
Biomarcadores de exposición a mutágenos y determinismo genético en
pacientes con cáncer broncopulmonar.

María Ángeles Sáenz Galilea

Tesis Doctoral
Universidad de Zaragoza

<http://zaguan.unizar.es>

TDR-UZ [Tesis Doctorales en Red Universidad de Zaragoza]



Biblioteca
Universitaria

Universidad Zaragoza

BIOMARCADORES DE EXPOSICION A MUTAGENOS Y DETERMINISMO GENETICO EN PACIENTES CON CANCER BRONCOPULMONAR

**Memoria presentada por
M^a Angeles Sáenz Galilea
para optar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugía.
Zaragoza, Septiembre de 1992.**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y FISILOGIA

Los Doctores D^a Blanca Sinués Porta y D. Alejandro Trés
Sánchez

ACREDITAN: Que M^a Angeles Sáenz Galilea ha
realizado bajo su dirección la memoria de
tesis doctoral titulada "Biomarcadores de
exposición a mutágenos y determinismo
genético en pacientes con cáncer
broncopulmonar", dando su conformidad para
que sea oportunamente defendida y juzgada.

Y para que conste, expedimos el presente
certificado en Zaragoza, a catorce de
Agosto de mil novecientos noventa y dos.

Fdo. D^a Blanca Sinués

Fdo. D. Alejandro Trés

A mis padres y a ti.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. D^a Blanca Sinués Porta, promotora y directora de este trabajo, que con su constante ayuda y aliento ha hecho posible la realización del mismo.

Al Dr. D. Alejandro Trés Sánchez, codirector de esta memoria, por su desinteresada ayuda.

Al Dr. D. Ricardo Escó Barón, por su generosa colaboración en la recogida de muestras.

Al Dr. D. Julio Benítez Rodríguez, por brindarme su ayuda y su amistad.

Al Dr. D. Máximo Bartolomé Rodríguez, por su apoyo constante.

A mis compañeros de departamento Javier Lanuza, M^a Luisa Bernal, Araceli Sanz y Antonio Bolea, por su ayuda técnica y su desinteresada colaboración.

A Fernando Mata, por su inestimable ayuda en las labores informáticas y por darme fuerza para seguir adelante.

A mis familiares y amigos por el apoyo moral que me han prestado en todo momento.

Y a todas aquellas personas que, de forma anónima, han hecho posible la elaboración de esta memoria.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Epidemiología del cáncer de pulmón.....	1
1.1.1 Composición química del humo del tabaco.....	4
1.1.1.1 Nicotina	5
1.1.1.2 Monóxido de carbono	7
1.1.1.3 Gases irritantes	7
1.1.1.4 Carcinógenos (Alquitranes).....	8
1.1.2 Carcinogénesis y tabaco.....	9
1.1.3 Metabolismo y toxicidad del tabaco.....	12
1.1.4 Estudios ecogenéticos.....	17
1.2 Biomonitorización de la exposición a mutágenos y carcinógenos	19
1.2.1 Lesión del ADN.....	19
1.2.2 Reparación del ADN.....	21
1.2.3 Monitorización biológica.....	24
1.3 Test citogenéticos.....	27
1.3.1 Aberraciones cromosómicas.....	28
1.3.2 Intercambios entre cromátides hermanas (SCEs)	30
1.3.3 Formación de micronúcleos.....	33
1.3.4 Formación de aductos.....	34
1.4 Papel protector del glutatión.....	36
1.4.1 Funciones del glutatión.....	39
1.4.2 Glutatión eritrocitario.....	44
1.5 Glutatión S-Transferasa y formación de tioéteres urinarios	50
1.5.1 Localización de las GST.....	50
1.5.2 Expresión GST	51
1.5.3 Inducción GST	52
1.5.4 Principales funciones de las GST.....	53
1.5.5 Excreción de tioéteres.....	55
1.5.5.1 Tioéteres urinarios como indicador de posición y detoxicación de compuestos eletrofílicos	59

1.5.5.2	Tioéteres urinarios como indicador biológico de contaminación interna	61
1.6	Test bacterianos en la detección de mutágenos.....	63
1.6.1	Test de Ames	64
1.6.2	Mutagenicidad urinaria.....	65
1.6.2.1	Mutagenicidad urinaria causada por el tabaco	67
1.7	Farmacogenética. Variaciones en el metabolismo de xenobióticos	70
1.7.1	Polimorfismo genético de la acetilación.....	71
1.7.2	Distribución étnica de la capacidad acetiladora	73
1.7.3	Mecanismos bioquímicos: N-Acetiltransferasa.....	75
1.7.4	Determinación del fenotipo acetilador.....	76
1.7.5	Implicaciones clínicas del polimorfismo de la N-Acetiltransferasa	77
1.7.5.1	Fenotipo acetilador y respuesta a fármacos	77
1.7.5.2	Fenotipo acetilador y enfermedad.....	82
1.8	Polimorfismo genético de la oxidación. Generalidades	88
1.8.1	Sistema oxidativo del microsoma hepático.....	90
1.8.1.1	Ciclo catalítico del citocromo P-450.....	91
1.8.1.2	Formas del citocromo P-450.....	92
1.8.2	Inducción enzimática del metabolismo oxidativo	96
1.8.3	Variaciones del polimorfismo oxidativo entre grupos raciales	99
1.8.4	Oxidación polimórfica de fármacos.....	100
1.8.5	Consecuencias terapéuticas y tóxicas del fenotipo hidroxilador	102
1.8.6	Oxidación de agentes químicos ambientales y cáncer	106
1.8.7	Fenotipo hidroxilador y enfermedad.....	111
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	113
2.1	Población estudiada.....	113

2.2	Métodos.....	115
2.2.1	Estudio citogenético.....	115
2.2.1.1	Frecuencia de intercambios de cromátides hermanas (SCEs)	115
2.2.1.2	Cinética celular (PRI).....	117
2.2.1.3	Cuantificación de micronúcleos.....	118
2.2.1.4	Aberraciones cromosómicas y sus tipos.....	119
2.2.1.5	Índice mitótico	120
2.2.2	Determinación de glutati6n en eritrocitos.....	120
2.2.3	Determinaci6n de tio6teres en orina.....	122
2.2.4	Evaluaci6n de mut6genos y premut6genos en orina	128
2.2.5	Determinaci6n del fenotipo acetilador en orina	132
2.2.6	Determinaci6n del fenotipo hidroxilador en orina	134
2.2.7	M6todo estadístico.....	139
3.	RESULTADOS.....	144
3.1	Ajuste estadístico.....	144
3.1.1	Estudio de la posible interferencia de la edad	144
3.1.2	Estudio estadístico de la influencia del tabaco y valoraci6n de la influencia del tabaquismo (en a6os) sobre los diferentes par6metros	145
3.1.2.1	Valoraci6n del efecto del tabaco sobre el glutati6n reducido en eritrocitos (GSH).....	146
3.1.2.2	Valoraci6n del efecto del tabaco sobre la eliminaci6n de tio6teres urinarios (TU).....	147
3.1.2.3	Valoraci6n del efecto del tabaco sobre la excreci6n de premut6genos en orina.....	149
3.1.2.4	Valoraci6n del efecto del tabaco sobre la excreci6n de mut6genos en orina	150
3.1.2.5	Valoraci6n del efecto del tabaco sobre la frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas (SCEs)	151

3.1.2.6	Valoración del efecto del tabaco sobre el índice de proliferación celular (PRI).....	154
3.1.2.7	Valoración del efecto del tabaco sobre la formación de micronúcleos (MN)	155
3.1.2.8	Valoración del efecto del tabaco sobre el índice mitótico (IM)	157
3.1.2.9	Valoración del efecto del tabaco sobre las aberraciones tipo cromatídico (roturas).....	158
3.1.2.10	Valoración del efecto del tabaco sobre las aberraciones tipo cromatídico (radiales)	160
3.1.2.11	Valoración del efecto del tabaco sobre las aberraciones tipo cromosómico (roturas)	161
3.1.2.12	Valoración del efecto del tabaco sobre las aberraciones tipo cromosómico (anillos, dicéntricos,...)	163
3.1.2.13	Valoración del efecto del tabaco sobre los gaps cromatídicos, cromosómicos y totales	164
3.1.2.14	Valoración del efecto del tabaco sobre las aberraciones totales, excluyendo los gaps	168
3.1.2.15	Valoración del efecto del tabaco sobre las aberraciones totales, incluyendo los gaps	170
3.1.3	Valoración de la influencia del tipo de tabaco (rubio/negro) sobre los diferentes parámetros	172
3.1.4	Valoración estadística de la influencia del fenotipo acetilador	177
3.1.4.1	Influencia del fenotipo acetilador sobre el glutatión reducido eritrocitrario (GSH)	178

3.1.4.2	Influencia del fenotipo acetilador sobre la eliminación de tioéteres urinarios (TU)	179
3.1.4.3	Influencia del fenotipo acetilador sobre la eliminación de premutágenos por orina	181
3.1.4.4	Influencia del fenotipo acetilador sobre la eliminación de mutágenos por orina.....	183
3.1.4.5	Influencia del fenotipo acetilador sobre el intercambio de cromátides hermanas (SCEs)	184
3.1.4.6	Influencia del fenotipo acetilador sobre el índice de proliferación celular (PRI)	185
3.1.4.7	Influencia del fenotipo acetilador sobre la aparición de micronúcleos (MN).....	188
3.1.4.8	Influencia del fenotipo acetilador sobre el índice mitótico (IM)	189
3.1.4.9	Influencia del fenotipo acetilador sobre las aberraciones tipo cromatídico (roturas)	190
3.1.4.10	Influencia del fenotipo acetilador sobre las aberraciones tipo cromatídico (radiales)	193
3.1.4.11	Influencia del fenotipo acetilador sobre las aberraciones tipo cromosómico (roturas)	194
3.1.4.12	Influencia del fenotipo acetilador sobre las aberraciones tipo cromosómico (anillos, dicéntricos)	196
3.1.4.13	Influencia del fenotipo acetilador sobre los gaps cromatídicos	198
3.1.4.14	Influencia del fenotipo acetilador sobre los gaps cromosómicos	199
3.1.4.15	Influencia del fenotipo acetilador sobre los gaps totales	200

3.1.4.16	Influencia del fenotipo acetilador sobre las aberraciones totales, excluyendo los gaps	202
3.1.4.17	Influencia del fenotipo acetilador sobre las aberraciones totales, incluyendo los gaps	203
3.1.5	Valoración de la influencia del fenotipo hidroxilador	205
3.1.6	Estudio estadístico conjunto del fenotipo acetilador e hidroxilador	208
3.1.6.1	Estudio estadístico de los individuos con FAL y FHR en relación a los diferentes parámetros	208
3.1.6.2	Estudio estadístico de los individuos con FAR y FHR en relación a los diferentes parámetros	212
3.1.7	Estudio del tipo histológico de los pacientes con cáncer de pulmón.....	219
3.1.8	Estudio del polimorfismo acetilador e hidroxilador en pacientes con cáncer de pulmón, atendiendo al tipo histológico.....	219
3.1.9	Correlación entre parámetros.....	222
3.2	Tablas de resultados.....	226
4.	DISCUSIÓN.....	244
5.	CONCLUSIONES.....	282
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	284

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN.

El tabaquismo es considerado por muchos autores como la principal causa de muerte evitable de los países desarrollados. Durante los últimos años se ha acumulado una importante cantidad de información sobre los efectos nocivos para la salud; así se ha comprobado que entre los fumadores existe una menor esperanza de vida, un aumento de la incidencia de cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cardiopatía isquémica, cáncer de laringe, cavidad oral, esófago, vejiga urinaria, riñón y páncreas, ulcus gastroduodenal y otras afecciones^{1,2,3}.

También existe una gran evidencia sobre los beneficios derivados de abandonar el hábito de fumar, tanto en la mortalidad como en la morbilidad⁴.

El consumo de tabaco, como cualquier otro fenómeno social, viene determinado por factores políticos, legislativos, socioeconómicos y culturales, así como por factores personales⁵.

En España, actualmente, constituye la mayor causa aislada conocida de mortalidad y contribuye, de modo creciente, a la morbilidad. Su eliminación tendría por sí sola mayor efecto positivo que cualquier otra medida de Salud Pública. Se puede atribuir al tabaco el 30% de los tumores malignos, el 80% de las bronquitis crónicas y enfisema, el 20-25% de las muertes por cardiopatías coronarias y accidentes cerebro-vasculares. Además, el 90% de los cánceres de pulmón se relaciona etiológicamente con el consumo de tabaco⁶.

Según los datos del borrador del Plan de Salud, del Ministerio de Sanidad y Consumo, Aragón es la tercera comunidad autónoma española, a corta distancia de Asturias y Cantabria, en cuanto a incidencia y mortalidad por cáncer. El cáncer ocupa el segundo lugar como responsable de las

muerres registradas en España (25%), tras las enfermedades cardiovasculares (43%). En nuestro país, uno de cada cuatro varones muere de cáncer y una de cada 5,5 muertes entre las mujeres lo son por cáncer. Tráquea, bronquios y pulmón son los órganos más frecuentemente afectados en los varones. El 80% de estos casos y otros tumores malignos se relaciona con el consumo de tabaco, al que se imputa un 30% de las muertes.

También se ha encontrado, en varios estudios epidemiológicos, un pequeño pero significativo aumento del riesgo de cáncer pulmonar en fumadores pasivos^{7,8}, así como un mayor riesgo perinatal en hijos de madres fumadoras⁹.

Al abandonar el hábito se reduce el riesgo de cáncer de pulmón, siendo más marcada esta disminución en varones que en mujeres, sobre todo para carcinoma epidermoide, microcítico y de células gigantes, más que para adenocarcinoma, aunque el riesgo relativo disminuye en todos los tipos celulares¹⁰. A los 10-15 años de dejar de fumar, el riesgo es tan bajo como en los no fumadores¹¹.

La proporción de fumadores entre la población española se aproxima al 36%, existiendo una mayor prevalencia entre los jóvenes, llegando a ser de un 50%. La edad media de comienzo del hábito de fumar está en torno a los 17 años. Asimismo, el consumo de tabaco ha aumentado enormemente, en los últimos años, por parte de las mujeres jóvenes, en el contexto de una tendencia creciente del consumo a nivel global. Nuestro país ocupa el sexto lugar del mundo en cuanto a fumadores se refiere¹².

La intensidad del consumo es elevada, ya que la frecuencia media es de 20 cigarrillos diarios; un 19% de los fumadores sobrepasan los 25 cigarrillos/ día y un 3% los 40 cigarrillos/ día¹³.

Desde los estudios de Doll (1950)¹⁴, se ha demostrado

una asociación entre el consumo de tabaco, especialmente la inhalación del humo del tabaco de cigarrillos, y el cáncer de pulmón.

En varones, su incidencia varía entre 5-80 casos por 100.000 habitantes según los países. En mujeres, el hábito tabáquico tiene una incidencia creciente, lo cual se traduce en un alarmante incremento del número de casos de cáncer de pulmón (5-40 casos por 100.000 habitantes).

Los varones que fuman tienen un riesgo 14 veces mayor de padecer cáncer de pulmón que los que no fuman, con un evidente paralelismo dosis-riesgo.

Aunque se ha comentado que las mujeres fumadoras tienen un riesgo aumentado solo 2,5 veces inferior al varón frente a las no fumadoras¹⁵, parece que las diferencias en la cantidad de tabaco consumido y el tiempo de duración del hábito pueden explicar las diferencias de riesgo. Probablemente, a igualdad de exposición, el riesgo sea similar entre hombres y mujeres¹⁶.

Las tasas de mortalidad por cáncer han mostrado un marcado incremento entre varones en España, en el período comprendido entre 1951 y 1985. Esto puede ser atribuido principalmente a un aumento de la mortalidad por cáncer de pulmón (de 8.63 personas/año a 44.74), que fue solo parcialmente balanceado por una reducción en la mortalidad por cáncer de estómago (de 36.18 a 18.31). Entre mujeres, este incremento en la totalidad de cánceres ha sido menor, siendo el aumento en el cáncer de mama la principal causa de muerte¹⁷.

Trabajos prospectivos y retrospectivos actuales coinciden en atribuir unas tasas de mortalidad más elevadas a los fumadores que a los no fumadores^{11,18,19}.

Un estudio prospectivo llevado a cabo por la "American

Cancer Society" sobre 1.2 millones de personas, indica un aumento del riesgo de mortalidad entre fumadores debido a los cánceres relacionados con el humo del tabaco. Este riesgo es del doble en varones y de cuatro veces mayor en mujeres. Según los datos obtenidos, se prevé que el consumo de tabaco, como causa aislada, podrá contribuir a poco más de 157.000 de las 514.000 muertes totales que se espera que ocurran en EEUU en 1991. En conjunto, el tabaco contribuye directamente al 21.5% de todas las muertes por cáncer en mujeres y al 45% en varones²⁰.

Se ha podido observar que el riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón está estrechamente relacionado con el número de cigarrillos fumados^{21,22}, y más aún con el tiempo de exposición al hábito^{23,24}, con la edad de comienzo del mismo²⁵, y con las formas de fumar²⁶, así como con la presencia o no de filtro²⁷ (el riesgo es un 10-30% menor en cigarrillos con filtro).

Los fumadores de cigarrillos bajos en alquitrán y nicotina tienen un 20% menos de riesgo de padecer cáncer de pulmón²⁸.

1.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL HUMO DEL TABACO.

En el humo del tabaco se han identificado más de 3.800 sustancias químicas, incluyendo al menos 40 carcinógenos conocidos y la mayoría de ellos se encuentran en la fase de partículas del humo. Por tanto, se admite ampliamente el papel del tabaco en el origen de diversos procesos tumorales, especialmente del cáncer de pulmón.

La composición exacta del tabaco continúa siendo un proyecto concreto para los científicos del tabaquismo y todavía no ha podido establecerse la relación completa de componentes originarios en la planta y los que se forman y transforman en el complejo proceso de la combustión, durante el acto de fumar. La elevada temperatura de combustión en la

zona de incandescencia del cigarrillo (800°C) ofrece como consecuencia un complicado fenómeno de reacciones químicas rápidas y efectivas, que desembocan en la formación de sustancias que solo se sintetizarían en condiciones especiales²⁹. Se trata de los procesos de pirolisis y destilación seca³⁰.

Desde el punto de vista fisiopatológico, hay cuatro grupos de sustancias tóxicas en el humo del tabaco que deben ser tomadas en cuenta:

- Nicotina y derivados.
- Monóxido de carbono.
- Gases irritantes.
- Carcinógenos.

1.1.1.1 NICOTINA.

Representa la sustancia más característica del tabaco, ya que es la causante directa de algunos estados fisiológicos y del estado de dependencia del fumador hacia el tabaco³¹.

La cantidad de nicotina absorbida varía en función del hábito del fumador, del tipo de tabaco consumido y del pH del humo.

El humo del cigarrillo tiene un pH ácido (pH=5,4), de modo que su absorción se realiza principalmente en el sistema broncopulmonar³², mientras que el pH del cigarro puro y de la pipa es alcalino (pH=8,5), por lo que la nicotina se absorbe más a través de la mucosa oral. La concentración de nicotina en plasma será menor si la comparamos con la de los fumadores de cigarrillos.

La vida media en sangre arterial es de unos 40 minutos (20-80). Se metaboliza principalmente en hígado y de forma

parcial en pulmón y riñón. Sus metabolitos se eliminan por orina, disminuyendo la velocidad de excreción cuando el pH de ésta es alcalino³³, manteniendo, por tanto, niveles plasmáticos durante más tiempo.

La nicotina se excreta también por la leche de las mujeres que fuman, durante la lactancia.

Los principales metabolitos de la nicotina son la cotinina y la nicotina-1'-N-óxido, que se forman respectivamente por oxidación del carbono y por N - oxidación del anillo de pirrolidina. Como la cotinina se elimina con mayor lentitud (vida media de 19 horas), refleja mejor el consumo global que la nicotina misma³⁴.

La nicotina ejerce algunas funciones sobre el organismo, como son: la estimulación transitoria del sistema nervioso periférico seguida de una depresión más persistente de los ganglios autónomos³⁵; incremento de la frecuencia cardíaca y discreta elevación de la presión arterial y del débito cardíaco, por estímulo directo de los quimiorreceptores carotideos y por la liberación de catecolaminas, sobre todo adrenalina^{36,37}; alteraciones gastrointestinales (nauseas, vómitos y diarreas) por estímulo parasimpático; en el sistema nervioso central produce temblores en las manos y un cuadro de alerta en el EEG (actividad rápida de bajo voltaje), menor tono muscular esquelético y disminución de los reflejos tendinosos profundos. A dosis bajas produce estímulo reflejo del centro respiratorio³⁸; a dosis altas puede provocar la muerte por insuficiencia respiratoria debida a parálisis central y bloqueo periférico de los músculos respiratorios.

1.1.1.2 MONÓXIDO DE CARBONO.

Es un gas incoloro, muy venenoso, de elevado poder tóxico, que se produce durante la combustión del tabaco,

siendo mayor su cantidad en el cigarrillo, ya que el papel es una fuente añadida de producción. El CO tiene importantes repercusiones sobre el organismo³⁹.

El CO inhalado se mezcla con el aire en los alvéolos pulmonares, atraviesa la barrera alveolar y penetra en la sangre, desplazando al O₂ de los hematíes (de forma competitiva), dando lugar a la formación de carboxihemoglobina (COHb), sustancia de color rojo muy intenso y con un espectro de absorción propio⁴⁰. En fumadores crónicos, los niveles de COHb en sangre pueden llegar a límites tóxicos.

