

## Efecto genotóxico del consumo de tabaco en estudiantes de la Facultad de Medicina de la UMSA que habitan en la altura

### Genotoxic effect of tobacco consumption in UMSA-Medicine Faculty students who live at a very high altittute above sea level

Benjamin Ayarde Romero<sup>1</sup>, Marina Cuti<sup>1</sup>, María Eugenia Ascarrunz González<sup>1</sup>, Noemí Tirado Bustillos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Genética Toxicológica, Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: María Eugenia Ascarrunz G. MSc. Unidad de Genética Toxicológica, Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra No 2245. La Paz, Bolivia. Tel: 2229613

E mail: genetoxbolivia@gmail.com

#### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa bucal, para determinar el daño genotóxico como una indicación de ruptura cromosómica o interferencia en la mitosis, en 200 estudiantes universitarios de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés en la ciudad de La Paz (3600 m.s.n.m.) y la ciudad de El Alto (4100 m.s.n.m.), expuestos al consumo de tabaco y sus componentes.

El grupo de estudiantes que vive a 4100 m.s.n.m. mostró una frecuencia de micronúcleos en células descamadas de mucosa oral mayor y estadísticamente significativa ( $p=0.04$ ) en relación a la frecuencia encontrada en estudiantes que viven a 3600 m.s.n.m.

El presente estudio sugiere que la altura sobre el nivel del mar representa un factor importante que debe tomarse en cuenta y que el uso del ensayo de MN en células epiteliales de mucosa oral es un marcador sensible y no invasivo para evaluar daño genotóxico.

**Palabras Clave:** Daño genotóxico, ruptura cromosómica, consumo de tabaco, micronúcleos, células bucales, altura

#### ABSTRACT

The objective was to assess the frequency of micronucleus in epithelial cells of the oral mucosa, to determine DNA damage as an indication of chromosome breakage or mitotic interference in 200 college students from the Faculty of Medicine of the

Universidad Mayor de San Andres in La Paz city (3600 meters above sea level) and Alto (4100 m.a.s.l.), exposed to tobacco consumption and their components.

The group of students who live at 4100 m.a.s.l. shows a significantly higher frequency of micronucleus that belong to oral mucosa than to the frequency found in the students who live at 3600 meters. ( $p=0.04$ )

This study suggests that the altitude above sea level is an important factor to be taken into account and also that the use of MN assay in epithelial cells of oral mucosa is a sensitive and non-invasive factor for evaluating genotoxic damage.

**Key Words:** Genotoxic damage, chromosome breakage, tobacco consumption, micronuclei, oral cells, high altitude

#### INTRODUCCIÓN

El cáncer está asociado con numerosos factores de riesgo ambientales y uno de los más comunes es la exposición al tabaco. El consumo de tabaco ha sido correlacionado con cáncer de la cavidad oral, laringe, pulmón, vejiga y esófago en muchos estudios epidemiológicos<sup>1</sup>. Aproximadamente el 95% de los casos de cáncer oral y faríngeo en los Estados Unidos ha sido atribuido al hábito tabáquico<sup>2</sup>.

El humo del cigarrillo está compuesto de más de 5000 compuestos orgánicos, incluyendo muchos agentes químicos, tales como los HAP, polifenoles y nitrosaminas específicas del tabaco<sup>3</sup>. Además, la exposición al humo del cigarrillo causa múltiples alteraciones de células y tejidos, incluyendo la formación de aductos, fracturas de simple hebra en el

DNA, intercambio entre cromátides hermanas, formación de micronúcleos, anillos cromosómicos y detención del ciclo celular<sup>3-7</sup>.

El componente del tabaco mejor estudiado es el benzopireno, sustancia muy tóxica que actúa a nivel del genoma de la célula provocando alteraciones, como la fragmentación del DNA, dando lugar a aberraciones cromosómicas que se manifiesta con la presencia de micronúcleos (MN)<sup>8</sup>.

