grupo.

## **10.- CONCLUSIONES:**

El ensayo de MNs es un bioensayo práctico, universalmente validado y accesible en cuanto los materiales y técnicas a emplear, útil para evaluar la carcinogénesis inducida por agentes tóxicos, en este caso el humo del cigarrillo.

Por otra parte, se puede observar en los resultados, el efecto citotóxico en las células del epitelio bucal de los individuos expuestos lo siguiente:

Se presenta una frecuencia mayor de casos en individuos del sexo masculino en los cuales el número de MNs, es considerablemente mayor, asociado a que el metabolismo en el caso de los varones adolescentes es más acelerado en comparación con el de las mujeres; por lo cual es importante mencionar que todas estas reacciones metabólicas y en particular las oxidativas pueden generar radicales libres (RL) capaces junto a las originadas en el propio humo del cigarrillo de provocar mutaciones a nivel citogenético expresado mediante MNs en las células del epitelio bucal de los individuos expuestos en este caso, considerando también la genética poblacional de los individuos y sin olvidar la predisposición genética además de la toxicidad ambiental.

Aunado a esto, hemos observado que el tiempo de exposición es un factor clave, ya que la relación que se observa es proporcional al tiempo de exposición y el No. de MNs aumenta de forma considerable en el caso de los varones, siendo este grupo el que mayor número de cigarrillos consume al día, esto tomando como patrón de comparación al grupo femenino, que consume menos cigarrillos al día y por ende presentan menor No. de MNs; con lo cual validamos nuestra hipótesis inicial en la cual proponemos que a mayor cantidad de cigarrillos fumados y al tiempo de exposición, sería más alta la predisposición de desarrollar algún tipo de daño celular en los individuos expuestos a este tipo de toxinas, como es el humo del cigarrillo.

Nuestros resultados se confirman con los resultados del grupo testigo al cual tomamos muestras siguiendo el mismo procedimiento que en todos los casos,

y no presentaron cantidad significativa de MNs siendo una cifra menor o igual a tres (3) MNs como máximo los que encontramos, y tomando en consideración que son individuos que no tienen un hábito ni costumbre de fumar, deducimos que tienen una predisposición genética o están expuestos a algún otro agente cancerígeno, así mismo no se descarta la posibilidad de que pertenezcan al grupo de fumadores pasivos.

También realizamos tomas de muestras de jóvenes, los cuales consumían una gran cantidad de picante con la finalidad de observar una disminución de MNs en células de epitelio bucal, tomando como referencia lo reportado en la bibliografía en relación a su acción anticancerígena principalmente en órganos como colon, estomago y riñón; los resultados arrojaron cifras igualmente menores teniendo como cifra máxima los dos (2) MNs, lo cual podría ser motivo de una continuación a este trabajo de investigación aportando a la investigación científica nuevos datos que ayuden en la prevención de múltiples enfermedades causadas principalmente, por este desmesurado consumo de cigarrillos estando cada vez más al alcance de los jóvenes que en su afán de pertenecer a un grupo o una sociedad, pone en riesgo su salud y la de las personas a su alrededor, ya que como fumadores pasivos en ocasiones tienen mayor predisposición a desarrollar algún tipo de cáncer a pesar de no ser fumadores activos.

## 11. - BIBLIOGRAFÍA:

1. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
2. Brusick D, Mengs U. Assessment of the genotoxic risk from laxative Senna products. *Environ Mol Mutat* 1997;29:1-9.
3. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 1999; 428: 271-283.
4. Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.  
Torres B., O, Zamora P., A.L., Esparza F., A, López G., B, Feria V., A,
5. R.H.C. San, M.P. Rosin, R.H. See, B.P.Dunn, H.F. Stich, Use of urine for monitoring human exposure to genotoxic agents, in: R.Wang, C.A. Franklin , J.C. Reinert (Eds.), *Biological Monitoring for pesticide Exposure*, American Chemical Society, Washington, Dc, 1989, pp.98-116.
6. Wynder EL, Bros J. A study of etiological factors in cancers of esophagus. *Cancer* 1961; 14:389-413.
7. Stich HF, San RHC, Rosin MP. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann NY Acad Sci* 1983; 407:93-105.
8. Tolbert, P .E., C.M. Shy & J.W. Allen. 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol.* 134: 840-850.
9. Van Klaveren RJ, Nemery B. Role of reactive oxygen species in occupational and environmental obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5(2):118-23.
10. Weisburger JH. Prevention of cancer and other chronic diseases worldwide based on sound mechanisms. *Biofactors* 2000;12:73-81.