1.1.1.3 GASES IRRITANTES.

Las sustancias irritantes del humo del tabaco se encuentran tanto en la fase de partículas como en la gaseosa y son responsables de los fenómenos irritativos de la mucosa respiratoria (laringe, tráquea y bronquios), conjuntiva y pituitaria.

Los irritantes más importantes de la fase particulada son los fenoles, ácidos orgánicos y benzoquinona. En la fase gaseosa, la acroleína, los aldehídos (que disminuyen el movimiento de los cilios), el peróxido de nitrógeno, el ácido cianhídrico y el amoníaco⁴¹. Estas sustancias ejercen una acción estimulante sobre la mucosa del árbol respiratorio, produciendo un aumento de la secreción glandular y tos, así como broncoconstricción, lo cual favorece la aparición de infecciones y broncopatía crónica, provocando alteraciones enzimáticas y morfológicas en las células bronquiales que se han relacionado con la aparición del cáncer de pulmón.

1.1.1.4 CARCINÓGENOS (ALQUITRANES).

Son sustancias que se forman durante la combustión del tabaco. Su importancia radica en su participación activa como productos generadores de alteraciones cancerígenas (directas e indirectas), circunstancia demostrada tanto en el organismo humano como en la experimentación animal.

Estos compuestos carcinógenos pueden dividirse en tres grupos fundamentalmente: iniciadores, promotores y cocarcinógenos. Los iniciadores son los que primeramente afectarían el aparato genético celular y daría lugar a la aparición de la célula tumoral. Los promotores, sustancias inactivas por ellas mismas, actuarían de una manera reversible estimulando o "despertando" la célula alterada y, por fin, los cocarcinógenos ejercerían su efecto coayudvante, cuando coinciden en el tiempo (simultáneamente) con los carcinógenos "*per se*" o iniciadores.

Existe, además, un grupo de carcinógenos con acción órgano-específica como las nitrosaminas, que se han relacionado con los cánceres de páncreas, esófago, riñón y vejiga; los metales Po-210, Ni y Cd con el cáncer de pulmón y la β -naftalina y diferentes aminas aromáticas con cánceres urinarios. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Componentes carcinógenos aislados en la fase de partículas del humo del tabaco.

COMPONENTE	CANTIDAD/CIGARRILLO
1. INICIADORES	
Benzopireno	0,01 - 0,05 µg
Otros HPA	0,3 - 0,4 µg
Dibenzo(a,j)acridina	0,003 - 0,01 µg
2. PROMOTORES	
Fenol	50 - 130 µg
o-Cresol	20 - 40 µg
m-tp-Cresol	40 - 70 µg
2,4-Dimetilfenol	15 - 25 µg
Catecol	160 - 500 µg
3-Metilcatecol	15 - 25 µg
4-Metilcatecol	10 - 25 µg
Hidroquinona	50 - 120 µg
Resolcinol	15 - 20 µg
Scopoletin	140 - 280 µg
β-Naftalol	0,5 - 2,0 µg
3. COCARCINÓGENOS	
Pireno	0,05 - 0,2 µg
Otros HPA	0,5 - 1,0 µg
1-Metilindoles	0,8 µg
9-Metilcarbazoles	0,14 µg
Catecol	200 - 500 µg
Alquilatecoles	10 - 30 µg
4. CARCINÓGENOS ÓRGANO-ESPECÍFICOS	
4.1 ESÓFAGO	
N-nitrosonornicotina	137 - 140 ng
Nitrosopiperidina	0,9 ng
Nitrosaminas desconocidas	?
Nitrosopirrolidinas	1 - 110 ng
4.2 PULMÓN	
Polonio-210	0,03 - 1,3 pCi
Compuestos de Níquel	0 - 600 ng
Cadmio	9 - 70 ng
Sustancias desconocidas	?
4.3 PÁNCREAS	
Nitrosaminas	?
Desconocidas	?
4.4 RIÑÓN Y VEJIGA URINARIA	
β-Naftilamina	22 ng
x-Aminofluoreno	+
O-Toluidina	+
Aminas aromáticas desconocidas	?
O-Nitrotolueno	21 ng
Compuestos nitrogenados desconocidos	?
Di-N-butilnitrosamina	0,3 ng
Otras nitrosaminas	?

1.1.2 CARCINOGENESIS Y TABACO.

Se considera al tabaco como responsable del 30% de todas las muertes por cáncer⁴². La incidencia del cáncer de pulmón ha ido en aumento durante este siglo, lo cual se explica por el aumento del consumo de tabaco, especialmente cigarrillos, en ambos sexos⁴³.

En la Figura 1 se representan esquemáticamente las alteraciones producidas por el tabaco en el organismo.

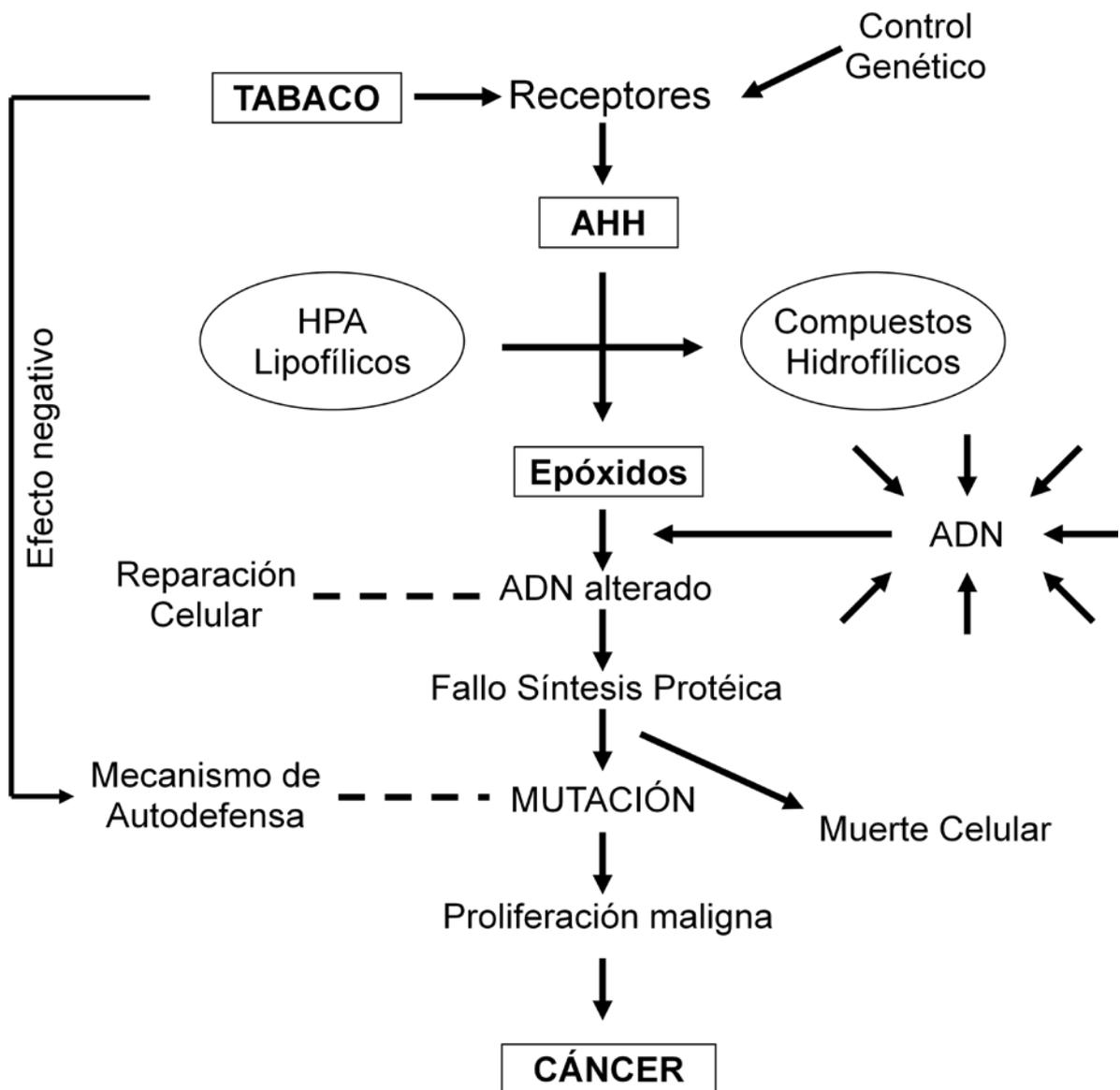


Figura 1. Acción carcinogénica del tabaco

La iniciación a la carcinogénesis depende tanto de factores ambientales como genéticos. La arilhidrocarbón hidroxilasa (AHH) está sujeta a variaciones en su concentración que dependen de su exposición a inductores específicos, entre los que se encuentra el humo del tabaco, produciéndose un aumento de la síntesis proteica y de la fracción citocromo P-450, monooxigenasa del sistema microsomal, dado que existe un receptor para los HAP de naturaleza proteica y, por tanto, bajo control genético. El tabaquismo crónico genera la aparición de altas concentraciones de AHH en los macrófagos alveolares, del orden de 10 veces superiores a las encontradas en no fumadores, y ésta es una particularidad que ha sido igualmente demostrada en la experimentación de laboratorio en linfocitos de sangre periférica expuestos al benzoantraceno y otros HPA⁴⁴. No obstante, se observan grandes diferencias entre los individuos en cuanto a la actividad de su AHH, y estos distintos comportamientos en la enzima tienen una implicación genética parcial⁴⁵, lo que determina, en consecuencia, que no todos los sujetos tabaquistas tengan la misma capacidad orgánica para desarrollar un carcinoma. Ver Figura 2.

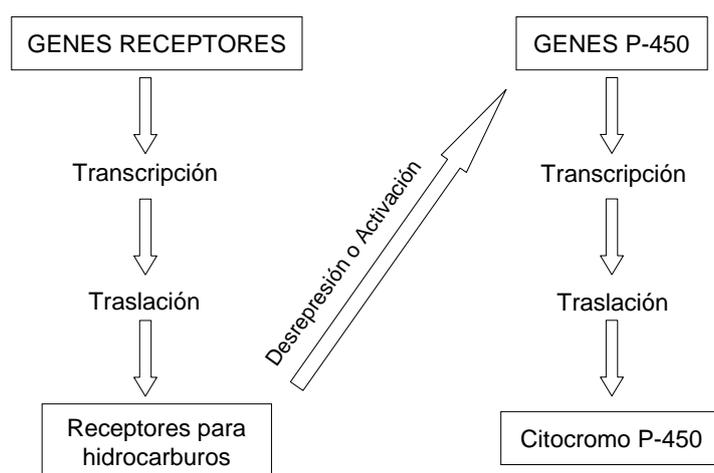


Figura 2. Control genético en la inducción de la AHH.

El citocromo P-450IA1 (actividad aril hidrocarbón hidroxilasa) es responsable de la activación metabólica del benzo(a)pireno en el humo del tabaco. Se ha encontrado una asociación entre el cáncer de pulmón y el polimorfismo de éste. La frecuencia de genotipo recesivo es dos veces mayor en pacientes con cáncer de pulmón que en controles sanos⁴⁶.

Se piensa que los carcinógenos presentes en el tabaco no intervienen directamente, sino a través de su transformación química, por lo que en realidad son acreedores a la denominación de procarcinógenos. Tras diversas modificaciones se convierten en sustancias de carácter electrofílico, de gran reactividad, en especial con las macromoléculas celulares⁴⁷.

En la Tabla 2 se ven reflejados los carcinógenos del humo del tabaco, actualmente admitidos como conocidos, probables o posibles, según la "International Agency for Research on Cancer" (IARC)^{24,48}.

1.1.3 METABOLISMO Y TOXICIDAD DEL TABACO.

Los compuestos del humo del tabaco (HPA, aminas aromáticas, nitrosaminas y otros), requieren transformaciones metabólicas o activación para dar lugar a reactivos electrofílicos, con gran apetencia por los electrones y que poseen la característica de establecer uniones covalentes con el ADN, ARN y/o proteínas celulares del organismo humano, produciendo lesiones irreversibles que pueden conducir a mutagenicidad y carcinogénesis⁴⁹.

En el humo del tabaco coexisten sustancias inhibitoras enzimáticas, como el monóxido de carbono, que bloquea el citocromo⁵⁰, e inductores enzimáticos como por ejemplo el 3-metil colantreno. El efecto observado habitualmente en

Tabla 2. Principales compuestos identificados en el humo del tabaco, para los que se ha encontrado evidencia suficiente de carcinogenicidad en el hombre.

	Carcinógeno		
	Reconocido	Probable	Posible
Hidrocarburos aromáticos			
Benceno	+		
Benzantraceno		+	
Benzofluoranteno			+
Benzopireno		+	
Dibenzantraceno			+
Dibenzopireno			+
Indenopireno			+
Metilcriseno			+
Aldehídos			
Acetaldehído			+
Formaldehído		+	
Compuestos de nitrógeno			
N-nitrosaminas		+	+
Dibenzacridina			+
Dibenzocarbazol			+
4-aminobifenil	+		
Orto-anisidina			+
Hidracina			+
Dimetilhidracina			+
2-naftilamina	+		
Nitropropano			+
Orto-toluidina			+
Uretano			+
Productos químicos agrícolas			
DDT			+
Compuestos halógenos			
Cloruro de vinilo	+		
Compuestos inorgánicos			
Arsénico	+		
Cadmio		+	
Cromo VI	+		
Níquel	+		
Plomo			+

fumadores es la inducción⁵¹, probablemente por acción de los HAP. En estudios experimentales realizados, se sugiere que el consumo de cigarrillos induce enzimas microsomales metabolizadoras de fármacos. Entre ellas se encuentra la AHH, dependiente del citocromo P-450, que metaboliza una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos, y que al igual que otras isoenzimas de este sistema oxidativo, pueden dar lugar a metabolitos no tóxicos y/o productos tóxicos^{52,53}.

Ahora pasamos a describir el metabolismo de los principales compuestos cancerígenos del tabaco:

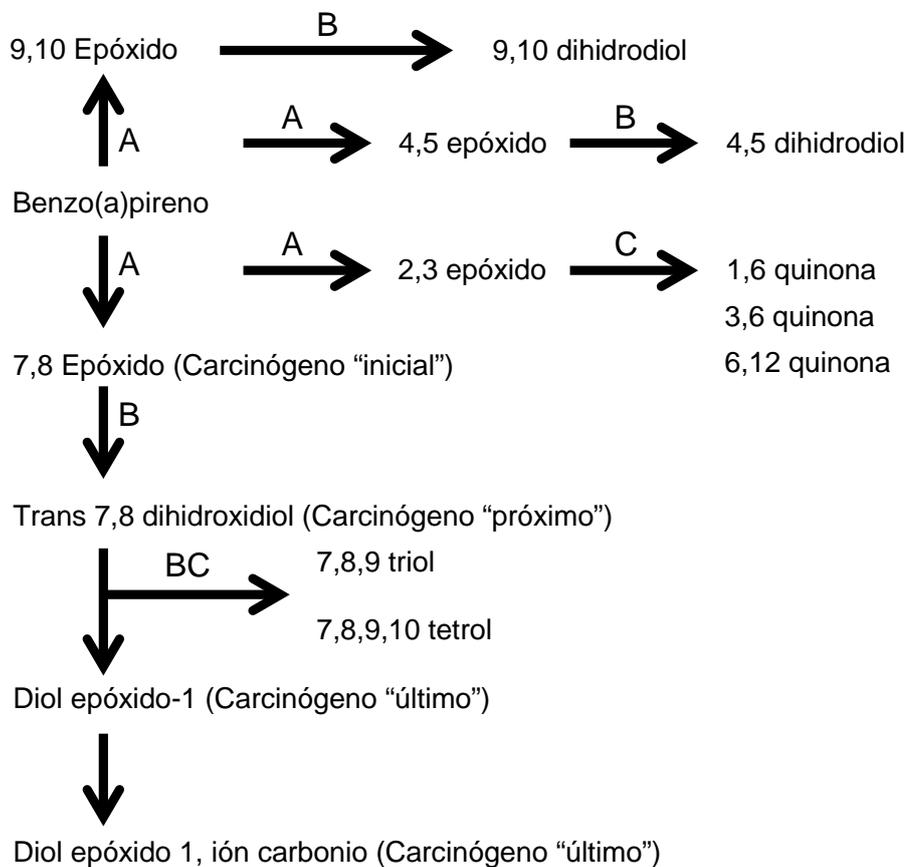
- **Benzopireno.**

El Benzopireno (BP) da lugar, tras su metabolización, a una serie de metabolitos intermedios. En primer lugar, una monooxigenasa dona un átomo de oxígeno, dando lugar a los compuestos epóxidos⁵⁴. A su vez, dichos epóxidos darán lugar a la formación de fenoles, quinones o bien podrán reducirse posteriormente a compuestos hidrocarbonados⁵⁵. En Figura 3 se esquematiza el metabolismo del benzopireno.

Los epóxidos pueden ser metabolizados a dihidrodioles por la epóxido hidrolasa microsomal, siendo éste un camino de detoxicación. También pueden ser conjugados con glutatión, reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa citoplasmática, con el mismo efecto beneficioso⁵⁶. Los conjugados de glutatión, por su parte, son metabolizados y convertidos en ácidos mercaptúricos, eliminándose así por la orina (tioéteres). Por lo tanto, epóxidos, dihidrodioles, fenoles y quinonas se consideran metabolitos primarios del BP, que a su vez pueden sufrir nuevos procesos metabólicos. El resultado final es la producción de multitud de metabolitos primarios y secundarios, algunos de los cuales presentan una gran capacidad para unirse covalentemente a la molécula de ADN.

Epóxidos como el 4,5-epóxido, 7-8 epóxido y 9,10-epóxido, tienen gran capacidad para unirse mediante fuertes

enlaces al ADN, sin más pasos intermedios. De todos los metabolitos formados, el de mayor capacidad mutagénica, transformación celular y carcinogénesis es el 7,8-diol-9,10-epóxido⁵⁷.



A: Aril-hidrocarburo-hidroxilasa B: Epóxido-hidratasa C: Reajuste no enzimático

Figura 3. Esquema del metabolismo del benzopireno

- Nitrosaminas.

Estas sustancias resultan de la nitrosación de diversos alcaloides durante la curación y procesamiento del tabaco.

En su metabolismo tiene lugar una alfa-carbón-hidroxilación enzimática, que origina unos compuestos llamados diazohidróxidos que, a su vez, por acción de diferentes agentes metilantes⁵⁸, dan lugar a los

metildiazohidróxidos (que son los que poseen capacidad para reaccionar con el ADN), formándose, tras hidrólisis, 7-metilguanina, 0-metilguanina, 3-metiladenina y otros productos^{59,60}, importantes en la iniciación carcinogénica⁶¹. Las nitrosaminas actúan provocando errores en la duplicación y en la replicación del ADN.

- **Arilaminas.**

En este grupo de compuestos, destacan por su capacidad mutagénica y carcinogénica la β -naftilamina y el 4-aminobifenil. Su activación metabólica se realiza por diferentes reacciones enzimáticas⁶².

Las reacciones que contribuyen a la activación de sustancias tóxicas de las arilaminas son la N-acetilación, N-deacetilación, N-hidroxilación y conjugación. La N-hidroxilación da lugar a las N-hidroxilarilaminas, que son conjugadas con el ácido glucurónico, dando N-glucurónidos, que se detectan como tales en la orina. Estos conjugados se hidrolizan cuando el pH es ligeramente ácido⁶³, y la hidroxilamina formada pierde agua, espontáneamente, para dar lugar a un electrofílico, que se une a macromoléculas, como el ADN. La carcinogénesis por esta vía tiene lugar principalmente en la vejiga.

En otros casos, las arilaminas o las hidroxiarilaminas son acetiladas polimórficamente y dan lugar a las arilacetamidas, hidroxiarilacetamidas o ácido arilhidroxámico, respectivamente⁶⁴, que no intervienen en la génesis del cáncer de vejiga urinaria, pero sí pueden afectar a otros tejidos.

- **Benceno.**

Su poder carcinógeno se debe a los metabolitos intermedios formados tras la incorporación de oxígeno (catalizada por una monooxigenasa) y a la formación de compuestos epóxidos (de carácter electrofílico), como ocurre con el BP⁶⁵.

- Níquel y Polonio-210.

El Níquel desencadena rupturas variables en el ADN; el Polonio-210 emite partículas alfa con gran poder de ionización regional y acción lesiva sobre el ADN y sus bases, fundamentalmente la timina.

1.1.4 ESTUDIOS ECOGENÉTICOS.

Pese a todo, muchos grandes fumadores no desarrollan un cáncer de pulmón. Por otro lado, se observan casos de esta neoplasia en sujetos sin antecedentes de tabaquismo. Parece, pues, que existe una variabilidad individual al padecimiento de cáncer de pulmón. Cabe suponer que el tabaco es un factor importante, pero sólo un factor más, implicado en la génesis de este tumor. La conjunción con otros factores abocaría al desarrollo de cáncer de pulmón. Se acepta la existencia de una constelación de factores causales en la carcinogénesis, de peso variable.

Se han realizado esfuerzos en la detección de factores genéticos que alterarían la respuesta del huésped a los carcinógenos, entrando así en el terreno de la susceptibilidad genética. Es también probable que factores ambientales mal conocidos puedan interaccionar con carcinógenos. En conjunto constituyen el área de trabajo de la epidemiología genética. Brewer acuñó el término ecogenética para designar esta área de la investigación clínico-epidemiológica⁶⁶.