El estudio de la genotoxicidad del tabaco se ha abordado en los últimos años como consecuencia del incremento de este hábito en distintos grupos humanos. La exposición al humo del tabaco induce desequilibrio genómico como la formación de aductos de DNA, especies reactivas de oxígeno (EROS), rupturas en la cadena de DNA y formación de puentes en la anafase del ciclo celular<sup>1,9</sup>.

Estudios de genotoxicidad realizados in vivo e in vitro con biomarcadores de efecto revelan mecanismos de carcinogénesis relacionados con el tabaco en fumadores activos y pasivos<sup>9</sup>. Se ha reportado que más del 90% de los cánceres reportados son de origen epitelial y una aproximación ideal para identificar riesgo es evaluar los componentes en las células blanco carcinogénicas. Por lo tanto, las células aisladas de la mucosa bucal son útiles para investigar directamente los efectos locales de los carcinógenos<sup>2</sup>.

Una de las técnicas modernas para estudiar el impacto de los factores ambientales, genéticos es la prueba de micronúcleos (MN) que se originan de fragmentos y/o cromosomas completos que no son incluidos en el núcleo principal de la célula hija durante la división nuclear, por lo tanto, proveen una medida de aberraciones cromosómicas. Se ha mostrado una correlación significativa entre el nivel de aberraciones cromosómicas y MN en células exfoliadas de mucosa bucal de sujetos expuestos a mutágenos ambientales y el riesgo de desarrollar cáncer<sup>10-14</sup>.

En un estudio realizado en La Paz –Bolivia, se demostró que el 50 % de los estudiantes universitarios varones y 20% de las mujeres entre los 15 y 35 años de edad tienen el hábito tabáquico<sup>15</sup>.

Otro factor de riesgo es la altura sobre el nivel del mar, debido a que en estudios realizados<sup>16</sup> se demostró que existe una disminución en la presión parcial de oxígeno, por lo tanto la hipoxia de altura y exposición a la luz ultravioleta que genera especies reactivas de oxígeno que pueden dar lugar a daño genotóxico.

Estudios epidemiológicos han mostrado una interrelación entre el estilo de vida, hábitos dietéticos y consumo de tabaco, con el desarrollo de cáncer y el riesgo de presentar tumores en el epitelio de la boca y en tracto gastrointestinal.

El propósito del presente artículo fue evaluar la frecuencia de micronúcleos en células de mucosa bucal para determinar el daño genotóxico del hábito tabáquico en estudiantes universitarios que habitan en la ciudad de La Paz (3600msnm) y El Alto (4100 msnm).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal correlacional analítico. El tamaño de la muestra fue calculado con el paquete Epi Info 2002. Se estudiaron 200 muestras de mucosa bucal de estudiantes de la Facultad de medicina de la UMSA seleccionados al azar y previo consentimiento informado. El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows.

Los criterios de inclusión fueron, estudiantes de la Facultad de Medicina de ambos sexos, entre las edades de 15 a 32 años, sanos, fumadores y no fumadores y los de exclusión, estudiantes con alteraciones patológicas en cavidad bucal, que se encuentren en curso de cualquier patología viral o bacteriana y con cualquier tipo de medicación.

La recolección de datos se realizó mediante un cuestionario impreso, que incluyó los datos personales (edad, sexo, dirección, lugar de residencia, etc.), hábito de fumar, exposición a los componentes del tabaco, tiempo de exposición, para evaluar su asociación al daño genotóxico.

La prueba de micronúcleos se utilizó como biomarcador para revelar la eventualidad de daño genotóxico por exposición al tabaco en células descamadas de mucosa bucal.