11. Spencer JP, Jenner A, Chimel K. DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: FEBS Lett 1995;375(3):179-82.
12. Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 2001; 22: 367-374.
13. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG et al. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res* 2001; 61: 6350-6355.)
14. *American Journal of Physiology: Lung, Cellular and Molecular Physiology* 2003;284:955-963.
15. [www.redfarmaceutica.com/salud](http://www.redfarmaceutica.com/salud), El cáncer de pulmón asociado al tabaco tiene bases genéticas. M<sup>a</sup> Isabel Martínez Martínez Dra. en Farmacia, 2003.
16. Srinath Reddy K, Gupta PC, eds. Report on Tobacco Control in India. New Delhi, Ministry of Health and Family Welfare, Government of India, 2004.
17. Corrao MA et al. Building the evidence base for global Tobacco Control. *Bulletin of the World Health Organization*, 2000, 78(7):884-890.
18. United States Centers for Disease Control. Bidi use among urban youth: Massachusetts, March-April 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1999, 48(36):796-799.
19. Gajalakshmi V et al. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43.000 adult male deaths and 35.000 controls. *Lancet*, 2003, 362:507 515.
20. Malson JL et al. Comparison of the nicotine content de tobacco used in bidis and conventional cigarettes. *Tobacco Control*, 2001, 10(2):181-183.
21. Gupta PC et al. A cohort study of 99,570 individuals in Mumbai, India for tobacco-associated mortality. *International Journal of Epidemiology*, 25 October 2005.
22. Rahman M, Fukui T. Bidi smoking and health. *Public Health*, 2000, 114:123 127.

23. Rahman M, Sakamoto J, Fukui T. Bidi smoking and oral cancer: a meta-analysis. *International Journal of Cáncer*, 2003, 106:600-604.
24. Sankaranarayanan R et al. Risk factors for cancer of the oesophagus in Kerala, India. *International Journal of Cancer*, 1991, 49:485-489.
25. Pais P et al. Risk factors for acute myocardial infarction in Indians: a case-control study. *Lancet*, 1996, 348: 358-363.
26. Pais P, Fay MP, Yusuf S. Increased risk of acute myocardial infarction associated with beedi and cigarette smoking in Indians: final report on tobacco risks from a case-control study. *Indian Heart Journal*, 2001, 53:731-735.
27. Situmeang, Sutan Bahasa Taufan. Hubungan merokok kretek dengan kanker paru [The relationship between clove cigarette smoking and lung cancer]. Jakarta, Department of Pulmonology, Faculty of Medicine, University of Indonesia. 2001, 53pp.
28. Nicotine addiction in Britain. London, Royal College of Physicians, 2000.
29. American Medical Association Council on Scientific Affairs. Evaluation of the health hazard of clove cigarettes. *Journal of the American Medical Association*, 1988, 260:3641-44.
30. Mangunegoro H, Sutoyo DK. Environmental and occupational lung illnesses in Indonesia. *Respirology*, 1996, 1:85-93.
31. Nelson DE et al. Piper smoking in the United States, 1965-1991: Prevalence and attributable mortality. *Preventive Medicine*, 1996, 25:91-99.
32. IARC Working Group. *Tobacco smoke and involuntary smoking* (IARC Monographs, No.83). Lyon, IARC Press, 2000.
33. Shihadeh A, Eissenberg T. Tobacco smoking using a water pipe: product, prevalence, chemistry/toxicology, pharmacological effects, and health hazards. Geneva, World Health Organization Study Group on Tobacco Product Regulation (TobReg), 2005.
34. WHO TobReg advisory: water pipe tobacco smoking: health effects, research needs and recommended actions by regulators. Working Group

draft. Geneva, World Health Organization Study Group on tobacco product Regulation (TobReg), draft 2005.