Es posible que exista una susceptibilidad hereditaria a la aparición de diversos procesos patológicos en la mucosa respiratoria, entre los que se incluiría solo en último término el cáncer de pulmón, más que una susceptibilidad inmediata al padecimiento maligno⁶⁷. De hecho, parece que existe un componente hereditario en la enfermedad obstructiva crónica de las vías aéreas (EPOC)⁶⁸. Notablemente, ciertos investigadores han demostrado que,

dentro del amplio grupo de sujetos fumadores, los pacientes con enfermedad obstructiva crónica de las vías aéreas presentan un riesgo mayor de aparición de cáncer de pulmón que otros fumadores⁶⁹. Una posible explicación tal vez sea la presencia de un aclaramiento deficiente de carcinógenos o una susceptibilidad aumentada del tejido pulmonar a los efectos de los mismo.

Por último, existe un problema añadido: el riesgo familiar al padecimiento de una neoplasia no viene transmitido simplemente por la herencia genética. Múltiples hábitos (cuyo mejor ejemplo es el tabaquismo activo y pasivo) y estilos de vida, especialmente la dieta y la forma de cocinar los alimentos⁷⁰, son compartidos y transmitidos en el medio familiar y algunos de ellos pueden estar implicados en la carcinogénesis.

Se han realizado numerosos estudios intentando demostrar el papel protector de algunos nutrientes frente a determinados tipos de cáncer. Estudios epidemiológicos realizados en humanos⁷¹ y en animales⁷², han encontrado una correlación positiva entre una ingesta baja de vitamina A y un mayor riesgo de cáncer de pulmón.

Por tanto, una dieta con menor ingesta de grasas y mayor consumo de vegetales verdes y frutas, que incluya algunos micronutrientes, como carotenos y vitamina A, podrían disminuir el riesgo de algunos tipos de cáncer, así como las vitaminas E y C pueden ser beneficiosas frente a concentraciones tóxicas de sustancias químicas en el medio ambiente^{73,74}.

1.2 BIOMONITORIZACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A MUTÁGENOS Y CARCINÓGENOS.

Dentro del campo de la carcinogénesis química, se ha observado que los factores ambientales son tanto o más

importantes que los factores genéticos, como determinantes del riesgo de desarrollar cáncer, ya que, si bien hay evidencia epidemiológica de que la incidencia de los diferentes tipos de cáncer es distinta para los diversos países o regiones, cuando un grupo de población migra a otro país, tanto ellos como su descendencia adquieren con el tiempo el mismo patrón epidemiológico del país adoptivo⁷⁵.

Mientras que algunos individuos desarrollan enfermedades neoplásicas tras exposición a mutágenos, otros no lo hacen. Un buen ejemplo de esto es el humo del tabaco, ya que, siendo carcinógeno, la mayoría de los fumadores no desarrollan cáncer.

La valoración de efectos genotóxicos en humanos mediante métodos citogenéticos va encaminada a detectar la exposición a sustancias químicas mutágenas o carcinógenas, o a detectar las diferencias constitucionales genéticamente determinadas en la estabilidad cromosómica⁷⁶.

1.2.1 LESIÓN DEL ADN.

Los carcinógenos químicos se dividen en dos grupos: los que presentan un umbral dosis-respuesta por debajo del cual no hay carcinogénesis, y la respuesta no es lineal; y aquellos para los que no se conoce umbral dosis-respuesta y presentan alguna probabilidad de producir efecto carcinogénico a cualquier dosis con respuesta lineal.

Los del primer grupo, también llamados **promotores**, producen tipos de cáncer que ocurren espontáneamente en grupos de animales no tratados. Se les supone un mecanismo tóxico, si bien éste no ha sido totalmente definido.

Los del segundo grupo, también llamados **iniciadores**, producen tipos de cáncer no observados normalmente sin exposición, y actúan mediante modificaciones del material

genético del ADN.

Para este segundo grupo, el mecanismo de actuación propuesto sería la formación, espontánea o por modificación metabólica, de sustancias electrofílicas altamente reactivas, las cuales se unen covalentemente a los locus nucleofilos del ADN originando aductos, que constituyen el primer paso de la carcinogénesis⁷⁷.

El punto más nucleófilo del ADN es la posición N-7 Guanina. Es el lugar más común de fijación de los electrofílicos, en los que la unión estérica no es un factor importante.

El daño del ADN se produce por alquilación, con pérdidas de bases o formación de espacios apurínicos y malposiciones o errores del código con bases incorrectas⁷⁸. Ante estas lesiones, las enzimas reparadoras del ADN son las encargadas de restituir la cadena de nucleótidos en su secuencia original.

En ausencia de reparación, pueden romperse las hebras carentes de bases, o bien producirse enlaces entre las hebras, interfiriendo en la transcripción o dando lugar a una traslación. En estas condiciones, la célula muere o sobrevive con mutación⁷⁹.

1.2.2 REPARACIÓN DEL ADN.

Existen cuatro tipos de reparación del ADN: por escisión, post replicativa, reparación S.O.S. y sistemas reparadores específicos.

En la reparación **por escisión**, la parte lesionada es extraída junto con una porción de los nucleótidos adyacentes, utilizándose como molde para la reconstrucción de la parte complementaria de la otra hebra. Está libre de

errores en la mayoría de las ocasiones, y sólo se produce en regiones no replicativas.

La reparación **postreplicativa** se produce una vez iniciado el proceso de replicación. Si el daño es la incorporación de una base análoga, se replica con acoplamiento anómalo y mutagénesis directa. Si la lesión, por su tipo, no puede ser replicada por la ADN-polimerasa, ésta reinicia la síntesis unas mil bases más allá. La discontinuidad se repara por intercambio de material genético entre los dos filamentos del ADN.

La reparación **S.O.S.** se produce cuando la replicación está bloqueada por amplias lesiones. Tiene la finalidad de proseguir la replicación sin discontinuidades. Se ponen en marcha una serie de genes reprimidos, que incluyen los de la reparación mutagénica, con síntesis de un cofactor protéico que permite a la ADN-polimerasa incorporar bases nucleicas al ADN-hijo, a pesar de la presencia de lesiones con incorporaciones erróneas y mutación. Permite la supervivencia de la célula a expensas de una alta frecuencia de mutaciones.

Los sistemas de reparación **específicos** permiten la incorporación de bases incorrectas mediante las glicosilasas. La enzima específica de la eliminación de los grupos metilo insertados en las bases, está sometido a procesos de inducción e inhibición, por exposición a pequeñas o altas dosis de agentes metilantes, respectivamente⁸⁰.

La capacidad mutagénica de una sustancia depende, en gran parte de la capacidad que una célula tenga para procesar el daño genético, convirtiéndolo en una mutación⁸¹. Ver Figura 4.

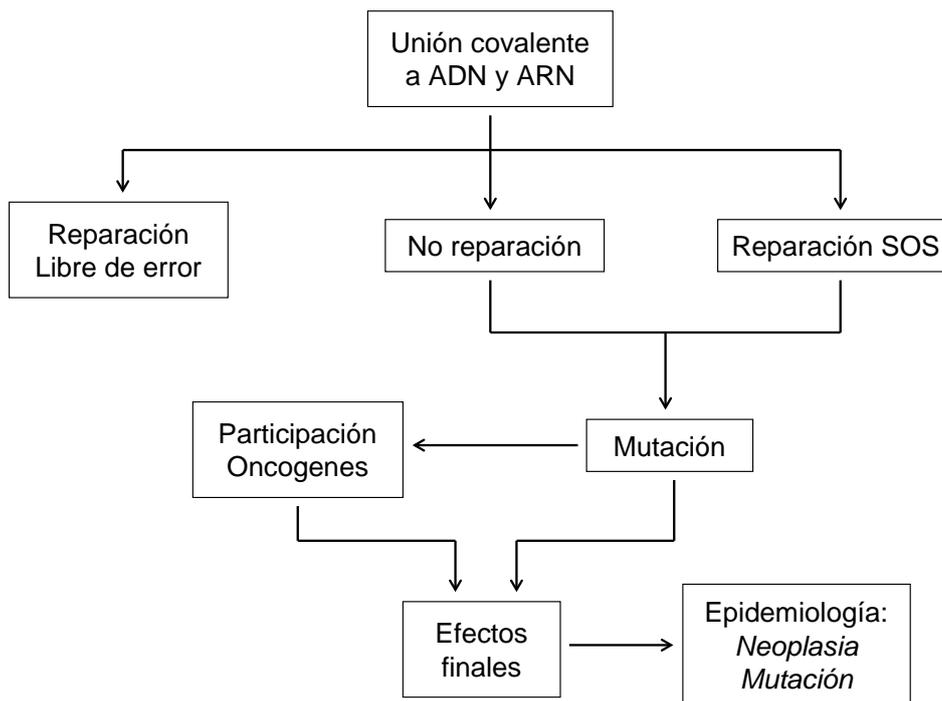


Figura 4. Fase toxicodinámica de la carcinogénesis y/o mutación

La mutación constituye la base molecular del inicio de la carcinogénesis. Aunque el proceso necesario para la expresión del cáncer permanece desconocido, se aceptan como fases subsiguientes la promoción (recombinación y desrepresión de genes) y la progresión tumoral (proliferación celular clonal e independencia del control homeostático).

El daño producido en el ADN depende de la dosis de carcinógeno recibida, existiendo dos tipos de procesos que modulan el efecto, por una parte los mecanismos de absorción, excreción y, en particular, el metabolismo dan lugar a la activación o inactivación de la sustancia; por otro lado, el éxito en la reparación del ADN y el tipo de reparación, determinarán en última instancia el daño final producido al ADN. Ver Figura 5.

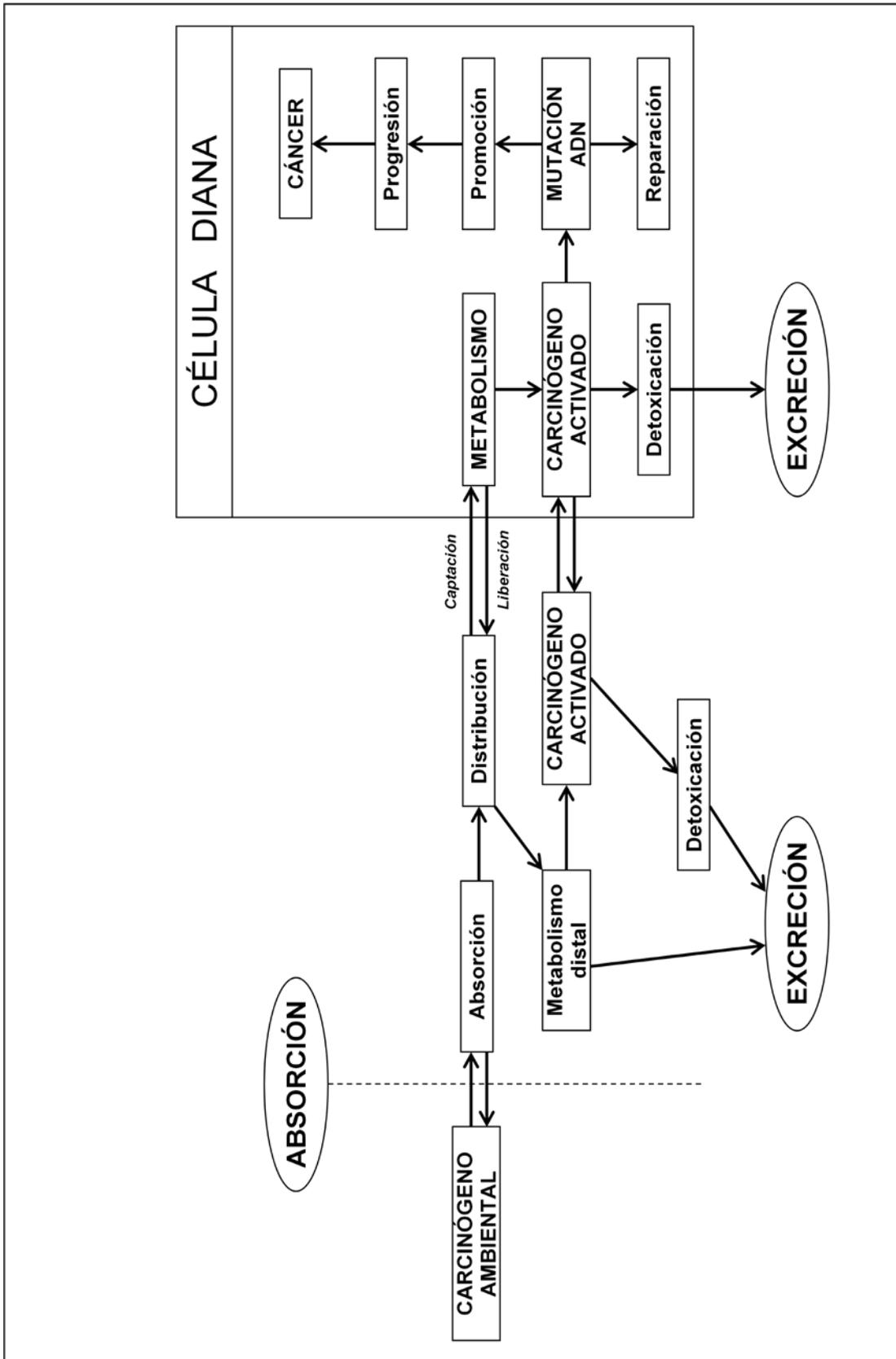


Figura 5. Factores que afectan la actividad de los carcinógenos químicos

Las proteínas enzimáticas están involucradas en el proceso de iniciación. Estas proteínas están codificadas genéticamente, pero el medio ambiente puede modificar la

síntesis proteica, mediante su inducción o inhibición, ya que existe una interacción entre éste y el genoma.

Las consecuencias de la carcinogénesis dependerán de las diferencias interindividuales en la susceptibilidad a padecer cáncer, y la posibilidad, genéticamente determinada, de algunos individuos que poseen alto riesgo⁸².

1.2.3 MONITORIZACION BIOLÓGICA.

Los estudios epidemiológicos, generalmente retrospectivos, nos ponen sobre aviso de la asociación entre la aparición de determinados cuadros patológicos y la exposición de estos individuos a determinados agentes. Son capaces de detectar incrementos del riesgo relativo, pero no aportan pruebas directas de la relación causa efecto.

Para obtener pruebas concluyentes precoces y con bajas dosis, sobre los riesgos de cáncer tras la exposición a una sustancia determinada, se precisa la asociación de los estudios epidemiológicos con pruebas de laboratorio capaces de determinar y medir la exposición a la que ha sido sometido el organismo, así como los efectos biológicos reversibles producidos por dicha exposición⁸³.

Estas pruebas de laboratorio se denominan pruebas de biomonitorización, y se clasifican en tres grupos:

- Dosificación interna o endodosimetría.

- Determinación directa de los agentes en fluidos corporales.
- Presencia de mutágenos o premutágenos en orina (test de Ames).
- Aumento en orina de productos de detoxicación (tioéteres).

- **Detección de efectos precoces.**

- Estudios citogenéticos.
- Aberraciones cromosómicas.
- Intercambios entre cromátides hermanas.
- Formación de micronúcleos.

- **Determinación de dosis biológicamente efectiva.**

- Determinación de aductos a proteínas, ADN y ARN.

Salvo la determinación directa de agentes en los fluidos corporales y las específicas de aductos con proteínas, ADN y ARN, el resto de las pruebas son inespecíficas. Por eso, habrá de tenerse en cuenta, a la hora de valorarlas, algunos efectos modificadores como la exposición a otros agentes genotóxicos distintos al estudiado, como la contaminación ambiental, el tabaquismo y la administración de fármacos.

En la Figura 6 podemos ver, en esquema, las distintas pruebas de biomonitorización y en qué momento de la fase toxicocinética son realizadas.

1.3 TEST CITOGENÉTICOS.

Los principales test para la detección de efectos reversibles a corto plazo, son los estudios citogenéticos. Son pruebas inespecíficas pero directas, que permiten la detección de cambios groseros en el ADN, mediante la visualización con microscopio óptico de los cromosomas o del material nucleico.

El método más empleado para detectar estos efectos genéticos, tras la exposición a sustancias genotóxicas, es el estudio de las alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica tras estimulación mitógena⁸⁴.

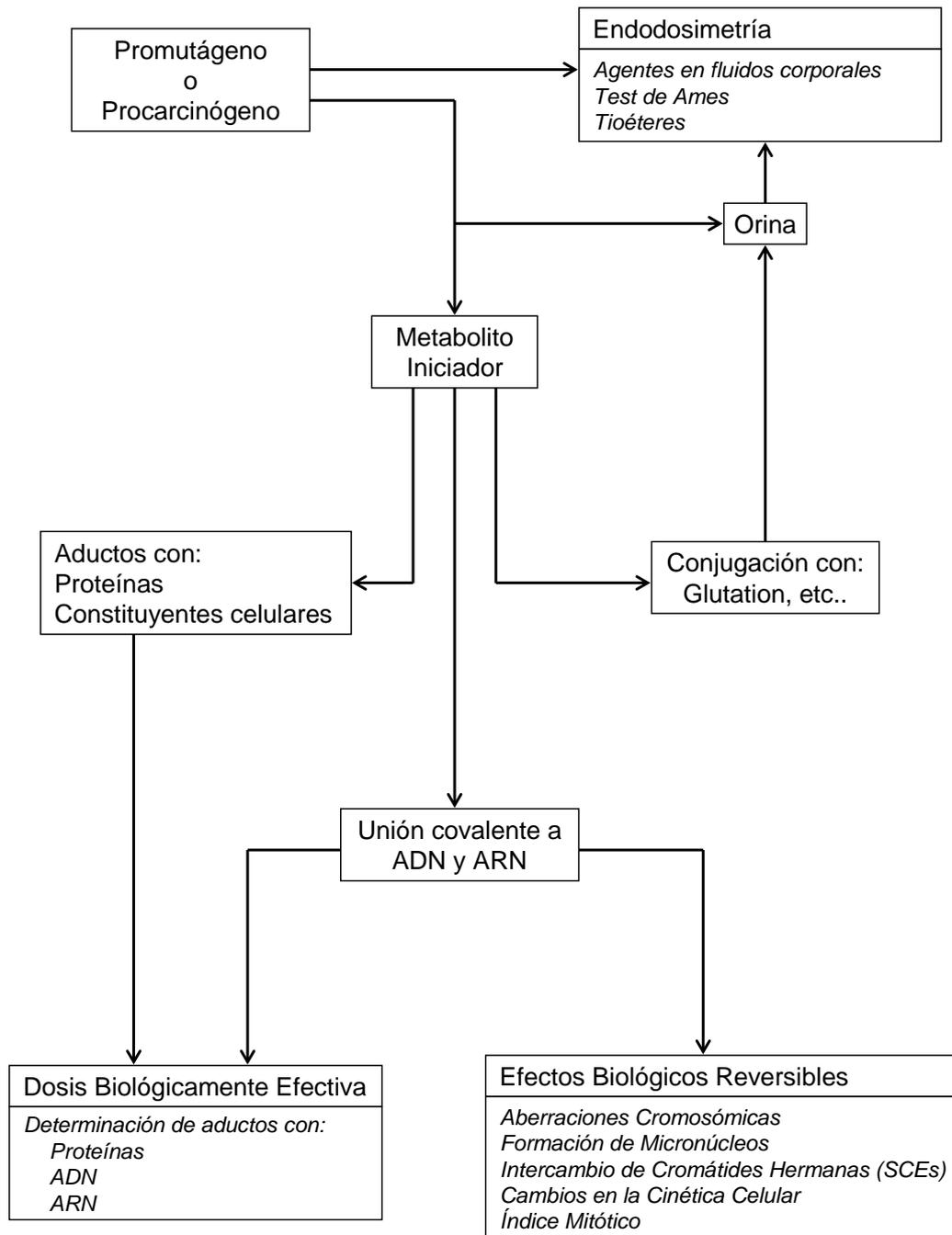


Figura 6. Fase toxicocinética y Biomonitorización.

Los linfocitos de sangre periférica son las células más utilizadas en biomonitorización de poblaciones, debido a su fácil acceso, a la posibilidad de obtener gran número de células y la documentada sensibilidad de este sistema para detectar daño cromosómico visible tras una exposición. La relevancia de estos hallazgos reside en su potencial valor

indicativo, ya que un daño similar puede haber ocurrido en otras células. Sin embargo, no existe una relación directa entre el aumento de daño cromosómico en linfocitos periféricos y un debilitamiento de la salud⁸⁵.

El tipo y la persistencia de la lesión del ADN, inducida por un agente, determinará el grado de daño citogenético observado tras estimulación mitógena.

Hay tres tipos de modificaciones observadas: aberraciones, intercambios entre cromátides hermanas (SCEs) y micronúcleos. Todos ellos requieren, para su expresión, que la célula haya pasado por uno o más ciclos celulares.

1.3.1 ABERRACIONES CROMOSÓMICAS.

Las aberraciones cromosómicas estructurales son el resultado de rupturas, con o sin reincorporación o reparación del cromosoma, en formas anormales. Según afecten a una o a las dos cromátides, se denominan aberraciones de tipo cromatídico o cromosómico respectivamente.

Según el ISCN (1985)⁸⁶, las aberraciones de tipo cromatídico pueden ser clasificadas en:

- **gaps cromatídicos**, son lesiones acromáticas de una cromátide con mínima pérdida de alineación.
- **roturas cromatídicas**, son una discontinuidad en una sola cromátide, que tiene una clara pérdida de continuidad.
- **intercambios cromatídicos**, son el resultado de una o más lesiones cromatídicas y la subsiguiente recombinación del material. Pueden ser entre cromátides de un mismo cromosoma o entre cromátides de diferentes cromosomas (radiales).

Las aberraciones de tipo cromosómico pueden ser divididas en:

- **gaps cromosómicos**, que son lesiones acromáticas de ambas cromátides de un mismo cromosoma y en el mismo locus, con mínima pérdida de alineación de las cromátides.