**Micronúcleos en células de mucosa bucal.** Las células bucales fueron colectadas y analizadas de acuerdo al procedimiento descrito por Titenko-Holland, 1996<sup>20</sup>. Después de realizado el enjuague bucal, se obtuvo muestra de las dos mejillas, utilizando un hisopo, haciendo un raspado de arriba hacia abajo presionando con la mano por la cara externa de la mejilla. Las células bucales fueron lavadas tres veces en solución tampón TRIS – EDTA (8 ml.) (EDTA 0.1 M, Tris HCl 0.01 M, NaCl 0.02 M, pH 7.0), hasta conseguir que las células se desprendan, centrifugando cada vez a 1500 rpm durante 10 min., y desechando el sobrenadante. Los portaobjetos con células bucales fueron preparados por goteo de 50 µl del sedimento anterior, en portaobjetos precalentados a 37°C, dejando secar al aire y fijada en metanol por 20 min. Los portaobjetos fueron teñidos por 5 – 8 min., con Giemsa 6% en Buffer Sörensen, lavadas con agua destilada y secadas al aire. Finalmente los portaobjetos fueron evaluados a doble ciego y por un solo observador

fueron analizadas bajo un microscopio con una ampliación total de 1000 X, con objetivo de inmersión. Se evaluó un total de 500 células de cada individuo registrando la presencia de MN en cada célula y siguiendo los criterios de análisis sugeridos por Sarto y col<sup>21</sup>.

Para el análisis de los resultados se realizó un estudio descriptivo y analítico utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5. La comparación de medias se realizó utilizando la prueba U Mann-Whitney para dos grupos independientes y Kruskal Wallis para más de dos grupos independientes, con un nivel de confianza del 95%.

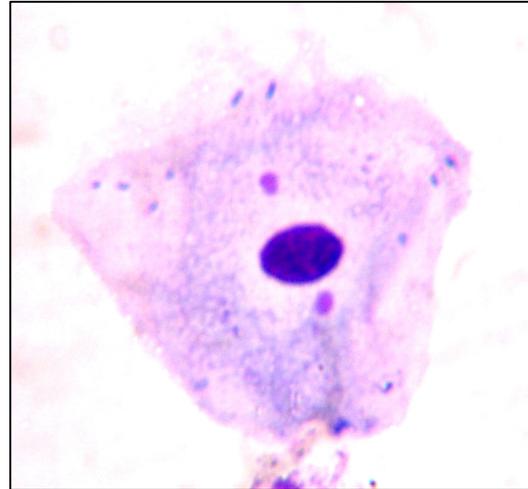
**RESULTADOS**

Se estudió 200 estudiantes de la Facultad de Medicina entre 15 – 20 años (32.5%), 21 – 26 años (62%), 27 – 32 años (5.5%). El 50% fueron del sexo femenino y el 50% masculino; el 97% solteros, 3% casados. Asimismo, 94% fueron de Bolivia: La Paz (85.7%), Oruro (4.8%), Beni, Cochabamba, Potosí y Tarija (2.1%), otros departamentos (7.4%).

El 34% residen en la ciudad de El Alto a 4000 m.s.n.m y el 66% en la ciudad de La Paz a 3600 m.s.n.m., ambos en el departamento de La Paz.

En cuanto al hábito tabáquico, el 38.5% son fumadores; ex-fumadores 7.5%; no fumadores 54%.

El análisis inferencial en relación al daño genotóxico, evaluado a través de la prueba de micronúcleos (figura 1), se presenta en el tabla 1, donde muestra diferencia significativa de la frecuencia de micronúcleos en mucosa bucal en relación a la altura.



**Figura 1. Células epiteliales de la mucosa bucal con un micronúcleo (fuente propia).**

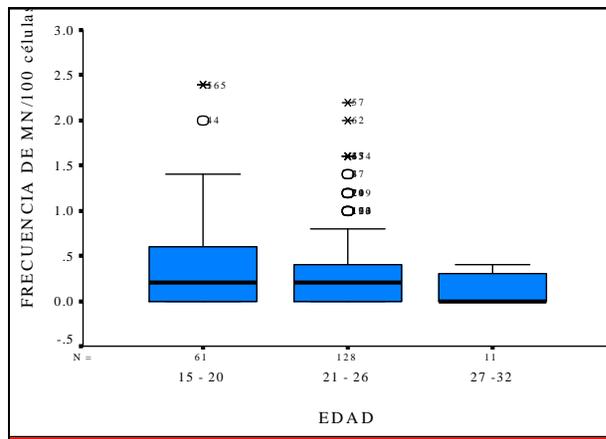
**Tabla 1. Comparación de valores promedio ± ES de micronúcleos por sexo, edad, y altura m.s.n.m.**