35. Chattopadhyay A. Emperor Akbar as a healer and his eminent physicians. *Bulletin of the Indian Institute of History of Medicine (Hyderabad)*, 2000, 30:154.
36. Hamada G et al. Pulmonary dysfunction from large airway versus small airways among water pipe smokers [Poster presented at the 11th annual meeting of the Society for Research on Nicotine and Tobacco, March 2005].
37. Hamada G et al. Is peak expiratory flow (PEF) a good indicator for assessing airway obstruction in water pipe smokers? [Poster presented at the 11th annual meeting of the Society for Research on Nicotine and Tobacco, March 2005].
38. Kiter G et al. Water-pipe smoking and pulmonary functions. *Respiratory Medicine*, 2000, 94:891-894.
39. Al-Fayez SF et al. Effects of sheesha and cigarette smoking on pulmonary function of Saudi males and females. *Tropical and Geographical Medicine*, 1988, 40:115-123.
40. Zakaria M et al. Who ends up with COPD among smokers in a community setting? [Poster presented at the 11th annual meeting of the Society for Research on Nicotine and Tobacco, March 2005].
41. Mazen A, Aurabia S. The effect of Maassel water-pipe smoking versus cigarette smoking on pulmonary arterial pressure and left ventricular and right ventricular function indices in COPD patients: an echodoppler [Abstract]. *Scientific Journal of Al-Azhar Medical Faculty (Girls)*, 2000:649-86.
42. Jatabacoour S, El-Roueiheb Z, Sibai AM. Narghile (water-pipe) smoking and incident coronary heart disease: a case-control study [Abstract]. *Annals of Epidemiology*, 2003, 13:570.
43. Nafae A et al. Bronchogenic carcinoma in Kashmir valley. *The Indian Journal of Chest Diseases*, 1973,15(4):285-295.

44. El-Hakim IE, Uthman MAE. Squamous cell carcinoma and keratoacanthoma of the lower lip associated with Goza and Shisha smoking. *International Journal of Dermatology*, 1999, 38:108-110.
45. Roohullah et al. Cancer urinary bladder - 5 year experience at Cenar, Quetta. *Journal of Ayub Medical College, Atabacoottabad*, 2001, 13(2):14-16.
46. Differences in worldwide tobacco use by gender: findings from the Global Youth Tobacco Survey. *Journal of School Health*, 2003, 73 (6):207-215.
47. Pankow JF et al. Percent free base nicotine in the tobacco smoke particulate matter of selected commercial and reference cigarettes. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, 16(8):1014- 18.
48. Watson CH, Trommel JS, Ashley DL. Solid-phase microextraction-based approach to determine free-base nicotine and trapped mainstream cigarette smoke total particulate matter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52:7240-45.
49. Henningfield JE, Pankow JF, Garrett BE. Ammonia and other chemical based tobacco additives and cigarette nicotine delivery: issues and research needs. *Nicotine and Tobacco Research*, 2004, 6(2):199-205.
50. United States Food and Drug Administration. Regulations restricting the sale and distribution of cigarettes and smokeless tobacco to protect children and adolescents; final rule. *Federal Register*, 1996, 61(168):44396-45318.
51. Health consequences of using smokeless tobacco. A report of the Surgeon General (NIH Pub. No. 86-2874). Bethesda, MD, United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 1986.
52. IARC Working Group. Tobacco smoke and involuntary smoking (IARC Monographs, No.83). Lyon, IARC Press, 200.
53. Hatsukami DK, Severson HH. Oral spit tobacco: addiction, prevention and treatment. *Nicotine and Tobacco Research*, 1999, 1(1):21-44.