- **roturas cromosómicas**, son una pérdida de continuidad en el mismo locus de un solo cromosoma, y dan lugar a fragmentos acéntricos.

- **intercambios cromosómicos**, son el resultado de dos o más lesiones cromosómicas y la consiguiente recolocación de ambas cromátides de un solo cromosoma en distinta posición, en el mismo o en otro cromosoma. A su vez pueden ser simétricos (traslocaciones) o asimétricos (dicéntricos).

Se ha observado que las aberraciones tipo cromosómico son producidas principalmente por agentes físicos, mientras que las de tipo cromatídico se producen con más intensidad por agentes químicos. Esto último es debido al hecho de que las lesiones del ADN deben pasar a través de una fase S para ser transformadas en aberraciones. Estos agentes S-dependientes también son capaces de inducir SCEs.

En dependencia de la capacidad de supervivencia celular tras sucesivas divisiones, se clasifican en estables o inestables.

Las aberraciones estables, con capacidad de supervivencia, pueden ser transmitidas a las células hijas. Consisten en traslocaciones equilibradas, inversiones y otras reincorporaciones simétricas. Para su detección se ha de recurrir a bandeo cromosómico con técnicas especiales de marcaje y tinción⁸⁷.

Las aberraciones inestables, con menor capacidad de supervivencia, son los cromosomas dicéntricos, fragmentos

acéntricos, anillos y reincorporaciones en formas asimétricas⁸⁸. En el proceso de división celular puede haber pérdidas de material genético, que normalmente conducen a la muerte celular a largo plazo.

Las aberraciones cromosómicas se correlacionan estrechamente con la exposición a radiaciones ionizantes y a carcinógenos. Algunas enfermedades hereditarias, como la anemia de Fanconi y la ataxia telangiectasia, se asocian con una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas y una alta incidencia de cáncer.

1.3.2 INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDES HERMANAS (SCEs).

El intercambio de material genético entre cromátides hermanas es la manifestación citológica de la ruptura del ADN y su reincorporación, en los lugares aparentemente homólogos, de las dos cromátides de un mismo cromosoma.

Mediante la adición de BrdUrd, podemos observar los SCE en células que han completado dos ciclos de replicación. Algunos compuestos que son capaces de formar uniones covalentes con el ADN, también dan lugar a la producción de SCE.

Zahkarov y Egolina (1972) fueron los primeros en introducir las bases halogenadas análogas a la timina, utilizándolas en el marcaje del ADN y, por tanto, de los intercambios de material genético⁸⁹. Mostraron que al añadir BrdUrd al cultivo celular, y posteriormente teñir con Giemsa, en la metafase se pone de manifiesto la diferente coloración de las dos cromátides de los cromosomas resultantes de la replicación.

Habrá que ser muy estrictos a la hora de añadir el BrdUrd ya que la concentración de BrdUrd en el medio, es el principal factor que puede incrementar el número de

intercambios⁹⁰. Este hecho ha sido comprobado^{91,92} al observar un incremento desde 5.7 SCE/cel a 27.3 SCE/cel, al variar la concentración de BrdUrd de 10 a 200 µgr/ml. La frecuencia de SCEs no varía para concentraciones comprendidas entre la mínima cantidad que permite la observación de intercambios y la correspondiente a 10 veces esta concentración. A partir de este punto, se inicia un incremento lineal⁹³.

Al exponer los cromosomas que tienen BrdUrd a la luz visible, la frecuencia de SCEs aumenta conforme aumenta la intensidad de la misma. Tal incremento es detectable si la luz incide sobre la fase S; si incide sobre la fase G2, no será detectable^{93,94}.

El medio de cultivo también es un factor determinante de la variación de la frecuencia de SCEs espontáneos. La reducida frecuencia observada con el suero autólogo podría indicar la presencia en el suero fetal y en el humano AB de factores inductores de naturaleza desconocida. Previo tratamiento de estos sueros, parece disminuir significativamente la frecuencia de SCEs.

Los SCEs son inducidos por aquellas sustancias que forman aductos covalentes con el ADN o que interfieren en el metabolismo del ADN o en su reparación⁹⁵.

El intercambio de las cuatro hebras de ADN, resultante del SCE, sólo se produce durante la replicación, y se ha demostrado que la polaridad del ADN se conserva durante este proceso⁹⁶.

El mecanismo molecular responsable del intercambio no se conoce, no obstante, puesto que la síntesis del ADN es un requerimiento absoluto, se considera implicada a la mecánica de este proceso⁹⁷.

Diferentes estudios han demostrado que la frecuencia de SCEs aumenta cuando las células, de animales o humanas, son

expuestas a mutágenos y carcinógenos conocidos^{98,99}.

El hecho de que la relación de SCEs y mutación, o entre SCEs y aberraciones cromosómicas, sea diferente para cada agente estudiado, sugiere que cada tipo de lesión del ADN, puede dar como consecuencia cualquiera de estas alteraciones (SCE, aberración o mutación).

Junto con otros índices de crecimiento celular, como la viabilidad y actividad mitótica, los parámetros citocinéticos son de gran importancia en la evaluación de la acción genotóxica. La determinación de parámetros citocinéticos ha sido especialmente útil en los estudios relacionados con el análisis de SCEs. Esto puede ser explicado por el hecho de que, mediante la tinción diferencial de las cromátides hermanas, tras la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdUrd), la historia replicativa de las metafases celulares puede ser fácilmente identificada^{100,101}.

Tras el primer ciclo de replicación, en presencia del marcador, ambas cromátides de cada cromosoma contienen ADN unifilarmente sustituido. Al teñirlos con Giemsa todos los cromosomas aparecen oscuros y uniformemente teñidos.

En el segundo ciclo de replicación vemos una cromátide unifilarmente sustituida por BrdUrd que presenta color oscuro mientras que la otra, bifilarmente sustituida, aparece clara. Es en esta fase donde se ven los SCEs.

En el tercer ciclo, los cromosomas presentan un aspecto mixto. En sucesivas divisiones, las metafases celulares se irán tiñendo cada vez más claras.

Este índice ha sido demostrado por complicadas curvas, representando la cinética de la primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) generación celular¹⁰², o mediante la comparación visual de diferentes cantidades de estas mitosis, en algunos

casos sin análisis estadístico.

En algunas ocasiones, el análisis del PRI puede ser importante para indicar que la activación metabólica del compuesto químico ocurrió incluso sin ser clastogénico ni inducir SCEs¹⁰³.

1.3.3 FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS.

Los micronúcleos son pequeños cuerpos redondeados que se encuentran en el citoplasma, fuera del núcleo principal, siendo de igual forma, estructura y propiedades tincionales que éste. Los MN surgen de fragmentos acéntricos que fracasan, por falta de centrómero, en la incorporación en el núcleo hijo durante la división celular. Los MN también pueden estar formados por cromosomas enteros, debido a un retraso durante la mitosis, a causa de un fallo del huso mitótico, o por configuraciones cromosómicas complejas que presentan problemas durante la anafase.

La formación de micronúcleos ha sido utilizada como un efectivo dosímetro biológico en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos (físicos y químicos)^{104,105}.

La presencia de micronúcleos es un indicador de la preexistencia de aberraciones cromosómicas y, sobre la cuantificación de éstas, tiene la ventaja de ser una técnica más sencilla y precisa¹⁰⁶.

Los micronúcleos son inducidos por agentes clastógenos y por inhibidores mitóticos. Los generados por agentes clastógenos son generalmente más pequeños y están constituidos por los fragmentos acéntricos, que al carecer de centriolo, se desprenden del huso celular. Presentan un contenido igual o inferior al 6% del material nucleico. Los generados por inhibidores mitóticos, son producto de alteraciones del aparato mitótico y contienen del 6 al 20%

del material nucleico, incluyendo cromosomas completos¹⁰⁷.

El inconveniente de los micronúcleos como test citogenético de daño genotóxico, ha estribado en que para su formación y visualización, las células han de atravesar un ciclo completo de reproducción celular y, al ser observadas en la siguiente interfase para su evaluación, resultan indistinguibles de las que no se han dividido.

La adición de marcadores de ciclo celular, para distinguir las células que se han dividido y cuantificar la formación de micronúcleos, no ha llegado a ser satisfactoria, ya que todos los marcadores utilizados (H3-timina, BrdUrd, etc.) son inductores de micronúcleos por sí mismos.

Desde la introducción en 1985 por Fenech y Morley de la técnica del bloqueo de la citoquinesis con citocalasina-B, que impide la división citoplasmática tras la división nuclear, el test de micronúcleos ha ganado en precisión y sensibilidad, ya que la citocalasina-B no es inductora de micronúcleos por sí misma, y permite una rápida y fácil identificación de las células que han pasado un proceso de replicación, las cuales aparecen binucleadas.

El test de MN puede ser utilizado para la monitorización biológica en diferentes tipos celulares. Este test permite la evaluación de la exposición total del organismo mediante el análisis de linfocitos de sangre periférica, así como las exposiciones organo-específicas mediante el análisis de células exfoliadas de mucosa oral, cavidad nasal, esófago, tracto urinario, cervix, etc.¹⁰⁸.

1.3.4 FORMACIÓN DE ADUCTOS.

Los aductos, formados mediante la reacción de carcinógenos químicos o sus metabolitos con el ADN, están críticamente relacionados con la iniciación de la

carcinogénesis química y pueden servir como marcadores moleculares y dosímetros de las exposiciones ambientales a carcinógenos. Se ha encontrado un aumento de aductos al ADN, inducidos por el tabaco, de forma, dosis y tiempo dependiente en tejidos de fumadores con cáncer (pulmón, laringe) y una lenta disminución tras el cese del hábito^{109,110}.

Nowak et al.(1992) han encontrado un aumento significativo en la formación de aductos benzopireno-ADN en monocitos, en pacientes con cáncer de pulmón y con historia familiar de cáncer, al compararlos con los controles. Lo cual sugiere una implicación de la activación e inactivación metabólica en la predisposición para el cáncer de pulmón, lo que deberá ser probado en estudios prospectivos¹¹¹.

Weston et al. (1991) hallaron una asociación positiva entre los aductos hemoglobina-4-aminobifenil y la cantidad reciente de tabaco fumado, pero no con el tabaco fumado en otro tiempo, ni con el riesgo de cáncer de pulmón, ni con el tipo histológico¹¹².

La formación de aductos al ADN por el humo del tabaco está causalmente relacionada con el cáncer en los órganos afectados.

1.4 PAPEL PROTECTOR DEL GLUTATIÓN.

El glutati6n (GSH) es el m1s importante tiol no proteico presente en las c3lulas animales y en la mayor1a de las plantas y bacterias¹¹³. En la c3lula hep1tica, el glutati6n representa el 97% de todos los tioles solubles del hepatocito¹¹⁴. Fue descubierto por F.G. Hopkins en 1921 y m1s tarde fue identificado como el trip3ptido γ -L glutamil-L cistenil-glicina. Ver Figura 7.

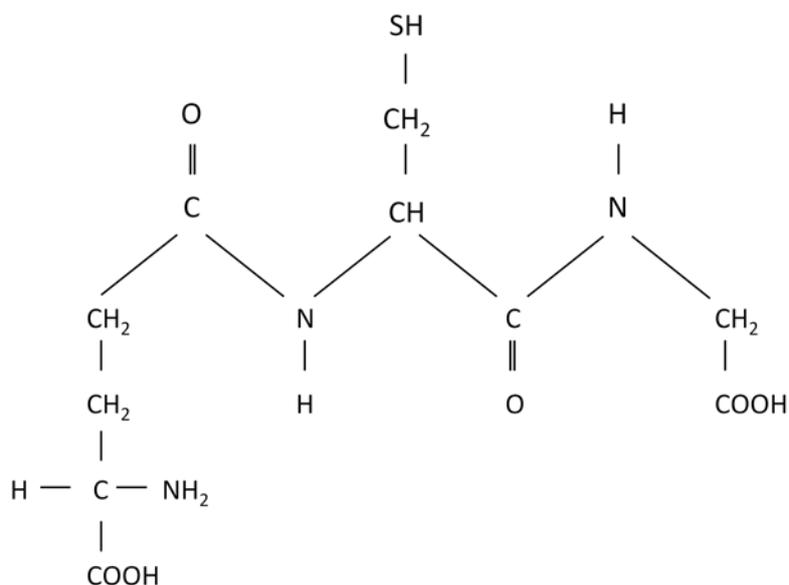


Figura 7. Estructura química del glutati3n.

En las c3lulas de mam3feros, el glutati3n se encuentra a nivel intracelular a concentraciones elevadas, de rango milimolar (0,5-10 mM)^{115,116}, mientras que en plasma se encuentra en concentraciones micromolares (10-20 μM), principalmente en forma reducida¹¹⁷.

En el h3gado, el glutati3n reducido se mantiene alrededor de 7 $\mu\text{M}/\text{gr}$ de tejido fresco¹¹⁸ y en el cerebro alcanza concentraciones de 3 $\mu\text{M}/\text{gr}$ de tejido nervioso¹¹⁹. En la gl3ndula mamaria la concentraci3n de GSH es de 1,5 $\mu\text{M}/\text{gr}$ y en ri3n3n es de 5 $\mu\text{M}/\text{gr}$. Tambi3n se ha detectado a nivel de otros tejidos como bazo, p3ncreas, coraz3n, pulmones, c3psulas suprarrenales y cristalino¹²⁰.

Gran parte de las propiedades biol3gicas de esta mol3cula se deben a dos rasgos estructurales de la misma, que son el enlace γ -glutamil y el grupo tiol (SH). El **enlace γ -glutamil** protege al glutati3n frente a las peptidasas, que como la γ -glutamil-transpeptidasa (GGT) es capaz de escindir el enlace entre la ciste3na y el glutamato, dando lugar al primer escal3n en la degradaci3n enzim3tica del glutati3n. El **grupo tiol** puede ser oxidado y

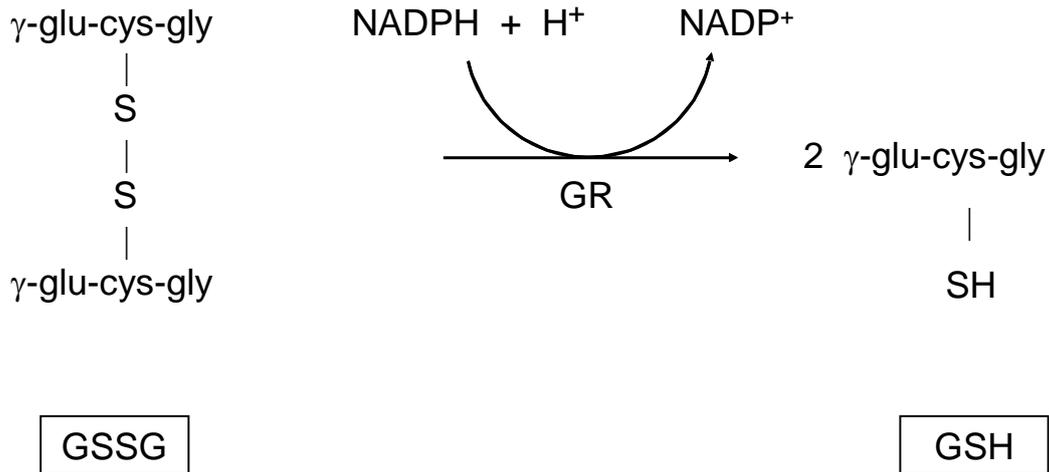
dar lugar a la formación de glutatión disulfuro o unirse a proteínas y otros tioles, formando disulfuros mixtos (GSS-proteína)¹²¹.

Según esto, en el organismo podemos encontrar al glutatión de tres formas distintas, reducido (GSH), oxidado (GSSG), y formando disulfuros mixtos (GSS-proteína), que en su mayoría están unidos a proteínas.

El glutatión es sintetizado intracelularmente, y participa en varias reacciones, muchas de las cuales están implicadas en la interconversión entre glutatión y glutatión disulfuro. La relación entre estas dos formas tiene un efecto importante en el estado de oxido-reducción de los tioles de las proteínas. Por ello, se ha sugerido que el estado de oxido-reducción del glutatión puede actuar como tercer mensajero en cualquiera de las actividades, aumentando o disminuyendo diversos procesos biológicos, como por ejemplo en la catálisis enzimática, en la síntesis proteica y en la afinidad por el receptor¹²².

El glutatión se encuentra casi exclusivamente dentro de la célula, principalmente en el citosol, a una concentración superior a la mitocondrial.

El hígado juega un importante papel en el metabolismo del glutatión y en el transporte interórganos. El nivel de glutatión hepático (GSH) varía en dependencia del estado nutricional, dentro de un rango entre 3 y 10 Mm; el nivel superior se regula mediante un feed back negativo ejercido por el glutatión sobre la γ -glutamil cistenil sintetasa. El nivel de glutatión también depende de la disponibilidad de cisteína.



El GSH participa en la respuesta celular del tumor y del huésped a la radiación, la hipertermia y en los productos de reducción reactivos secretados por células inflamatorias¹²³.

La **síntesis y degradación** biológica del glutatión forman parte del ciclo γ -glutamil. Ver Figura 8.

De todas las enzimas que forman parte del llamado ciclo γ -glutamil, la única que se ha demostrado su existencia unida a la membrana celular es la γ -glutamil transpeptidasa (GGT)¹²⁴, el resto de las enzimas se encuentran en el citosol. Se podría pensar que este ciclo tuviera como misión principal la regulación de la síntesis y degradación de GSH, pero teniendo en cuenta que la concentración de GSH está regulada por mecanismos de retroalimentación de las enzimas implicadas en su síntesis, actualmente se postula que su finalidad es el transporte de AA a través de las membranas biológicas.

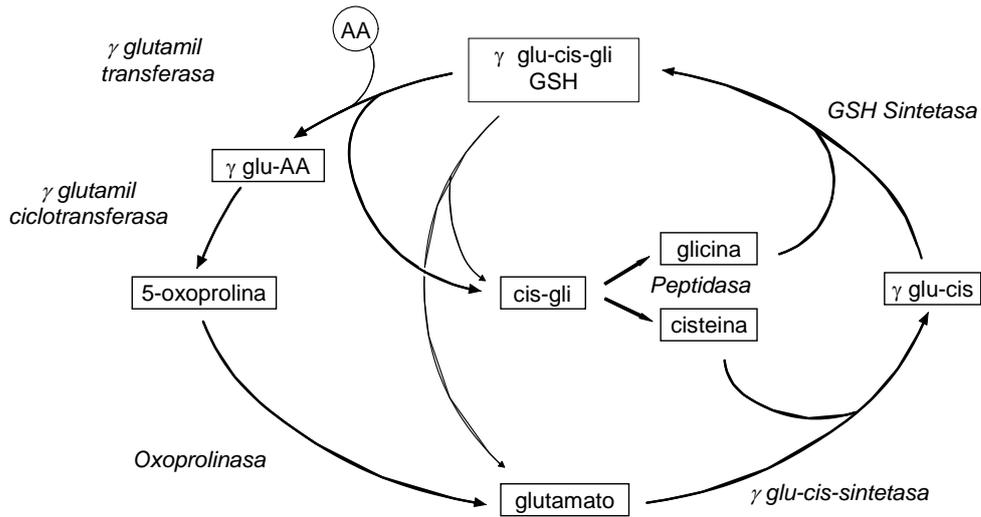


Figura 8. Vías metabólicas del glutati6n: síntesis y catabolismo

1.4.1 FUNCIONES DEL GLUTATI6N.

El glutati6n es un reductor intracelular que juega un importante papel en la catálisis, metabolismo y transporte celular. Protege a las células frente a los radicales libres, peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como de las radiaciones. La mayoría de estas funciones fisiológicas derivan de sus propiedades químicas, ya que posee un grupo tiol y un enlace γ -glutamil que lo hacen resistente a la degradación de las peptidasas. El glutati6n es esencial para el normal funcionamiento de muchas células, especialmente en mamíferos. La deplección de glutati6n aumenta la susceptibilidad de la célula ante determinadas agresiones¹²⁵ y también produce algunos efectos metabólicos.

Entre las principales funciones metabólicas de este tripéptido destaca la protección de estructuras proteicas de membranas celulares contra la agresión de agentes oxidantes¹²⁶, su papel como coenzima en diversas reacciones enzimáticas y su importante participación en la detoxicación de compuestos extraños¹²⁷.

Los fármacos y otros compuestos extraños, sufren en el organismo diferentes reacciones metabólicas (de fase I y de fase II) que conducen a una disminución de su actividad biológica y a una mayor facilidad para ser excretados¹²⁸. Las reacciones de fase I incluyen reacciones de oxidación, de reducción, de hidroxilación y de hidrólisis; las de fase II incluyen las reacciones de conjugación. Algunos conjugados sufren una posterior transformación antes de ser excretados, como es el caso de la conversión de los derivados del glutati6n en derivados mercaptúricos¹²⁹.

A. Detoxicaci6n de fármacos y carcin6genos:

Algunos fármacos, electrofílicos y carcin6genos son detoxicados por conjugaci6n con el GSH. La formaci6n de conjugados del glutati6n es catalizada por la glutati6n-S-transferasa, que se encuentra presente en muchas células, siendo más abundante en el hígado.

El hecho de que algunos fármacos o sus metabolitos reactivos sean conjugados con glutati6n, tiene una gran importancia clínica.

La detoxicaci6n del acetaminofén (paracetamol), cuya toxicidad está mediada por radicales libres¹³⁰, podría ser un ejemplo. También se ha demostrado que el GSH celular altera la citotoxicidad de muchos fármacos quimioterápicos^{131,132}.