Variable	n	Micronúcleos/100 células Promedio ± ES	p
<u>Sexo</u>			
Femenino	100	0.30 ± 0.04	n.s.
Masculino	100	0.37 ± 0.05	
<u>Intervalo de edad</u>			
15 – 20 años	65	0.41 ± 0.07	n.s.†
21 – 26 años	124	0.31 ± 0.04	
27 – 32 años	10	0.14 ± 0.05	
<u>Altura (m.s.n.m.)</u>			
4100	68	0.37 ± 0.05	0.041*
3600	132	0.31 ± 0.04	

(\*) U de Mann-Whitney p< 0.05. ; (†)Kruskal –Wallis n.s.

Los estudiantes que viven a mayor altura (4100m.), tuvieron una frecuencia de MN significativamente

mayor en relación a los que viven a 3600 m.s.n.m. estadísticamente significativa (p<0.05).



**Figura 2. Frecuencia de micronúcleos según intervalo de edad. Kruskal -Wallis  $P < 0.05$ .**

En la Figura 2, se observa que los estudiantes entre 15 y 20 años tienen una frecuencia de micronúcleos mayor en relación al grupo de 27 a 32, con una diferencia estadística de  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

Los micronúcleos en las células exfoliadas reflejan eventos genotóxicos que han ocurrido en la capa basal de células, una a tres semanas antes de la división celular<sup>16,17</sup>. La prueba de MN es considerada un importante biomarcador para predecir el riesgo relativo de cáncer en el tracto aero-digestivo<sup>17</sup>. Es así, que la mayor prevalencia de MN en los fumadores significa que ellos están altamente expuestos a daño mutagénico, por lo tanto, tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer en la vías respiratorias superiores y orofaringe<sup>3</sup>.

En relación al daño genotóxico evaluado a través de la formación de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa bucal, se demostró que los varones presentan mayor número de MN que las mujeres, esto debido a que en el presente trabajo los varones son los que tienen mayor hábito tabáquico.

Por otro lado, se demostró que los estudiantes que viven a 4100 m.s.n.m. (El Ato) presentan mayor número promedio de micronúcleos en relación a los que viven a 3600 m.s.n.m. (La Paz), esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), este efecto no se puede atribuir únicamente al hábito tabáquico, ya que las personas están expuestas a varios agentes externos o xenobióticos, en el caso de los estudiantes de El Alto, otro factor de riesgo podría ser la exposición a los rayos ultravioleta, a productos de la gasolina por el alto tráfico vehicular y otros factores, como se ha demostrado en estudios anteriores<sup>1</sup>.

En el grupo de no fumadores, se encontró una frecuencia de MN de 0.30 %, coincidiendo con los reportes publicados en la literatura de valores de referencia<sup>18</sup>. El aumento en la frecuencia de MN en las células exfoliadas de los fumadores 0.38% en relación a los no fumadores, puede deberse a la presencia de mutágenos como el benzopireno o sus metabolitos como producto del metabolismo secundario<sup>22-25</sup>.

En el análisis correlacional entre frecuencia de micronúcleos y tipo de tabaco se observó que los que fuman pipa o cigarro o puro presentaron mayor número de micronúcleos, en relación a los que no fuman. El consumo de cigarrillos sin filtro, produjo un aumento significativo en el número de micronúcleos, en relación a los estudiantes que consumen cigarrillos con filtro y los estudiantes que no fuman. El humo del tabaco produce Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), principalmente generados por los polifenoles que contribuyen a la formación de peróxido de hidrógeno que es capaz de inducir la formación de rupturas de doble hebra del DNA e inestabilidad genómica por la formación de puentes en anafase.