54. Global data on incidence of oral cancer map. Geneva, World Health Organization, 2005.  
([http://www.who.int/oral\\_health/publications/cancer\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/oral_health/publications/cancer_maps/en/index.html))
55. Parkin DM et al. Global cancer statistics, 2002. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2005, 55(2):74-108.  
(<http://caonline.amcancersoc.org/cgi/reprint/55/2/74>)
56. Chaudhry K. Is pan masala-containing tobacco carcinogenic? National Medical Journal of India, 1999, 12(1):21-27.
57. Gupta PC et al. Oral submucous fibrosis in India: a new epidemic? National Medical Journal of India, 1998, 11:113-116.
58. Wu MT et al. Risk of betel chewing for oesophageal cancer in Taiwan. British Journal of Cancer, 2001; 85(5):658-660.
59. Daftary DK et al. Oral precancerous lesions and conditions of tropical interest. In: Prabhu SR et al., eds. Oral diseases in the tropics. Oxford, Oxford Medical Publications, 1992:402-428.
60. Warren CW et al., for the Global Tobacco Surveillance System (GTSS) Collaborative Group. Patterns of global tobacco use in young people and implications for future chronic disease burden in adults. 17 February 2006, DOI:10.1016/S0140-6736(06) 68192-0
61. Health Consequences of Smoking. A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA, United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Chronic Disease Prevention and Promotion, Office on Smoking and Health, 2004.
62. State of California Air Resources Board. Rulemaking to consider proposed identification of environmental tobacco smoke as a toxic air contaminant (<http://www.arb.ca.gov/regact/ets2006/ets2006.htm>,)
63. International consultation on environmental tobacco smoke (ETS) and child health. Consultation report (WHO document WHO/NCD/TFI/99.10). Geneva, World Health Organization, 1999.

64. Mundo Salud GENÉTICA. Desvelan cómo un elemento del tabaco causa cáncer pulmonar. Angela Boto, Octubre de 2002. Págs. 14-19.
65. [www.qp.gov.bc.ca/statreg/reg/T/TobaccoSales/282\\_98.htm](http://www.qp.gov.bc.ca/statreg/reg/T/TobaccoSales/282_98.htm), 2/18/2003.
66. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 866-870.
67. Weisburger JH. Prevention of cancer and other chronic diseases worldwide based on sound mechanisms. *Biofactors* 2000;12:73-81.
68. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: radicals hydrogen peroxides peroxyoxynitrate and peroxyoxinitrite. *Annals NY Acad Sci* 1993;686:12-28.
69. Donald Voet. Ediciones omega, S.A. 1990.
70. Mac Nee W. Oxidants/Antioxidants and COPD. *Chest* 2000;117(5 Suppl 1):303s-17s.
71. Kaufmann PA. Coronary heart disease in smokers: vitamin C restores coronary microcirculatory function. *Circulation* 2000;102(11):1233-8.
72. Shopland DR, Burns DM, Garfinkel L, et al.: Monograph 8: Changes in Cigarette-Related Disease Risks and Their Implications for Prevention and Control. Bethesda, Md: National Institutes of Health, National Cancer Institute, NIH Publ No 97-4213, 1997.
73. Orr WC, Sohal RS. Extensión de life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 1994;263 (5150): 1128-30.
74. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP et al. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37: 31-45.

75. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
76. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 1999; 428: 271-283.
77. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 2002; 504: 131-136.
78. Xue KX, Wang S, Ma GJ, Zhou P, Wu PQ, Zhang RF et al. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and tea-drinking habits. *Int J Cancer* 1992; 50: 702-705.
79. Lee TK, Allison RR, O'Brien KF, Khazanie PG, Johnke RM, Brown R et al. Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. *Mutat Res* 2004; 557: 75-84.)
80. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res* 2001; 491: 9-16.
81. Landi S, Iazzolino E, Barale R. Are baseline frequencies of SCEs, CAs, and MN in human lymphocytes related to hematological values. *Mutat Res* 2000; 469: 159-166.
82. Bukvic N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res* 2001; 498: 159-167.
83. Tomanin R, Ballarin C, Nardini B, Mastrangelo G, Sarto F. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis* 1991; 6: 123-126.
84. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes:

- results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res* 2003; 543: 155-166.
85. De la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA* 2005; 293: 1212-1222.
86. Brusick, David. *Principles of Genetic Toxicology*. Second Edition. Plenum Press, New York 1987.
87. Norman, H.D., Cassell, B.G., Pearson, R.E. and Wiggans, G.R. 1981. *J. Dairy Sci.* 64:104-113.
88. Takahashi K., I. Kaneko, M. Date and E. Fukada 1987. Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. *Experientia*. 43:331-332.
89. Ten Cate, R. *Oral Histology: Development, Structure and Function*. 15 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
90. Livingston, G., R.N. Reed, B.L. Olson & J.E. Lockey. 1990. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ. Mol. Mutag.* 15: 136-144.
91. Stich HF; Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer* 1983; 31:305-8. San et al. 1989.