La funci6n del glutati6n y la glutati6n-S-transferasa es muy importante de cara a la regulaci6n de la acumulaci6n de reactivos intermedios del benzopireno (BP) en la célula y en la inhibici6n de la uni6n de dichos metabolitos al ADN¹³³. Por eso, cuanto mayor sea la concentraci6n de GSH, mayor es la protecci6n contra dichos compuestos t6xicos¹³⁴.

B. Protección contra agentes oxidantes (estrés oxidativo)

Todas las células aeróbicas están sometidas a estrés oxidativo ya que hay una constante formación de radicales oxígeno (O_2^-) y de hidroperóxidos. Este sistema antioxidante tiene componentes enzimáticos y no enzimáticos. El sistema enzimático se compone de tres enzimas básicas: superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas. Del último grupo, la glutatión peroxidasa es la forma más común en las células de mamíferos¹³⁵.

El radical superóxido (O_2^-) originado durante el metabolismo se convierte en H_2O_2 debido a la acción de la superóxido dismutasa. El H_2O_2 puede ser a su vez detoxicado por la catalasa o por la glutatión peroxidasa. La acción de esta enzima da como resultado la oxidación del GSH a GSSG.

El glutatión oxidado (GSSG) puede ser reducido por la glutatión reductasa a expensas del NADPH. El GSSG puede ser también excretado por las células¹³⁶.

Existe además un sistema de defensa antioxidante que no es enzimático y que está formado por compuestos tales como la vitamina A, el β -caroteno, el ácido retinoico, la vitamina C, la vitamina E, los quelantes del hierro, el GSH y otros tioles¹³⁷. Ver la Tabla 3.

Las especies radicalarias se generan en células y tejidos mediante reacciones enzimáticas, por ejemplo, aquellas involucradas en la cadena respiratoria, en la fagocitosis y en el sistema P-450, también en reacciones no enzimáticas del O_2 con compuestos orgánicos y con radiaciones ionizantes¹³⁸.

Tanto las EAO (O_2 , H_2O_2 , OH y 1O_2), como los productos de la lipoperoxidación son altamente tóxicos, pudiendo inactivar enzimas y biomoléculas al interaccionar con enlaces disulfuros y producir entrecruzamiento de residuos

aminoacídicos o causar mutágenos por daño directo al ADN¹³⁹.

Tabla 3. Mecanismos protectores contra EAO.

1. **Sistema citocromo oxidasa:** Consume la mayor parte del O_2 disponible evitando su conversión a radicales libres.
 2. **Superóxido dismutasa:** Cataliza la dismutación de O_2 a H_2O_2 y O_2 .
 3. **Glutati3n peroxidasa:** Remueve bajas concentraciones de H_2O_2 al reaccionar con glutati3n reductasa (GSH).
 4. **Catalasa:** Descompone altas concentraciones de H_2O_2 a H_2O y O_2 .
 5. **Vitamina E:** Convierte O_2 , OH y peróxidos lipídicas (LOO) a formas menos reactivas
 6. **Vitamina C:** Agente reductor, reacciona diariamente con O_2 , OH y 1O_2 .
 7. **Beta-Caroteno:** Atrapador de oxígeno singlete (1O_2).
 8. **Selenio:** Inhibe la inducción de tumores en animales de experimentación.
-

Parece ser que los procesos de oxidación tienen un papel importante en la carcinogénesis, tanto los agentes que dañan directamente el ADN (iniciadores mutagénicos), como los promotores de tumores¹³⁷.

Por otra parte, ciertas enzimas (GSH transferasas) reparadoras del ADN, pueden ser consideradas como integrantes del sistema de defensa antioxidante de las células, puesto que estas enzimas reparan las roturas del ADN causadas por EAO¹⁴⁰.

El ciclo del GSH consume peróxidos LOOH y H_2O_2 , dando lugar a la formación de LOH y H_2O , que son inactivos. Esta actividad depende de la disponibilidad de GSH reducido, que

a su vez se mantiene a través de la síntesis de novo, vía GSH-sintetasa y de los niveles de NADPH vía GSH-reductasa.

El GSH también constituye otra de las principales defensas contra la carcinogénesis oxidativa y actúa sinérgicamente con la vitamina E, bloqueando la peroxidación lipídica.

El GSSG, cuando aparece en concentraciones superiores a las habituales en el líquido de perfusión, tras atravesar un órgano aislado (hígado, corazón,...), es utilizado como señal de impacto oxidativo, en el interior de la célula. La **agresión oxidativa** se puede definir como la situación en la cual un agente oxidante origina una respuesta por parte de la célula, que se traduce en una alteración del estado redox, tendente a contrarrestar la acción oxidante.

En el caso de detoxificación y reparación del ADN peroxidado en el núcleo celular del hígado de rata donde están involucradas varias enzimas, las GSH transferasas (sobre todo 5*-5*) parece ser que juegan un importante papel, ya que las GSH peroxidasas selenio dependientes parecen estar en el núcleo en menor proporción.

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre compuestos que inhiben la carcinogénesis, aparentemente mediante un incremento de GSH-S-transferasas^{141,142}. Por ejemplo, se ha encontrado que el hidroxianisol butilado, un aditivo alimenticio, protege frente a la carcinogénesis química, y produce un incremento de los niveles hepáticos de epóxido hidratasa microsomal, GSH y GSH-S-transferasa.

La deplección de GSH puede inhibir a la glutatión-S-transferasa en mayor proporción que a la GSH peroxidasa¹⁴³.

Tras la administración de agentes depleccionadores del glutatión, la peroxidación lipídica y la necrosis hepática se desarrollan cuando la deplección de GSH alcanza valores

críticos¹⁴⁴.

1.4.2 GLUTATIÓN ERITROCITARIO.

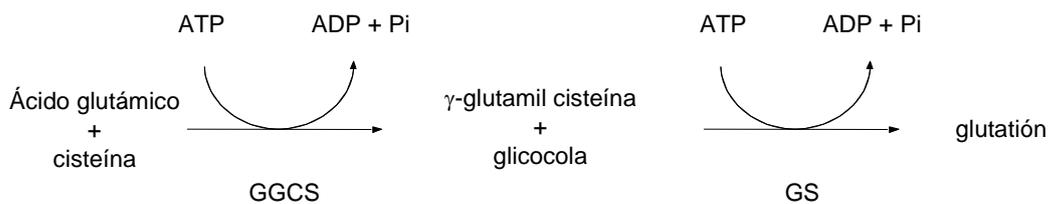
Los eritrocitos contienen una elevada concentración de glutatión (3 Mm), con predominio de la forma reducida (99,5%)^{145,146} y poseen una actividad enzimática GST que es capaz de conjugar covalentemente algunas sustancias electrofílicas con el GSH. Este proceso es de particular interés, ya que sirve como mecanismo de detoxificación de fármacos y carcinógenos¹⁴⁷.

Aunque el hígado es el principal órgano de detoxificación, en ciertas condiciones puede ser, incluso, más importante la conjugación extrahepática¹⁴⁸. Sin embargo, la diferente distribución enzimática entre el hígado y los eritrocitos presenta grandes diferencias en la detoxicación selectiva de ambos tejidos¹⁴⁹.

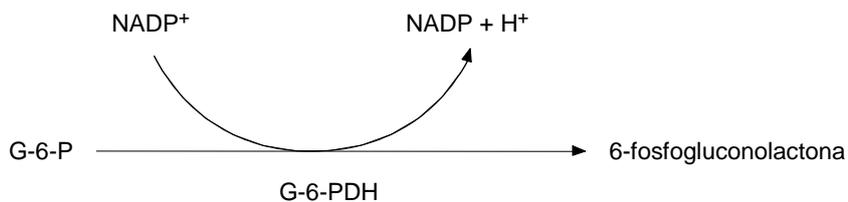
La síntesis de GSH se realiza aun cuando no están presentes los sistemas normales de síntesis de proteínas (que comprenden: mRNA, tRNA, ribosomas y los sistemas enzimáticos apropiados). Por consiguiente, el glutatión puede formarse, inclusive, en el eritrocito maduro y desprovisto de núcleo¹⁵⁰.

Los eritrocitos carecen de mitocondrias, por lo que su única fuente de energía (ATP) es la glucólisis anaerobia. De la oxidación de cada molécula de glucosa obtenemos 2 ATP, cantidad de energía suficiente para las necesidades del hematíe^{125,151}.

El GSH se biosintetiza en los hematíes a partir del ácido glutámico en dos etapas consecutivas, catalizadas por la glutatión-sintetasa (GS) y la γ -glutamil cisteinil sintetasa (GGCS), necesitando la presencia de dos moléculas de ATP¹⁵².

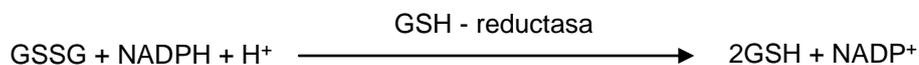


Este proceso se completa con el reciclaje del glutati3n oxidado (GSSG) a glutati3n reducido (GSH), mediante la glutati3n reductasa, actuando como reductor el NADPH procedente de la v3a de las pentosas fosfato. Esta v3a es la 3nica fuente de NADPH en los gl3bulos rojos. Por esta raz3n, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) produce una disminuci3n de NADPH.



La funci3n principal del NADPH en los hemat3es es la de reducir la forma disulfuro del glutati3n a la forma sulfidrilo, en una reacci3n catalizada por la glutati3n reductasa^{150,153}.

El GSSG es en realidad un d3mero de GSH, cuyas mol3culas se unen por un enlace disulfuro.



El glutati3n reducido desempeña un papel muy importante en el metabolismo de los gl3bulos rojos:

- Protege a los grupos -SH de diferentes sustancias, tales como la hemoglobina, la catalasa y las

lipoproteínas de las membranas celulares, debido a que el GSH se oxida con mayor facilidad que los sulfidrilos de la proteína. El GSH es una fuente reductora de enlaces disulfuro, los cuales pueden ser perjudiciales para la función normal de la célula.

- Protege al eritrocito de los agentes oxidantes (agua oxigenada, peróxidos diversos). El H_2O_2 es un potente oxidante que se forma continuamente en el interior del hematíe a partir del radical superóxido, mediante una reacción catalizada por la superóxido-dismutasa (SOD). En ausencia de GSH, el H_2O_2 así formado actúa sobre diversas proteínas del hematíe, especialmente la hemoglobina, produciendo su desnaturalización (cuerpos de Heinz). En situaciones de exceso de tales agentes oxidantes, entra en juego para su eliminación, no solo la glutatión peroxidasa, sino también la catalasa de forma complementaria en cuanto a sus efectos antioxidantes. La disminución de los niveles de glutatión reducido en tales circunstancias (la concentración de GSH en los eritrocitos es de 70 mg por 100 ml de glóbulos rojos), supone un elevado riesgo de oxidación y por tanto de hemólisis para el propio eritrocito.

- También es posible que el glutatión reducido contribuya (de forma accesoria) al mantenimiento en estado ferroso del hierro hemoglobínico, al actuar a nivel de reducción de la metahemoglobina (de forma no enzimática) catalizada principalmente por la diaforasa^{145,147,150,153}, la cual cataliza la transferencia de electrones (reducción) desde el $NADH_2$ (producido a nivel de la glucólisis anaerobia) al citocromo b_5 , el cual los transfiere finalmente al hierro hemínico (Fe^{+++} , Fe^{++}). El GSH y el ácido ascórbico tienen la facultad de reducir algo de metahemoglobina¹⁵⁴.

En la Figura 9 se muestra el metabolismo del glutatión y glucólisis anaerobia.

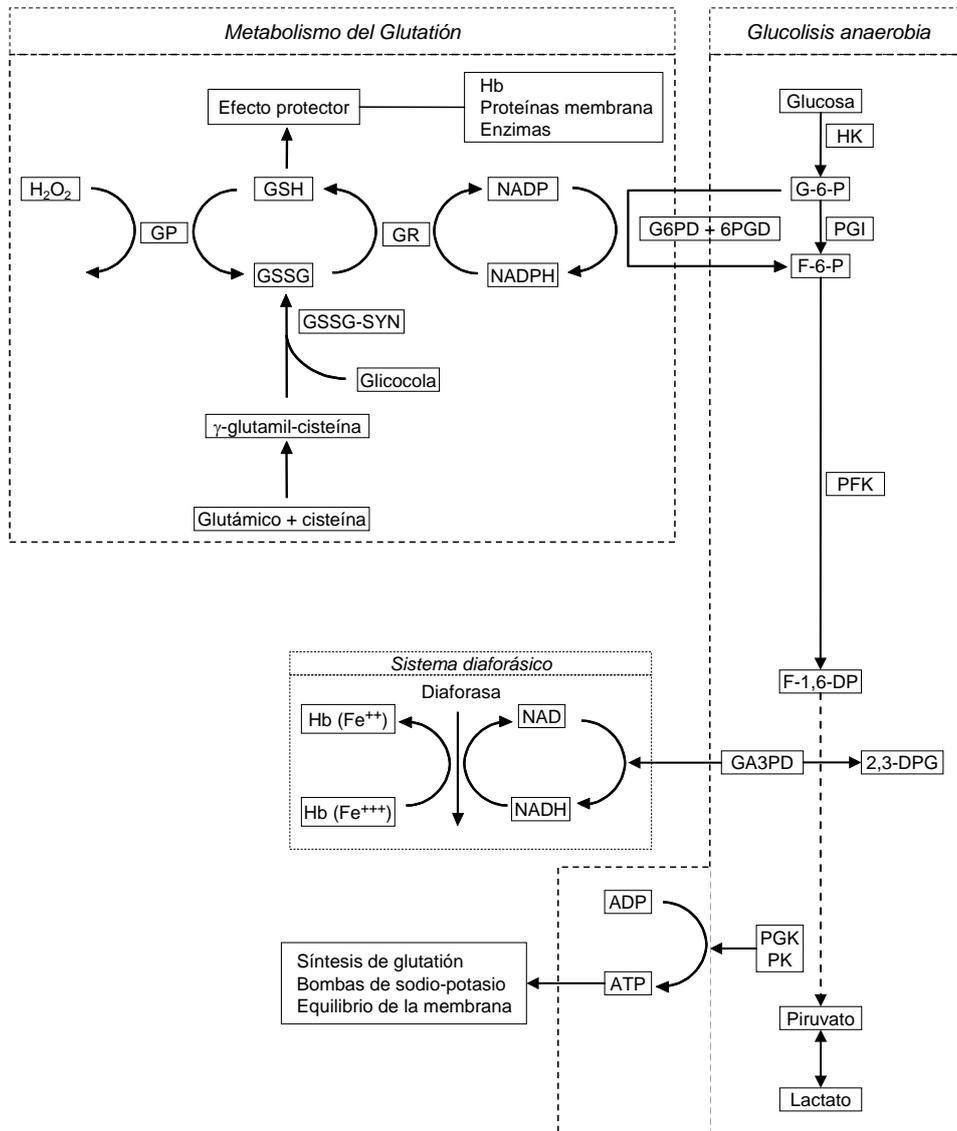


Figura 9. Metabolismo del glutati6n y gluc6lisis anaer6bia.

En comparaci6n con los adultos, los eritrocitos fetales muestran mayor concentraci6n de GSH, as6i como de actividad ̳-glutamyl cisteinil sintetasa (GGCS) y menor actividad de glutati6n sintetasa (GS) y glutati6n peroxidasa (GPx).

En estudios recientes realizados en eritrocitos, se ha comprobado que los niveles de GST disminuyen con la edad, siendo estos niveles máximos en edades medias de la vida (25-40 años), para disminuir después¹⁵⁵.

La glutatión-S-transferasa (GST) varía en función de la edad de forma semejante al GSH, así como la glutatión-S-reductasa (GSR), cuya actividad va en aumento desde la juventud hasta la edad media y disminuye otra vez en el grupo de mayor edad, mientras que el GSSG y la metahemoglobina aumentan con la edad¹⁵⁶.

Los eritrocitos deficientes en G6PDH, pueden padecer hemólisis ante agentes oxidantes, ya que el último eslabón en la cadena de reacciones que dan lugar a la reducción de disulfuros (la generación de NADPH), es deficiente. En este caso estará alterado tanto el estado tiol de la membrana como el intracelular. El GSH es efectivo para reparar el daño oxidativo causado a las proteínas de membrana^{154,157}.

El metabolismo en el cristalino y en el eritrocito tiene gran similitud, por eso, el descenso del nivel de GSH puede conducir a la formación de uniones disulfuro entre las proteínas, las cuales se van agregando y dan lugar a la opacificación del cristalino. Si se mantienen los niveles normales de GSH, puede ser posible evitar el desarrollo de las cataratas¹⁵⁸.

Un factor limitante del proceso de detoxificación puede ser el flujo de xenobióticos que llegue al eritrocito, su conjugación con GSH, o la cuantía de conjugados de GSH. Por tanto, la cantidad total de xenobiótico que puede ser conjugado, depende, en gran medida, de la cantidad de GSH presente en los eritrocitos¹⁵⁹.

En casos de intoxicación aguda por agentes electrofílicos, se ha explorado la posibilidad de preparar eritrocitos humanos con mayor cantidad de GSH, para

favorecer la conjugación de los xenobióticos, ya que en el eritrocito existe una síntesis activa de GSH, que puede ser estimulada por los conjugados de glutatión¹⁶⁰.

1.5 GLUTATIÓN S-TRANSFERASA Y FORMACIÓN DE TIOÉTERES URINARIOS.

El sistema glutatión S-transferasa es el mayor sistema enzimático que cataliza la unión de una gran variedad de sustancias electrofílicas, incluyendo formas reactivas de carcinógenos químicos con el GSH.

Juegan un importante papel en el inicio de la detoxicación de agentes potencialmente alquilantes, como pueden ser los compuestos farmacológicamente activos^{155,161}.

La biotransformación hepática de ciertos xenobióticos por el citocromo P-450, dependiente de las oxidasas microsomales de función mixta, es esencial en la producción de metabolitos altamente reactivos, que pueden ser mutagénicos, carcinogénicos o citotóxicos¹⁶².

El hígado dispone de mecanismos de protección contra los efectos de estos metabolitos alquilantes o arilantes, y es la glutatión S-transferasa (GST-EC 2.5.1.18), quien cataliza la conjugación de dichos compuestos electrofílicos con el glutatión reducido (GSH)^{163,164}.

Los conjugados con glutatión son más hidrosolubles y pueden excretarse por la bilis o ser metabolizados, formando ácidos mercaptúricos eliminables por riñón.

Las GST son una familia de proteínas multifuncionales que tienen una doble función, actuando como enzimas de detoxicación y uniéndose a proteínas intracelulares¹⁶⁵.

1.5.1 LOCALIZACIÓN DE LAS GSTs.

Las GSTs son proteínas citosólicas presentes en gran cantidad de tejidos, siendo más abundante su concentración en el hígado. También se ha identificado una forma microsomal en roedores¹⁶⁶.

Se han purificado en hígado humano y supone un 10% de las proteínas solubles en este órgano. Estas enzimas son también abundantes en pulmón y en macrófagos alveolares, donde se ha comprobado que existe una diferencia significativa en la actividad de dicha enzima entre fumadores y no fumadores^{167,168}, asimismo se ha demostrado su existencia en hígado¹⁶⁹, riñón, pulmón, intestino, corazón, glóbulos rojos, músculo esquelético¹⁷⁰, piel¹⁷¹, cerebro¹⁷² y leucocitos¹⁷³; probablemente, todos los órganos de los mamíferos contendrán GST, aunque cada isoenzima se manifestará de forma variable en cada uno de ellos.

En el hombre, las GSTs están estrechamente relacionadas, en cuanto a su composición de aminoácidos, en la especificidad de sustratos y en sus características inmunológicas¹⁷⁴, posiblemente por que se trate de formas isómeras generadas por la deamidación de los residuos de asparragina en las proteínas.

Se han identificado trece formas diferentes de GST en hígado humano, formadas por diferentes combinaciones de, al menos, cuatro subunidades diferentes.

1.5.2 EXPRESIÓN GST.

Board¹⁷⁵ y más tarde Strange et al.¹⁷⁶, demostraron que las isoenzimas de la GST humana están controladas por tres locus diferentes: GST1 (μ), GST2 (α) y GST3 (π).

La expresión de la GST es variable en los diferentes

tejidos, pero no se conoce la razón de tal variabilidad. En el hombre, las isoenzimas GST2 se expresan uniformemente en hígado, pero no en eritrocitos. Por el contrario, la GST3 es la única isoenzima presente en eritrocitos. En el hígado también hay una GST1 neutra que solo está presente en el 60% de los individuos y que es altamente activa con benzo(a)pireno-4-5-oxido como substrato¹⁷⁷.

La GST3 (π) está de forma muy abundante en intestino y colon, comparado con el hígado. El polimorfismo GST1 (μ) se ha confirmado en todos los tejidos investigados por De Waziers et al.¹⁷⁸.

La isoenzima GST1 es altamente polimórfica y los fenotipos se designan como: GST11, GST121, GST12 y GST10. Laisney et al.,¹⁷⁹ encuentran el locus GST4 en músculo esquelético principalmente y el locus GST5 en cerebro¹⁸⁰.

Las investigaciones realizadas en eritrocitos humanos y de rata, demuestran que ambos poseen actividad GST. Marcus et al.,¹⁸¹ pusieron de manifiesto que las GST del eritrocito humano no son idénticas a las enzimas del hígado.

1.5.3 INDUCCIÓN GST.

Los niveles de GST en hígado pueden ser incrementados tras la exposición a determinados agentes, incluyendo fenobarbital, 3-metilcolantreno, propiltiouracilo y antioxidantes como el hidroxianisol butilado¹⁸², aunque la mayoría de los agentes no causan un aumento uniforme de todas las formas de GST.