Por los resultados obtenidos, se puede concluir que los estudiantes fumadores que habitan a 4100 m.s.n.m. tienen mayor riesgo genotóxico que los que viven a 3600 m.s.n.m., por otro lado, los factores relacionados con el hábito tabáquico, como el tipo de tabaco, el número de cigarrillos consumidos por día, la edad, el tipo de cigarrillo adicionalmente a la altura donde habitan, son factores que contribuyen a aumentar el daño genotóxico, ya que existe una tendencia al incremento de micronúcleos en relación a los factores mencionados.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Genética por el financiamiento y los alumnos de la Facultad de Medicina por su participación en este estudio.

## REFERENCIAS

1. Flores M. Tabaquismo pasivo: ¿qué podemos hacer?. *Prev Tab* 2001; 3(4): 205–206
2. Luo L, Werner K, Gollin S. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutat Res*. 2004; 554: 375 – 385.
3. Ruiz M, Rodríguez I, Rubio C, Revert C. Efectos tóxicos del tabaco. *Toxicol Rev*. 2004; 21: 64 – 67.
4. Nakayama T, Kaneko M, Kodama M, Nagata C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*. 1985; 314: 462–464.
5. Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE, Gooch PC, Shelby MD. Chromosomal aberration and

- sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. *Mutat Res.* 1988; 204: 421-433.
6. Gu ZW, Whong WZ, Wallace WE, Ong TM. Induction of micronuclei in BALB/c-3T3 cells by selected chemicals and complex mixtures. *Mutat Res.* 1992; 279: 217-222.
  7. Hsu TC, Cherry LM, Bucana C, Shirley LR, Gairola CG. Mitosis-arresting effects of cigarette smoke condensate on human lymphoid cell lines. *Mutat Res.* 1991; 259: 67-78.
  8. Uribe R, Pérez A. Inducción de la fragmentación del DNA por antraceno y benzo(a) pireno en leucocitos polimorfonucleares humanos in vitro. *Interciencia.* 2005; 30 (7): 419-123.
  9. Husgafvel-Pursiainen K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review, *Mutat Res.* 2004; 567: 427 - 445.
  10. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del sistema sanitario de Navarra.* 2005; 28 (2): 153-298.
  11. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008; 659: 93-108.
  12. Speit G, Schmid O. Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. *Mutat Res.* 2006;
  13. Nersesyan A, Vardazaryan N, Gevorgyan A, Arutyunyan R. Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Arq Oncol.* 2002; 10(1):35-6.
  14. Pastor S, Gutierrez S, Amadeu C, Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis.* 2001; 16 (6): 539 - 545.
  15. Ascarrunz ME. Frecuencia de fumadores y factores de riesgo asociados al entorno tabáquico familiar y social en estudiantes universitarios en La Paz-Bolivia, 2004. [Tesis de diplomado]. La Paz: Universidad Loyola; 2004.
  16. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronucleus and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users. *Am J Epidemiol.* 1991; 134: 840-850.
  17. Manas Ray, Chandreyi Basu, Senjuti Mukherjee. Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. *Int J Hum Genet.* 2005; 5(1): 45-48.
  18. Karahalil B, Karahaya AE, Burgaz S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic hydrocarbons. *Mut Res* 1999; 442: 29-35.
  19. Fenech M, Holland N, Chang W, 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.
  20. Titenko-Holland N, Levine AJ, Smith MT. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutat Res.* 1996; 371: 237-248.
  21. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 1987; 2: 11-17.
  22. Burgaz S, Erdem O, Cakmak G, Erdem N, Karakaya A, Karakaya AE. Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-rorkers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers.* 2002; 7: 151-161.
  23. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the human micronúcleos project. *Mutat Res.* 2003; 543: 155-166.
  24. Ruiz M, Rodríguez I, Rubio C. Efectos tóxicos del tabaco. *Toxicol Rev.* 2004; 21: 64-71.
  25. Sambyal V, Kaur R, Chaudhary S, Amar S. High frequency of micronuclei in buccal mucosa of women residing near a sewage disposal drain in amritsar. *Anthropologist.* 2004; 6(2): 125-129.