Conociendo la considerable importancia de la GST como mecanismo de detoxicación de carcinógenos, la inducción de la actividad de este sistema podría aumentar, potencialmente, la capacidad del organismo para frenar los efectos neoplásicos de los carcinógenos químicos.

La GST es activa en la catalización de la reacción del GSH como nucleofílico, con una variedad de compuestos con centro electrofílico¹⁸³ y está presente en una concentración de alrededor de 1,2 mg/100 ml de preparado de eritrocitos humanos.

En estudios realizados recientemente no se ha encontrado correlación entre la actividad de la GST en el hígado adulto y la edad (32-70 años)¹⁸⁴.

1.5.4 PRINCIPALES FUNCIONES DE LA GST.

La GSH está involucrada en la detoxicación de gran número de xenobióticos, incluyendo toxinas hepáticas como el acetaminofén, algunos carcinógenos y sustancias endógenas como las prostaglandinas, leucotrienos, hidroperóxidos orgánicos y esteroides.

La GST parece tener una baja afinidad y una amplia especificidad para la unión de compuestos lipofílicos con el GSH. Como el pK del glutatión a pH fisiológico es de 9.3, estará ionizado, lo que aumenta la propiedad nucleofílica de éste ($\text{GSH} \rightarrow \text{GS}^- + \text{H}^+$).

La principal función de las GSTs puede ser la detoxicación mediante la unión, covalente o no, a compuestos tóxicos y la catálisis de las conjugaciones con el glutatión. El benzopireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA), presentes en el humo del cigarrillo son conocidos carcinógenos. Se ha demostrado en roedores que el benzopireno produce cáncer de pulmón y de otros órganos. El efecto carcinogénico de éste y otros HPA es debido principalmente a la alta toxicidad de los metabolitos de dichos compuestos, formados durante su metabolismo por las oxidasas de función mixta.

La GST probablemente representa uno de los principales

sistemas de defensa para la detoxificación de estos compuestos. Estas enzimas pueden catalizar la conjugación de epóxidos altamente tóxicos de los HPA con el GSH. De este modo previenen su conversión a polioles altamente carcinógenos^{142,185}.

Los epóxidos formados de los compuestos anteriormente citados pueden ser detoxicados por dos procesos enzimáticos conocidos: el sistema epóxido-hidratasa, que cataliza la hidratación del epóxido, formándose dihidrodioles, y el sistema de la GST citosólica, que convierte estos compuestos en conjugados con glutatión (tioéteres).

En cuanto a la regulación, se produce una respuesta similar en los sistemas de toxicación microsomal y detoxificación citosólica ante la exposición a xenobióticos, ello hace suponer que existe una relación "cooperativa" entre ambos sistemas enzimáticos. La inducción paralela de las enzimas transferasas y microsomales sugiere que la GST modula el efecto biológico de las enzimas microsomales como es la arilhidrocarbón hidroxilasa (AHH) por detoxificación de los productos electrofílicos¹⁸⁶.

La toxicidad de los compuestos depende también de factores como:

- actividad inadecuada de las GSTs en el órgano diana.
- inactividad o inhibición de las GSTs por el electrofílico.
- baja afinidad de las GSTs por el electrofílico, lo que facilita la posibilidad de unión covalente con las macromoléculas.
- deplección del GSH, necesario para asegurar la adecuada protección.

Se ha demostrado que la vía metabólica GSH-GST es uno de los sistemas más importantes de detoxificación con que cuenta nuestro organismo, y previene contra posibles

mutaciones o alteraciones celulares, que pueden dar lugar al desarrollo de neoplasias.

No debemos olvidar que en el metabolismo de algunos compuestos químicos como los hidrocarburos halogenados, además de producirse metabolitos tóxicos por las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, también la GST puede contribuir en las reacciones de bioactivación¹⁸⁷.

La GST también interviene en el transporte intracelular de proteínas. El último escalón en la biosíntesis del heme tiene lugar en el interior de la membrana mitocondrial, y el índice de difusión de este compartimiento es relativamente lento. Cuando la mitocondria intacta es usada como fuente de heme o de otras metaloporfirinas, entonces la GST parece tener gran importancia en facilitar el paso del heme fuera de la mitocondria¹⁸⁸, aunque se desconoce el mecanismo. También interviene en el transporte de hormonas del núcleo celular.

1.5.5 EXCRECIÓN DE TIOÉTERES.

Para muchos xenobióticos, incluyendo carcinógenos conocidos, la formación de conjugados con glutatión representa una importante vía de detoxificación^{189,190} y previene que se unan covalentemente a las macromoléculas celulares¹⁹¹.

La conjugación de los grupos SH de la cisteína del glutatión, muy nucleofílicos, con los restos electrofílicos originados de los xenobióticos, da lugar a la formación de tioéteres, que son finalmente eliminados como conjugados de GSH por la bilis y como ácidos premercaptúricos, ácidos mercaptúricos y conjugados de la cisteína y otros tioéteres por la orina^{192,193}.

Los compuestos formados por conjugación con el GSH se

rompen a continuación por procesos enzimáticos, dando derivados de la cisteína, cuyo grupo α -aminoácido es acetilado a continuación, para dar los derivados N-acetilcisteína de estos compuestos (ácidos mercaptúricos), que se eliminan rápidamente^{194,116}. El proceso requiere la activación de las siguientes enzimas:

- Glutati6n transferasas.
- Gamma glutamil transpeptidasa.
- Cisteinil glicinasa.
- N-acetil transferasa.

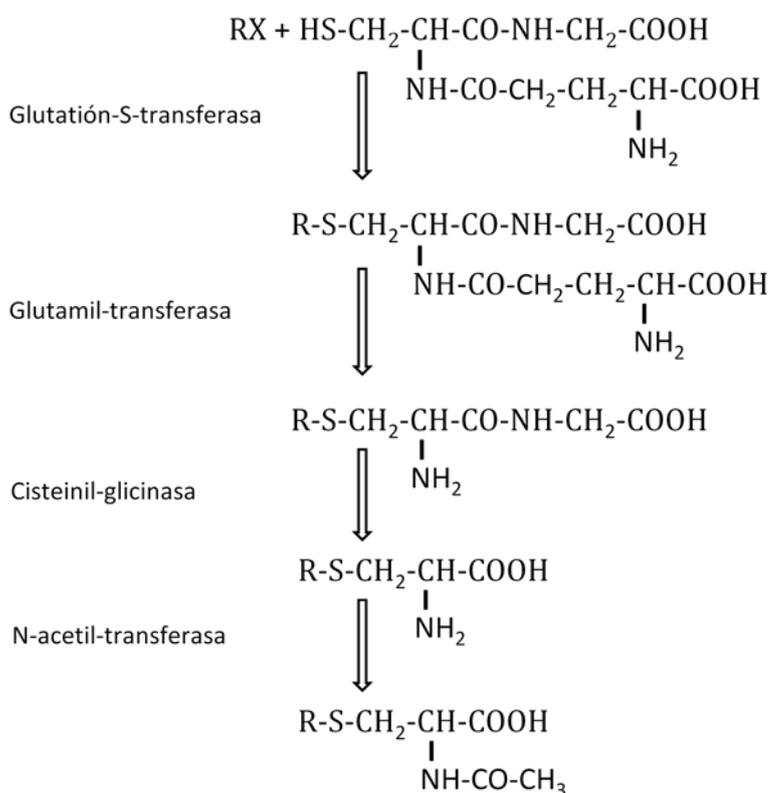


Figura 10. Formaci6n de 6cidos mercapt6ricos.

Tal como observamos en la Figura 10, la secuencia de acontecimientos para la formaci6n de 6cidos mercapt6ricos es la siguiente: los conjugados del glutati6n acaban siendo conjugados de la cisteína por dos reacciones enzimáticas, la

extracción de la fracción glutamil por la gamma-glutamyl-transferasa y la de la parte glicil mediante la cisteinil-glicinasa. Estas enzimas están presentes en la mayoría de los tejidos y, frecuentemente, los conjugados de cisteína son N-acetilados por una N-acetiltransferasa, de forma que, posteriormente, los ácidos mercaptúricos se excretan por orina^{49,126}.

Aunque es ampliamente admitido que los conjugados de glutatión y cisteína de muchos xenobióticos no son tóxicos y se eliminan del organismo, recientes estudios¹⁹⁵ han demostrado que algunos conjugados de GSH y cisteína son de interés toxicológico. La toxicidad de estos conjugados se asocia con la formación de tioles inestables que pueden ser convertidos en agentes alquilantes o en metabolitos tóxicos estables, o en ambos.

La Figura 11 muestra la formación de mercapturatos y metil-tioconjugados a partir de conjugados de cisteína¹⁹⁶.

En mamíferos operan dos vías de metil-tiolación mediadas por dos C-S lyasas químicamente idénticas, pero fisiológicamente diferentes.

Una C-S lyasa tisular que puede escindir los conjugados de S-cisteína formados en el primer paso de los xenobióticos a través de los tejidos y otra C-S lyasa localizada en la microflora intestinal, la cual puede funcionar tanto en metabolitos de la dieta, como en metabolitos mercaptúricos biliares. Ambas C-S lyasas tienen especificidad por los conjugados de S-cisteína.

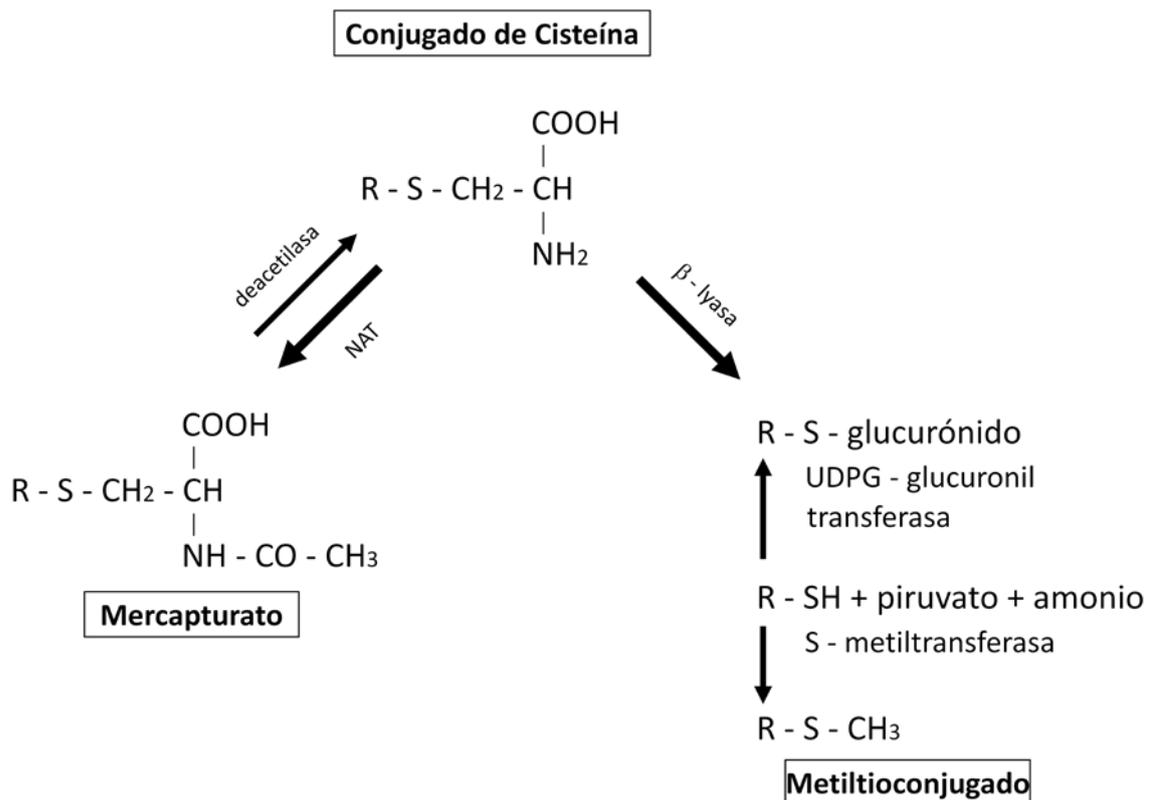


Figura 11. Formación de metabolitos tóxicos a partir de conjugados de cisteína.

De acuerdo con Farber¹⁹⁷, hacen falta tres condiciones para que se produzca la carcinogénesis química:

- Proliferación celular.
- Iniciación del cáncer.
- Promoción (de crecimiento canceroso) tumoral.

Las C-S lyasas pueden iniciar la carcinogénesis por unión (en la luz intestinal) de tioles reactivos, producidos por escisión de la C-S lyasa de los conjugados de cisteína apropiados, excretados con la bilis o presentes en la dieta y continuar la promoción del tumor mediado por un constante suministro de tioles o bien, por la acción de los propios tioles o por deficit de grupos metilo para proceder a la metilación.

1.5.5.1 TIOÉTERES URINARIOS COMO INDICADOR DE EXPOSICIÓN Y DETOXICACIÓN DE COMPUESTOS ELECTROFÍLICOS.

Cuando en alguna parte del organismo, los compuestos electrofílicos, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, reaccionan con el glutatión, los ácidos mercaptúricos y otros tioéteres se excretan por orina, apareciendo como factor de exposición y absorción de una o más sustancias electrofílicas¹⁹⁸.

La absorción de dichas sustancias no es completa, y de la cantidad absorbida, una parte es detoxicada por conjugación con el GSH. Estos conjugados se eliminarán parcialmente por la orina; estas proporciones serán constantes para cada producto e individuo, lo que mantendrá la significación de la concentración final del metabolito.

Cuando la determinación de tioéteres ha sido correcta, la ausencia de un incremento en las cifras de tioéteres urinarios no es suficiente para afirmar que no ha existido exposición, ya que puede ser consecuencia de que:

- la recogida de muestras haya sido incorrecta.
- el producto en cuestión haya sido absorbido, pero sólo una pequeña parte de la cantidad absorbida haya sido excretada como tioéter.
- el producto haya sido absorbido y excretado, pero en forma de tioderivados no recuperables por el método empleado.
- haya existido absorción pero no detoxicación, o al menos no una detoxicación completa.

Especialmente en estos casos, como medida de exposición, es importante combinar la detección de tioéteres en orina con otros tests no selectivos^{199,200,201,202,203}, como la determinación de mutágenos en orina y los tests citogenéticos, que más adelante veremos por ser motivo de este trabajo.

En general, todos los compuestos electrofílicos pueden unirse a macromoléculas tisulares, o bien seguir la vía de la detoxificación, conjugándose con el GSH.

El proceso de metabolización ha sido considerado como un proceso de bioinactivación, ya que el resultado final es un compuesto menos tóxico; aunque se conocen sustancias tóxicas generadas en la biotransformación, siendo esta situación una excepción a la regla general, como ocurre en el caso de los epóxidos producidos en el metabolismo de algunos componentes del humo del cigarrillo, como benceno o benzopireno.

Estos reactivos intermedios, formados durante la oxidación enzimática de algunos compuestos químicos (bioactivación), adquieren propiedades electrofílicas y pueden coexistir con sustancias electrofílicas "per se". Estas sustancias poseen gran capacidad para lesionar macromoléculas celulares (proteínas y ADN)²⁰⁴.

El alcance de la lesión química dependerá del balance entre bioactivación y detoxificación.

La intensidad de todo proceso metabólico viene dada por la dotación enzimática de cada sujeto, y existe una gran variabilidad individual.

Encontramos individuos con un sistema enzimático de activación (oxidativo) muy desarrollado, que genera una gran cantidad de reactivos intermedios. Lo mismo puede decirse del sistema de detoxificación GSH-GST, de lo que dependerá la capacidad de detoxificación del individuo.

En un individuo determinado, cifras elevadas de tioéteres pueden indicar que realmente existe exposición, o bien que el individuo posee un buen sistema de detoxificación. Por otra parte, cifras bajas de tioéteres reflejan una escasa exposición, o bien una mermada capacidad

detoxicadora. Esto último hace que los sujetos sean etiquetables como de alto riesgo, a pesar de tener cifras bajas de tioéteres.

Aun siendo los tioéteres el producto final de un proceso de detoxicación, existen algunos conjugados del glutatión que poseen propiedades mutagénicas, son tóxicos para el riñón²⁰⁵ o pueden unirse a macromoléculas. Las actividades tóxicas parecen residir en la formación de tioles reactivos^{49,193}.

De cualquier forma, se trata de situaciones excepcionales. En definitiva, niveles altos de tioéteres en un grupo de individuos indican, sin duda, una elevada exposición interna a agentes electrofílicos resultantes de una elevada exposición ambiental o externa. Asimismo, dentro de un grupo altamente expuesto ambientalmente, el hallazgo de algún valor individual bajo, sugiere una menor capacidad de detoxicación y, por consiguiente, un mayor riesgo individual.

1.5.5.2 TIOÉTERES URINARIOS COMO INDICADOR BIOLÓGICO DE CONTAMINACIÓN INTERNA.

El grado de exposición interna a un xenobiótico está directamente relacionado con el riesgo para la salud. Los indicadores biológicos de contaminación interna serán los que realmente nos indicarán el riesgo de toxicidad, teniendo en cuenta la cantidad real de absorción y de metabolización del compuesto extraño dentro del organismo.

Esta contaminación interna es el resultado de la intensidad de la exposición menos la capacidad detoxicante del sujeto²⁰⁶.

Estos parámetros que valoran la contaminación interna forman parte de un programa de monitorización biológica que

incluye, aparte de exámenes enzimáticos²⁰⁷, controles de concentraciones del compuesto o de sus metabolitos en sangre, orina o aire aspirado²⁰⁸. En este sentido, la monitorización puede jugar un papel importante en la prevención de la toxicidad.

1.6 TESTS BACTERIANOS EN LA DETECCIÓN DE MUTÁGENOS.

El hecho de que ciertos agentes presentes en el medio ambiente, tanto físicos como químicos, incrementen la incidencia de cáncer, ha cobrado un gran interés. Se hace necesario el desarrollo de técnicas encaminadas a la detección de dichos agentes, con el fin de limitar la exposición del hombre a sustancias cancerígenas.

Se calcula en más de 50.000 productos químicos distintos elaborados por el hombre son de uso comercial e industrial, y que cada año irrumpen en el mercado entre 500 y 1000 productos químicos nuevos, muchos de ellos con propiedades mutagénicas.

Los ensayos habituales efectuados con animales para probar una potencial capacidad cancerígena, son largos y costosos. Se ha propuesto una alternativa que consiste en el uso de bacterias como organismos para el ensayo.

Una de las ventajas de los ensayos bacterianos, es que duran sólo unas pocas horas o días, y resultan más baratos, además de ofrecer un tremendo potencial como medios útiles de preselección de posibles agentes carcinógenos presentes en el medio ambiente²⁰⁹. Tienen el inconveniente de no detectar exposiciones acumulativas, por lo que será necesario complementarlos con otros estudios²¹⁰.

Tres de los ensayos utilizados en la detección de carcinógenos potenciales que revelan la lesión del ADN son el inductest, el mutatest lambda y el test de Ames²¹¹.

De entre las distintas manifestaciones bacterianas de la lesión del ADN, Ames eligió la mutagénesis como base de su trabajo en el desarrollo de un ensayo de sustancias potencialmente carcinógenas²¹². El test diseñado por Ames ha sido el más empleado y el que ha alcanzado mayor difusión. Con dicho test se han llegado a identificar más de 5000 sustancias químicas (Environmental Mutagen Information Center Index, 1982).

1.6.1 TEST DE AMES.

Las bacterias utilizadas para el test pertenecen a una cepa de Salmonella Typhimurium, que requiere histidina y biotina para su crecimiento. Esta cepa es portadora de una mutación (his-) que le impide fabricar uno de los enzimas requeridos para la síntesis del aminoácido histidina. Como consecuencia de esta mutación, la bacteria no puede crecer en un medio nutritivo mineral, a menos que el medio sea complementado con una fuente externa de histidina.

El ensayo se realiza sobre cepas específicas de Salmonella typhimurium. Estas cepas han sido modificadas artificialmente en sus características genéticas, de forma que no pueden sintetizar histidina, aminoácido necesario para su crecimiento. Algunas de estas cepas (TA98, TA1538, TA1537) contienen mutaciones frame-shift, que requieren adición o delección de pares de bases para revertir a la cepa original. Otro tipo de cepas (TA100,TA1535) contienen cambios en un par de bases y su reversión requiere sustitución²¹³.

Estas cepas tienen además mutaciones adicionales que aumentan la sensibilidad a los mutágenos. Tienen el sistema de reparación del ADN lesionado como consecuencia de una mutación específica, carecen del lipopolisacárido de la pared celular, lo que facilita la entrada de sustancias que normalmente quedarían retenidas en las paredes bacterianas.

Algunas de ellas presentan también un factor extracromosómico de resistencia, así las cepas TA98 y TA100 se corresponden con las TA1538 y TA1535, respectivamente. A las primeras se les ha añadido un plásmido que las hace resistentes a la ampicilina²¹⁴. Los mutágenos son pues, sustancias capaces de actuar sobre las cepas modificadas y devolverlas a la situación original.

En ocasiones, puede ocurrir una mutación reversa, restaurándose la secuencia normal en el código del ADN para la enzima requerida. Con esto se restaura el suministro interno de histidina²¹⁵.

La reversión se pone de manifiesto por el crecimiento de colonias en el medio carente de histidina.

El test de Ames se basa en la observación del incremento de colonias revertientes de estas bacterias al exponerlas a un agente mutágeno, frente a las ocurridas espontáneamente, cuya tasa es muy baja²¹⁶.

Resulta de gran interés la adición al medio de cultivo de extracto de hígado de rata preinducida metabólicamente con 3-metil colantreno. Este extracto se denomina fracción microsomal S9 (S9 mix).

Este paso, aporta un sistema de activación metabólica capaz de detectar aquellos mutágenos que, siendo inicialmente inactivos, requieren de dicha activación metabólica para expresar su acción.

1.6.2 MUTAGENICIDAD URINARIA.

La valoración de mutágenos en fluidos orgánicos, se ha propuesto como vía para estimar la exposición individual a mutágenos y carcinógenos ambientales²¹⁷, implicados en

enfermedades genéticas, defectos neonatales y enfermedades cardíacas²¹⁸.

Estos hallazgos indican que el ensayo de mutagenicidad urinaria es útil como método para detectar la exposición a mutágenos ambientales²¹⁹.

Los trabajos llevados a cabo sugieren que el primer paso en la iniciación de la carcinogénesis por sustancias químicas es una mutación del ADN, u otro cambio en la información genética de la célula, y que éste es causado por la reacción del ADN con productos hidrofílicos. Esta reacción ocurre también con otras macromoléculas celulares, aunque los ácidos nucleicos son el blanco crucial²²⁰.

A pesar de la diversidad en su estructura química, la mayor parte de los carcinógenos y mutágenos parecen dar lugar a derivados electrofílicos (compuestos con átomos deficientes en electrones) que reaccionan con centros nucleofílicos (átomos ricos en electrones) presentes en los constituyentes celulares²²¹. La consecuencia es la interacción física del electrofílico con la molécula de ADN y, por tanto, la distorsión de su estructura y función. Algunas de las modificaciones que se pueden producir en el ADN implican mecanismos de intercalación, unión no intercalante, unión covalente y roturas de cadena²²².

Los mecanismos por los que los carcinógenos químicos y/o sus metabolitos participan en el estadio de la carcinogénesis, no son bien conocidos pero pueden depender o no de reactantes electrofílicos²²³

Es importante señalar, que un 35% de los cánceres humanos se deben a la influencia de la dieta^{224,225} y otros factores que pueden pasar inadvertidos en nuestro modo de vida y que actúan como inductores de neoplasias, en relación al 30% correspondiente al tabaco y sólo un 1%, o menos, atribuible a los fármacos²²⁶.

En estudios realizados, se ha comprobado que las sustancias que dañan el ADN (p.e. mutágenos) abundan en la naturaleza y en los alimentos que consumimos, y que tales sustancias son igualmente producidas en nuestro organismo durante los procesos metabólicos^{227, 228}.

1.6.2.1 MUTAGENICIDAD URINARIA CAUSADA POR EL TABACO.

El hábito de fumar se ha extendido ampliamente entre la población, y se ha establecido una relación causal entre consumo de tabaco y cáncer de pulmón, cavidad oral, laringe, esófago y vejiga²²⁹.

El humo del cigarrillo es un conglomerado de compuestos químicos, muchos de ellos genotóxicos y carcinógenos.

El condensado del humo del tabaco es un potente inductor de mutaciones en varios tests a corto plazo. También se ha demostrado que la orina de fumadores contiene sustancias mutagénicas, tanto en ensayos bacteria-nos^{230, 231-232} como eucarióticos²³³.

Los mutágenos o premutágenos presentes en el humo del tabaco incluyen, entre otros, hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados nitroarenos²³⁴, productos de la pirólisis o aminoácidos aromáticos y polipéptidos conteniendo estos aminoácidos. Su contribución en la exposición mutagénica total es difícil de evaluar, ya que el humo del tabaco, aunque ha sido químicamente fraccionado y la mutagenicidad y/o carcinogenicidad de muchos de sus componentes constatada²³⁵, otros muchos compuestos todavía no han sido identificados, porque su metabolismo se produce por muy diferentes vías²³⁶.

El riesgo de lesión celular dependerá del balance entre sistemas bioactivadores (AHH) y sistemas detoxicadores (GST)

(Figura 12). La concentración de TU aumentará cuando existan muchas sustancias mutagénicas y cuando haya una gran actividad del sistema GST. En principio no cabe esperar la presencia en la orina de mutágenos procedentes del tabaco, ya que éstos poseen un alto poder reactivo y, o bien se fijan a los tejidos, o bien se metabolizan, perdiendo su poder mutágeno directo. Los premutágenos urinarios serán los representantes directos del grado de intoxicación tabáquica. Ante un gran consumo de cigarrillos, una cifra baja de premutágenos puede indicar una gran actividad del sistema AHH, y por tanto, ser un índice de riesgo elevado²³⁷.

Muchos de los mutágenos excretados necesitan activación mutagénica (S9)²³⁸, pues la frecuencia mutagénica es mucho menor en ausencia de enzimas microsomales, y de una cepa sensible y asequible, como es la *Salmonella typhymurium*, y de ellas la TA98 es con la que más se trabaja, por dos razones: es la de mayor sensibilidad en la orina de fumadores y en el condensado del humo del tabaco²³⁹.

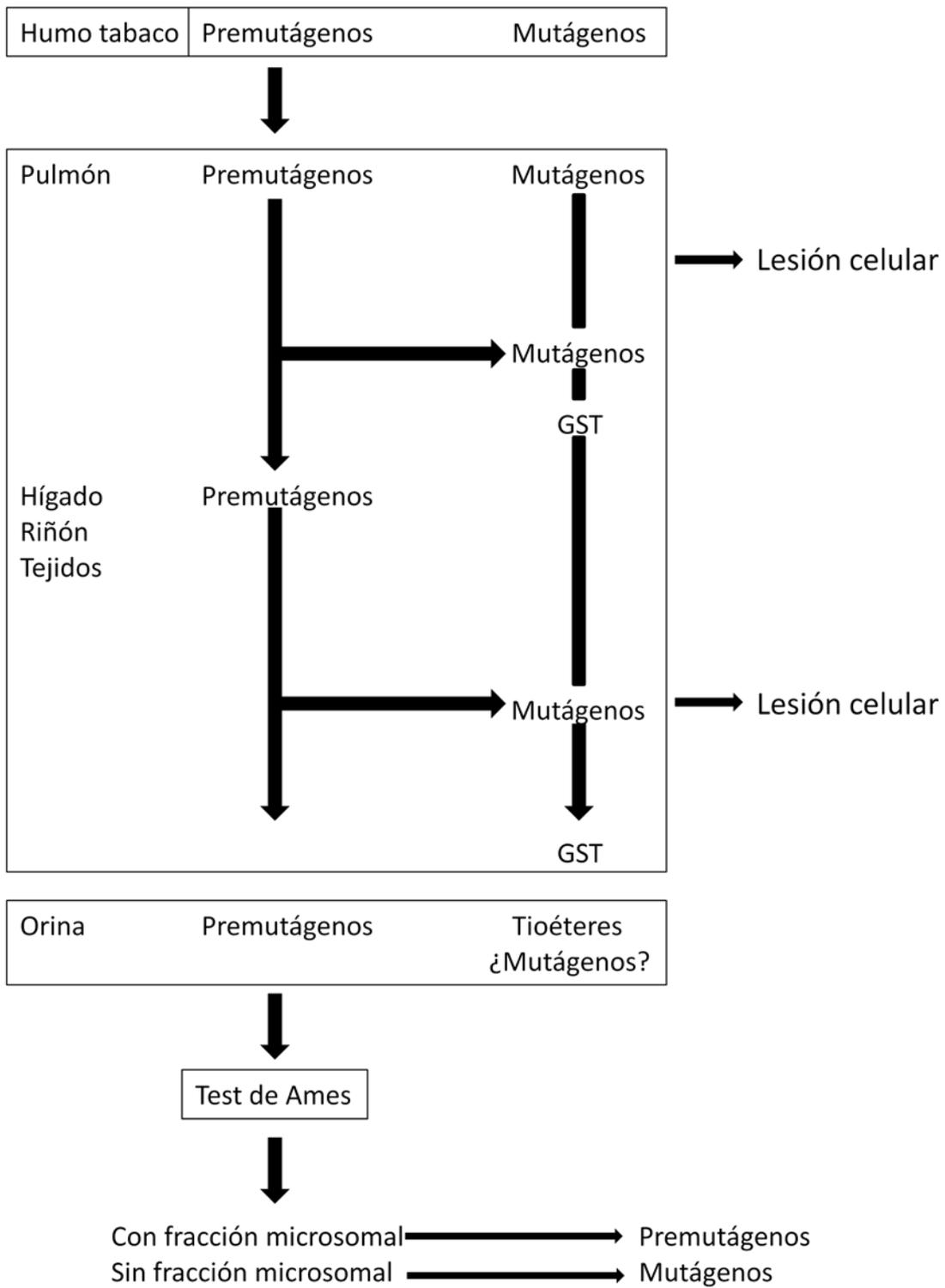


Figura 12. Esquema de la toxicidad y vías de detoxificación del humo del tabaco.

1.7 FARMACOGENÉTICA. VARIACIONES EN EL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.

Se consideran xenobióticos aquellas sustancias de origen biológico endógenas o exógenas que no intervienen como fuente de energía ni como elemento estructural.

La capacidad de eliminación de medicamentos u otros xenobióticos depende de factores genéticos y ambientales²⁴⁰. En una población normal, existe una amplia variación interindividual en el metabolismo y eliminación de muchas sustancias, así como en su respuesta farmacológica.

Se han llevado a cabo numerosos trabajos acerca de la influencia ambiental, conociéndose pocos datos en la actualidad sobre la regulación genética²⁴¹.

Los primeros estudios realizados con vistas a determinar la influencia genética que produce esas variaciones en la metabolización de fármacos, fueron llevados a cabo por Hughes et al.²⁴² en 1954, y posteriormente por Evans et al.²⁴³ en 1960, sobre la N-acetilación de isoniacida. Sin embargo, no fue hasta 1975 cuando se demostró el polimorfismo genético para el metabolismo oxidativo²⁴⁴.

La farmacogenética estudia las variaciones en la respuesta a los fármacos y otros sustratos, causadas por influencias hereditarias, esto es, codificadas genéticamente, con un control monogénico y transmisión mendeliana²⁴⁵.

Las diferencias farmacogenéticas de tipo farmacocinético, se deben a cambios en una enzima que controla el metabolismo de un fármaco. En estos casos puede producirse el acumulo de dicha sustancia, lo que causa toxicidad, o por el contrario ineficacia. La acumulación y la toxicidad se deben a efectos transmitidos genéticamente y

disminuyen la conversión de la sustancia activa en metabolitos inactivos²⁴⁶.

Las diferencias fenotípicas pueden ser expresadas farmacogenéticamente en términos de concentraciones plasmáticas del fármaco, relación entre el fármaco y sus metabolitos (índice metabólico), aclaramiento y vida media del fármaco²⁴⁷.

La actividad de una serie de enzimas que participan en el metabolismo de los xenobióticos, es regulada monogénicamente²⁴⁸ y exhibe un polimorfismo genético; es decir, diferentes alelos de un mismo gen pueden afectar el funcionamiento de una enzima, y por ello, afectar a la capacidad de una vía metabólica de fármacos o sustancias químicas ambientales.

De estas enzimas podemos citar la paraoxonasa²⁴⁹, alcohol y aldehído deshidrogenasa^{250, 251}, N-acetiltransferasa²⁵² y ciertas oxidasas de función mixta²⁵³.

A continuación se describen con más detalle dos tipos de polimorfismo genético: acetilador y oxidativo.

1.7.1 POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA ACETILACIÓN.

La acetilación es una reacción de conjugación (biotransformación de fase II), mediante la cual el hígado interviene en la detoxicación de ciertas sustancias. Dicha reacción consiste en la incorporación de un radical acetilo a los radicales amino o carboxilo de los fármacos, mediante la acción de acetiltransferasas (N-acetiltransferasa) y la intervención de derivados del coenzima A (CoA-SH)²⁵⁴.

La importancia de este polimorfismo, en el hombre, se debe a que la N-acetilación es un importante paso metabólico en la biotransformación de un grupo de fármacos y de varias

aminas aromáticas carcinógenas, como es el caso del 2-aminofluoreno, la benzidina y la β -naftilamina (presente en el humo del tabaco)²⁵⁵ y algunas de las aminas biógenas como la serotonina²⁵⁶.

El estado acetilador de un individuo, determinado genéticamente, tiene un importante significado, tanto farmacocinético como toxicológico, ya que la frecuencia de una variedad de efectos secundarios a fármacos se ha demostrado que son dependientes del fenotipo o genotipo acetilador²⁵⁷. Es por esto que el conocimiento de dicho fenotipo puede ayudar a determinar el riesgo relativo de toxicidad de algunos fármacos y su respuesta terapéutica.

La isoniacida (INH) ha sido durante mucho tiempo, y sigue siendo, uno de los antituberculosos de primera línea, ya sea en el tratamiento de la primoinfección o en las formas activas de la enfermedad. Su principal vía de metabolización es la acetilación mediante el enzima N-acetiltransferasa²⁵⁸, por ello se emplea con mucha frecuencia en el estudio del fenotipo acetilador. Una forma de expresar la actividad de la N-acetiltransferasa hepática consiste en medir el porcentaje de acetilisoniacida (%AcINH)²⁵⁹

Dicho porcentaje está basado en el cociente entre:

A: Isoniacida acetilada por el individuo

B: Isoniacida acetilada total

$$\% \text{ Ac INH} = \frac{A}{B} \times 100$$

En función a este valor, podemos dividir a la población en acetiladores lentos, cuando el porcentaje es menor del 70% y en acetiladores rápidos, cuando es mayor.

Genéticamente, los acetiladores lentos son homocigotos para un gen autosómico recesivo (rr) y los acetiladores rápidos pueden ser de dos tipos: heterocigotos (Rr) u

homocigotos (RR) para el alelo dominante²⁶⁰.

Estas diferentes velocidades de acetilación de los individuos dan lugar a una distribución bimodal²⁶¹, quedando los acetiladores intermedios englobados con los rápidos.

La trascendencia clínica de este hallazgo es importante, pues los acetiladores lentos tienen mayor incidencia de efectos adversos que los rápidos, en los que tiene lugar el fallo de respuesta terapéutica como efecto indeseable²⁶². Todo esto nos lleva a que es necesario un ajuste de las dosis en el enfermo, incrementándolas en los rápidos y reduciéndolas en los lentos²⁶³.

1.7.2 DISTRIBUCIÓN ÉTNICA DE LA CAPACIDAD ACETILADORA.

Evaluaciones cuantitativas de grandes poblaciones demuestran que el fenotipo acetilador presenta una distribución bimodal en dos grupos bien diferenciados: acetiladores lentos y acetiladores rápidos²⁶⁴.

La distribución del fenotipo acetilador presenta importantes variaciones raciales, que oscilan entre un 18% de acetiladores rápidos en egipcios y un 95-100% en esquimales y casi un 90% en japoneses. En la raza blanca hay un ligero predominio de acetiladores lentos^{265,266}, que es algo más marcado en la raza negra²⁶⁷. En la Tabla 4 se muestra la frecuencia del FAR en relación a su origen étnico.

Tabla 4. Distribución del fenotipo acetilador según el origen racial (modificado de Clarck, 1985).

A) <u>Origen asiático</u>		C) <u>Origen europeo</u>	
Esquimales canadienses	95-100 %	Latinoamericanos	67 %
Polinesios (Nueva Zelanda)	93 %	Italianos	51 %
Coreanos	89 %	Blancos USA	43-48 %
Japoneses	88-90 %	Noruegos	44 %
Ainu	87 %	Alemanes	43 %
Ryukyuan	85 %	Franceses	41 %
Lapones finlandeses	80 %	Griegos USA	40 %
Esquimales de Alaska	79 %	Checoslovacos	40 %
Indios americanos	79 %	Suizos	39 %
Chinos	78-95 %	Británicos	38-47 %
Tailandeses	72 %	Fineses	36-39 %
Filipinos	72 %	Italianos USA	36 %
Indios canadienses	63 %	Escandinavos USA	33 %
Birmanos	62 %	Suecos	32-49 %
Lapones suecos	50 %	Canadienses	0-42 %
Hindúes	40 %	Españoles	43 %
B) <u>Origen africano</u>		D) <u>Origen mediterráneo</u>	
Negros surafricanos	59 %	Judíos Askenazi USA	45 %
Negros americanos	49-58 %	" " Israel	33 %
Africanos	43-51 %	Israel no Askenazi	31 %
Negros sudaneses	35 %	Judíos Israel.Bagdad	25 %
Negros etíopes	20-50 %	Egipcios	18 %
		Marroquíes	10 %

En el caso concreto de la población española, el 57,3% de individuos son acetiladores lentos, y el 42,7% acetiladores rápidos, según los estudios efectuados por Ladero et al.²⁶⁸, si bien hay que destacar que existe una cierta variación en la frecuencia del fenotipo acetilador según regiones²⁶⁹ que, como podemos ver en la Tabla 5, oscila entre un 15 a un 43% de acetiladores rápidos. El porcentaje

de acetiladores lentos viene dado por exclusión de los rápidos.

Tabla 5. Distribución del fenotipo acetilador en distintas regiones españolas.

REGION	Nº CASOS	RAPIDOS %	SUSTANCIA TEST
Andalucía Occidental	58	43	Sulfadimidina
Andalucía Oriental	208	33,5	Sulfadimidina
Cataluña	726	15	Isoniazida
País Vasco	310	35	Sulfadimidina
Aragón	176	38,6	Isoniazida

1.7.3 MECANISMOS BIOQUÍMICOS: N-ACETILTRANSFERASA.

La N-acetilación está mediada por la N-acetiltransferasa (NAT), enzima citoplasmática que tiene un peso molecular aproximado de 27.000, que se encuentra fundamental aunque no exclusivamente en el hígado, ya que también se encuentra a nivel del intestino delgado²⁷⁰ y es responsable de la acetilación de las aminas aromáticas. También se ha detectado en linfocitos, en los cuales parece existir un polimorfismo acetilador semejante al hepático²⁷¹. La actividad de la enzima es unas ocho veces mayor en los acetiladores rápidos que en los lentos²⁷².

En un principio se pensó que el déficit de actividad NAT de los acetiladores lentos podría deberse a una disminución cuantitativa del enzima y no a una modificación de su afinidad²⁷³. Posteriormente se señaló que no había correlación entre la velocidad de acetilación y la dotación cuantitativa del enzima, que parece ser similar en ambos fenotipos²⁷⁴. Se considera que el hígado de un sujeto dispone

de un solo tipo de NAT, encargado de ambas modalidades de acetilación, y que el polimorfismo para determinados sustratos dependería de una configuración molecular específica del enzima, determinada genéticamente, que permite procesar de forma más o menos rápida tales sustratos y así otorgar el rasgo fenotípico de acetilador rápido o lento²⁷⁵.

Recientemente se han identificado dos proteínas acetiltransferasas en humanos, la NAT1 y la NAT2, localizadas en el cromosoma 8^{276,277}. Estos datos apuntan a que una carencia o disminución de ambas moléculas enzimáticas son las responsables de una deficiente acetilación²⁷⁸.

La NAT polimórfica no es una enzima inducible²⁷⁹, su actividad no parece decrecer significativamente con la edad; si bien, para algunos autores, este enzima puede verse influido por factores ambientales, por la edad y sexo^{260,280,281}.

El tabaco no tiene efecto inductor sobre la acetilación de la sulfametacina y probablemente no afecta a la acetilación de los fármacos en general²⁸².

La actividad de la NAT se mantiene estable durante toda la vida²⁸³, siendo preciso un profundo deterioro de la función hepática para que su actividad disminuya²⁸⁴.

1.7.4 DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO ACETILADOR.

Existen numerosos procedimientos y sustancias que nos permiten determinar el fenotipo acetilador de un individuo. Estos métodos incluyen determinaciones químicas, microbiológicas, fluorométricas y distintos tipos de técnicas cromatográficas.

En nuestro estudio hemos analizado isoniacida según la técnica de Jessamine et al²⁸⁵, que será comentada con mayor detalle en el apartado dedicado a material y métodos.

Un método sencillo que posiblemente será de gran utilidad en el futuro es el desarrollado por Grant et al (1984) con cafeína²⁸⁶. Tras la administración de cafeína en forma de café, té o cola, se recoge la orina durante el período comprendido entre la 2ª y 6ª horas de la misma, y en ella se mide por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) el cociente entre el metabolito AFMU (5 acetilamino-6 formilamino- 3 metiluracilo) y la 1-metilxantina. Este método ha permitido apreciar una frecuencia de distribución trimodal, midiendo la fracción molar de los metabolitos, lo que probablemente sea de utilidad para discriminar los acetiladores rápidos en homo y heterocigotos²⁸⁷.

1.7.5 IMPLICACIONES CLÍNICAS DEL POLIMORFISMO DE LA N-ACETILTRANSFERASA.

Diversos fármacos sufren acetilación hepática polimórfica, de forma que la posesión de un determinado fenotipo acetilador puede tener trascendencia clínica y/o terapéutica. Ver Tabla 6.

1.7.5.1 FENOTIPO ACETILADOR Y RESPUESTA A FÁRMACOS.

La respuesta terapéutica a algunos fármacos parece estar disminuida en acetiladores rápidos con respecto a los acetiladores lentos, por lo que es necesario aumentar la dosis de dichos fármacos en los primeros.

Tabla 6. Sustancias sometidas a acetilación hepática polimórfica (tomado de Weber y Hein, 1985 y Ladero, 1984).

A) FÁRMACOS ARILAMÍNICOS Y METABOLITOS HIDRACÍNICOS.

Procainamida
Dapsona
Aminoglutetimida
P-aminosalicílico
P-aminobenzoico

B) FÁRMACOS HIDRACÍNICOS.

Isoniacida (INH)
Monoacetilhidracina (MAH)
Hidralacina
Fenelcina

C) ARILAMINAS SECUNDARIAS Y METABOLITOS HIDRACÍNICOS.

Sulfasalacina (salicilazosulfapiridina)
Sulfametacina
Nitrazepam y Clonazepam (tras nitroreducción)
Acetobutolol
Cafeína

D) MUTÁGENOS, ARILAMINAS Y CARCINÓGENOS.

Benzidina
Alfa y Beta-naftilaminas
4-aminobifenil
metilen-bis-cloro-anilina (MOCA)
2-aminofluorano

- Isoniacida.

Su principal vía de metabolización, aunque no la única, es la acetilación. La toxicidad de la isoniacida se ha vinculado a la acetilisoniacida. Este derivado se forma en mayor cantidad en acetiladores rápidos que en lentos.

La acetilisoniacida se metaboliza convirtiéndose en monoacetilhidracina (MAH). Este metabolito puede seguir dos vías: o bien sufrir una segunda acetilación (mediada por la NAT polimórfica) y transformarse en diacetilhidracina (DAH) atóxica, o ser activado en el hígado por el sistema de monooxigenasas del citocromo P-450, dando lugar a un metabolito reactivo hepatotóxico, capaz de unirse a las proteínas citoplásmicas mediante enlaces covalentes y alterar su función^{288,289,290}. La relación del fenotipo acetilador con el desarrollo de **hepatitis** por isoniacida (INH) ha sido un tema muy debatido. El mecanismo tóxico no está aclarado. Diversos estudios^{291,292} han encontrado un predominio de acetiladores rápidos, elaborando la hipótesis de que los acetiladores rápidos formaban monoacetilhidracina (MAH) con más rapidez que los acetiladores lentos. Según esta hipótesis patogénica, la MAH se convertiría, a su vez, en un metabolito hepatotóxico por hidroxilación en el sistema citocromo P450, por lo que los individuos con FAR presentarán un riesgo "teórico" más elevado. Esta hipótesis fue cuestionada en posteriores estudios^{293,294} al demostrarse que, tanto los acetiladores rápidos como los lentos, excretaban proporciones similares de MAH, siendo la exposición a este compuesto de la misma intensidad en ambos. La rápida formación de MAH es compensada por la rápida conversión a DAH y excreción en los acetiladores rápidos.

El consumo de alcohol, el tratamiento concomitante con inductores del metabolismo hepático (fenobarbital, esteroides, rifampicina,...) o la presencia de una lesión hepática preexistente, aumentan el riesgo de hepatitis por INH.

En cuanto a la **neuritis periférica** producida por isoniacida, es más frecuente en acetiladores lentos sometidos a tratamientos prolongados^{275,290}. La aparición de esta complicación se evita con la administración de una pequeña cantidad de vitamina B₆.

No hay evidencia manifiesta de que el estado acetilador tenga valor en la inducción de **Lupus eritematoso diseminado** (LES) en pacientes tratados con INH, si bien se ha encontrado con mayor frecuencia en FAL²⁹⁵

- Procainamida.

Tras la toma de este fármaco antiarrítmico por vía oral, más del 85% de la dosis es acetilada en N-acetilprocainamida por la N-acetiltransferasa. La actividad farmacológica de la N-acetilprocainamida es controvertida. Un estudio ha demostrado que es un inhibidor competitivo de la procainamida²⁹⁶; sin embargo, otros autores (la mayoría) opinan que la N-acetilprocainamida posee una actividad farmacológica semejante a la procainamida, aunque más débil²⁹⁷.

Para una misma dosis, los acetiladores rápidos tienen un nivel de procainamida más bajo y de N-acetilprocainamida más alto que los acetiladores lentos. En la práctica, los acetiladores lentos requerirían una dosis algo menor que los rápidos²⁹⁸.

La procainamida induce la positivización de anticuerpos antinucleares tanto a nivel experimental como en el hombre²⁹⁹, así como el desarrollo de LES³⁰⁰ con mayor frecuencia y precocidad en acetiladores lentos que en rápidos³⁰¹, si bien Davies et al³⁰² observaron una mayor presencia de anticuerpos antinucleares en acetiladores rápidos, en pacientes tratados con procainamida.

- Hidralazina.

El metabolismo de este fármaco, vasodilatador periférico, se caracteriza por un primer paso dependiente de la actividad de la N-acetiltransferasa, es decir, se inactiva por la acetilación. La disponibilidad sistémica de

la hidralazina varía entre un 10-15% en los acetiladores rápidos y un 30-35% en los lentos.

Como existen varias vías independientes para la eliminación de la hidralazina circulante, la vida media de circulación no está influenciada por el fenotipo acetilador.

Para mantener una respuesta hipotensiva adecuada en los acetiladores rápidos se necesita una dosis de hidralazina mayor que en los lentos³⁰³, los cuales, con una posología fija de 200 mg/día obtienen un buen control de su presión arterial.

Sin embargo, parece que la utilización de la hidralazina en tratamientos combinados, situación muy frecuente, no existe ninguna diferencia entre la respuesta terapéutica de los acetiladores rápidos y la de los lentos³⁰⁴.

En cuanto a la aparición de reacciones adversas, los acetiladores lentos de hidralazina tienen mayor tendencia a desarrollar anticuerpos antinucleares y LES³⁰⁵, especialmente los sujetos con antígeno HLA-DR4³⁰⁶.

- Sulfasalacina o salazosulfapiridina.

Este fármaco es un antiinflamatorio utilizado principalmente en el tratamiento de la colitis ulcerosa. Tras una toma oral, el 70% de la dosis de sulfasalacina alcanza el colon, donde es escindido en ácido 5-aminosalicílico, principio activo, y en sulfapiridina, principal responsable de los efectos indeseables. La sulfapiridina es parcialmente detoxificada por una acetilación dependiente de la N-acetiltransferasa. La vida media de eliminación de la sulfapiridina es dos veces más larga en los acetiladores lentos que en los rápidos (de 10 a 16 horas en los primeros frente a 6 horas en los rápidos), y, a una

misma dosis de sulfasalacina, los acetiladores lentos tienen concentraciones de sulfapiridina dobles que los acetiladores rápidos³⁰⁷.

La mayoría de los efectos indeseables (nauseas, anemia hemolítica, metahemoglobinemia, leucopenia, cianosis), son debidas a una concentración plasmática de sulfapiridina muy elevada (mayor de 50 mg/l) y aparecen principalmente en los acetiladores lentos. Todo esto sugiere que ha de adaptarse la posología según el fenotipo: de 2 a 3 gr/día para los acetiladores lentos y de 4 a 6 gr/día para los acetiladores rápidos.

- Otros medicamentos.

La N-acetiltransferasa metaboliza otras muchas sustancias. No obstante, en la mayor parte de los casos, el polimorfismo de la acetilación no tiene consecuencias clínicas demostradas en los tratamientos, bien sea por una vía metabólica alternativa o por el gran margen terapéutico de estos medicamentos.

Existe la posibilidad de que los acetiladores lentos deficientes en glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa presenten crisis hemolíticas cuando sean tratados con dapsona o sulfadimidina.

1.7.5.2 FENOTIPO ACETILADOR Y ENFERMEDAD.

La diabetes mellitus tipo I, el lupus eritematoso sistémico y, sobre todo, el urotelioma vesical debido a exposición ocupacional a aminas aromáticas carcinógenas, son los candidatos más firmes a guardar relación con uno u otro fenotipo³⁰⁸.

- Diabetes mellitus.

Los primeros estudios realizados sobre el fenotipo acetilador en diabéticos insulino-dependientes fueron realizados por Mattila y Tiitinen³⁰⁹, que encontraron un predominio no significativo de acetiladores rápidos entre estos pacientes.

Estudios posteriores han obtenido resultados similares^{310,311}, de lo cual se sugiere que el fenotipo acetilador rápido podría ser un marcador genético de diabetes insulino-dependiente, al menos en los grupos étnicos de origen europeo, ya que en diabéticos saudíes se ha detectado un predominio de acetiladores lentos³¹². Un estudio reciente llevado a cabo en niños diabéticos entre 5-15 años no mostró una asociación significativa con uno u otro fenotipo y dicha enfermedad³¹³.

En lo que respecta a la diabetes tipo II (no insulino-dependiente), no se ha detectado un predominio claro de acetiladores rápidos^{275,310}, lo cual permite concluir que el fenotipo acetilador no es buen marcador genético de la diabetes no insulino-dependiente.

- Lupus eritematoso sistémico.

Existe una gran controversia en la literatura sobre la posible relación entre el fenotipo acetilador y el LES idiopático.

Reidenberg y Martin (1974) fueron de los primeros en encontrar una incidencia mayor de lo normal de acetiladores lentos entre los pacientes afectos de LES idiopático³¹⁴, basándose en el posible papel etiológico que juegan diversas aminos ambientales, que tras ser transformadas en compuestos aromáticos aminados, persistirían más tiempo en los acetiladores lentos.

Estudios posteriores^{315,316} han encontrado un predominio del fenotipo acetilador lento en estos enfermos, aunque en otros estudios no se ha llegado a confirmar el predominio de uno u otro fenotipo^{317,318,319}.

Tampoco el polimorfismo acetilador parece representar ningún riesgo para el desarrollo de lupus eritematoso discoide cutáneo.

- Otras enfermedades.

En la **enfermedad de Gilbert** se ha demostrado un predominio significativo de acetiladores lentos en los enfermos respecto a los controles^{320,321}.

En la **enfermedad de Graves Basedow** no se han encontrado diferencias significativas con la población general, aunque se ha señalado que la edad de comienzo de dicha enfermedad es más precoz en acetiladores lentos³²².

En la **artritis reumatoide** no se ha demostrado una asociación significativa con uno u otro fenotipo, aunque parece haber un predominio de acetiladores lentos en pacientes con artritis reumatoide asociada a síndrome de Sjögren³²³.

En la **enfermedad de Parkinson** tampoco se ha encontrado relación con el fenotipo acetilador³²⁴.

Finalmente, en la **lepra**, un estudio realizado en chinos (población en la que hay mayoría de acetiladores rápidos) demostró un predominio de acetiladores lentos, hallazgo no confirmado en otros estudios³²⁵.

- Cáncer de vejiga.

El cáncer de vejiga es la neoplasia más estrechamente estudiada a propósito de la posible influencia que el fenotipo acetilador podría tener en la carcinogénesis.

El cáncer de vejiga es una de las neoplasias más frecuentes en el hombre en los países industrializados. Se considera que del 20 al 40% de los uroteliomas se deben a exposición ocupacional a aminas aromáticas (industria química, colorantes,...), es decir, son inducidos por ellas, aunque también existen otras muchas sustancias carcinógenas³²⁶

Un porcentaje similar se relaciona con el consumo de tabaco, donde se ha detectado la presencia de pequeñísimas cantidades de α y β -naftilaminas³²⁷.

La importancia de que un individuo presente un tipo de fenotipo u otro radica en que las aminas aromáticas, que en principio no son cancerígenas, sufren una hidroxilación hepática y posterior glucuronización. Este glucurónido, cuando alcanza la luz vesical, a pH ácido, sufre una hidrólisis y libera así un radical muy activo (ión arilnitrenio) que actúa como carcinógeno, reaccionando con el ADN urotelial e iniciando la carcinogénesis^{327, 328}.

Esto nos conduce a pensar que la oxidación es un requisito para la actividad carcinogénica y mutagénica de los grupos amino-aromáticos^{329, 330}, y que la acetilación no interviene en la activación de los carcinógenos vesicales, sino más bien parece representar una acción "defensiva", en la medida en que la mayor actividad (rapidez) acetiladora disminuiría el número de moléculas de aminas aromáticas que seguirían la vía oxidativa, y por lo tanto los acetiladores rápidos tendrían, teóricamente, menor riesgo de padecer cáncer vesical^{275, 331, 332}.

Es interesante tener en cuenta que una elevada concentración de productos acetilados puede ser el origen de neoplasias hepáticas o mamarias en los individuos que presentan un fenotipo acetilador rápido. Según esta hipótesis, la frecuencia de cánceres vesicales debe ser superior en los fenotipados como acetiladores lentos, ya que los rápidos serían más capaces de reducir las aminas aromáticas no carcinógenas por acetilación. Ver Figura13.

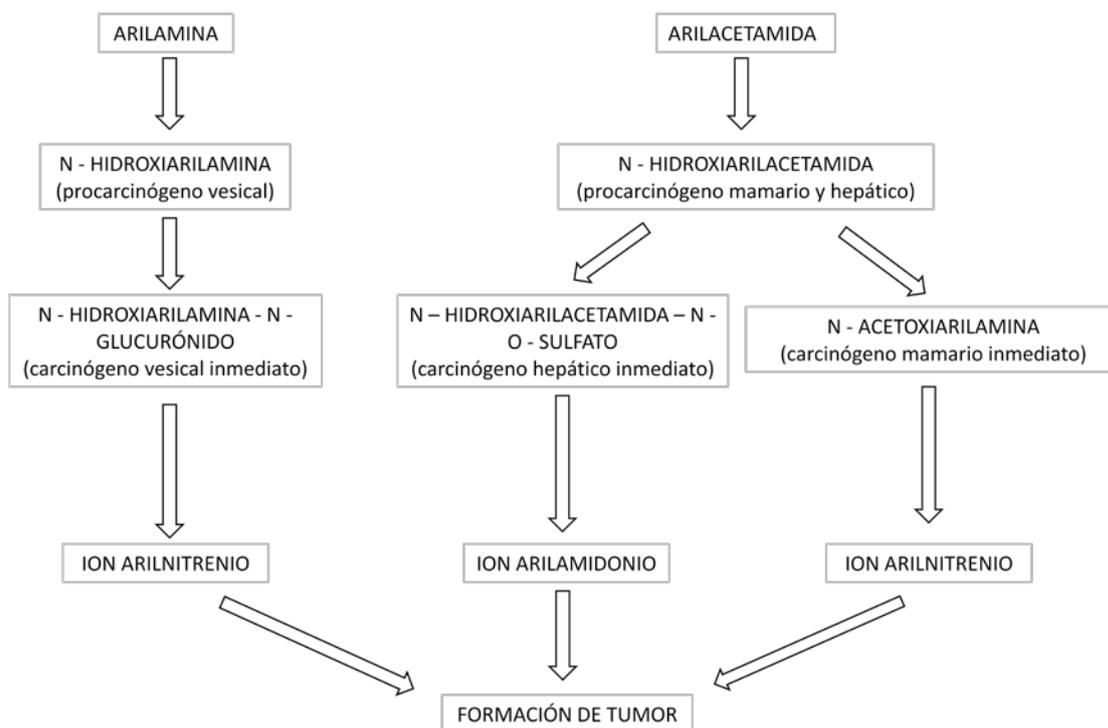


Figura 13. Vías de activación metabólica de arilaminas y arilacetamidas para su transformación en reactantes electrofílicos (según Lower, 1982)

En estudios realizados en pacientes que presentaban cánceres de vejiga no se ha demostrado un predominio de acetiladores lentos en relación a la población general^{333, 334}.

Sin embargo, en el grupo de individuos con cáncer de vejiga expuestos ocupacionalmente a aminas aromáticas, la situación es diferente. Se ha encontrado un claro predominio del fenotipo acetilador lento en éstos, respecto a la población sana^{63, 335, 336, 337, 338}.

- Otras neoplasias.

En el **cáncer de mama**, Bulowskaya et al han encontrado un aumento significativo de acetiladores rápidos entre las pacientes respecto a los controles, así como un aumento general de la capacidad acetiladora en las pacientes con cáncer de mama de ambos fenotipos³³⁹.

Se apuntó como hipótesis que en el proceso de oncogénesis podrían verse involucrados cambios en la actividad de la N-acetiltransferasa y en el fenotipo acetilador. Otros estudios más recientes no demostraron predominio significativo de ningún fenotipo acetilador^{340, 341}.

También en estudios recientes se ha descrito un predominio del fenotipo acetilador lento en **cáncer gástrico**³⁴².

No se han descrito diferencias significativas en **linfomas**.

En el **cáncer de colon** se ha sugerido que la actividad acetiltransferasa puede jugar un papel en la carcinogénesis intestinal inducida por aminas aromáticas^{343, 344}. La mucosa colónica posee una acetiltransferasa capaz de catalizar la O-acetilación de N-hidroxi metabolitos, que se convierten a su vez en derivados reactivos con el DNA que podrían iniciar el cáncer colorrectal, encontrándose una proporción significativamente mayor de acetiladores rápidos en estos pacientes. Otros autores, en nuestro país, no encuentran esta relación entre el cáncer colorrectal y el polimorfismo acetilador³⁴⁵, quizá debido a diferencias dietéticas³⁴⁶.

En el **cáncer de pulmón**, aunque se sabe que está asociado con las aminas carcinógenas contenidas en el humo del tabaco y que estas aminas aromáticas son polimórficamente acetiladas en el hombre, no se ha

encontrado asociación entre ninguno de los fenotipos y el cáncer de pulmón³⁴⁷. Tampoco se ha encontrado relación entre la distribución de los fenotipos y los diferentes tipos histológicos de cáncer de pulmón³⁴⁸.

En la Tabla 7 podemos ver un resumen del fenotipo acetilador sobre la respuesta a algunos fármacos y su posible relación con algunas enfermedades³⁴⁹.

Tabla 7. Fenotipo acetilador: toxicidad farmacológica y enfermedades relacionadas.

A) Acetiladores lentos

1. Formación precoz de anticuerpos antinucleares durante el tratamiento con procainamida.
2. LES más precoz y frecuente tras la exposición a procainamida, hidralazina o isoniacidas.
3. Mayor frecuencia de cianosis, hemólisis y reticulocitosis por salazosulfapiridina.
4. Mayor frecuencia de polineuropatía por isoniazida.
5. Mayor frecuencia de efectos colaterales al asociar isoniacida y fenitoína.
6. Mayor riesgo de hemólisis por dapsona en caso de déficit de G-6-P-deshidrogenasa.
7. Mayor riesgo de cáncer de vejiga y de estómago.

B) Acetiladores rápidos.

1. Mayor frecuencia de hepatitis por isoniacida (dudoso).
 2. Mayor frecuencia de fallo terapéutico por isoniacida.
 3. Mayor riesgo de diabetes insulín-dependiente.
 4. Mayor riesgo de cáncer de mama y leucemia (dudoso).
-

1.8 POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA OXIDACIÓN. GENERALIDADES.

Todo ser vivo se encuentra en contacto con los compuestos lipofílicos, que o bien son producidos por el propio organismo (hormonas esteroides, ácidos grasos,...) o bien son productos exógenos (polución, gases industriales, tabaco,...), absorbidos voluntaria o involuntariamente (medicamentos, aditivos alimenticios,...).

La mayor parte de estos compuestos, así como los fármacos, son sustancias hidrófobas que, de no existir enzimas de biotransformación, impregnarían indefinidamente el organismo. Las enzimas encargadas de realizar esta transformación se encuentran principalmente en el hígado y, en menor proporción, en otros tejidos.

Las reacciones metabólicas que sufren los fármacos se pueden dividir en dos fases:

- Fase I: procesos de oxidación, reducción e hidrólisis, resultando metabolitos que podrán ser más activos que la molécula madre, menos activos o inactivos (activación o inactivación de fármacos). Incluye reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, etc.

- Fase II: procesos de conjugación o síntesis que casi siempre inactivan al fármaco y facilitan su excreción. Aquí se incluyen reacciones de glucuronidación, metilación, sulfatación, acetilación, conjugación con GSH, etc.

Los productos resultantes tienden a ser compuestos polares hidrosolubles y por tanto fácilmente excretables por la orina y bilis. Las reacciones de fase I crean un grupo reactivo funcional en la molécula, la cual se hace más polar y eliminable por el riñón, pudiendo sufrir después reacciones de fase II, las cuales son las verdaderas vías de

detoxicación³⁵⁰, siendo los productos resultantes más polares, excretándose sin ulterior conjugación³⁵¹

1.8.1 SISTEMA OXIDATIVO DEL MICROSOMA HEPÁTICO.

Las reacciones de oxidación son con ventaja las más frecuentes y se realizan en la fracción microsomal del hígado, que se corresponde con las membranas que conforman el REL.

Se requiere que la sustancia a metabolizar sea liposoluble para que pueda penetrar en el retículo endoplasmático y unirse al citocromo P-450, componente primario del sistema de enzimas oxidativas³⁵².

El REL hepático contiene un grupo importante de enzimas oxidativas llamadas "oxidasas de función mixta o monooxigenasas", que requieren para su actividad un flujo de electrones, provenientes de la NADPH, que es canalizado por la NADPH citocromo P-450 reductasa, hasta un complejo formado por el substrato o fármaco con una hemoproteína denominada citocromo P-450^{351,352}.

El citocromo P-450 tiene una amplia especificidad de substrato, catalizando varias reacciones oxidativas.

Las reacciones catalizadas por las oxidasas microsomales de función mixta incluyen: N- y O-desalquilación, hidroxilación de un anillo aromático y una cadena lateral, N-oxidación, N-hidroxilación, formación de sulfóxidos, desaminación de aminas primarias y secundarias y reemplazo de un átomo de azufre por otro de oxígeno (desulfuración).

Un ejemplo de estas funciones es el aumento de la 3- y 4- hidroxilación por parte del humo del tabaco³⁵³ y la 4- hidroxilación de la debrisoquina³⁵⁴.

Tras la acción de este sistema plurienzimático, se producen dos tipos principales de metabolitos eventualmente tóxicos:

- **Electrofílicos:** El citocromo P-450 produce electrofílicos por la oxidación de fármacos, sustancias con capacidad alquilante o arilante, que se unen covalentemente a nucleótidos. El principal nucleófilo es el grupo tiol de la cisteína, componente de macromoléculas, y los grupos SH, OH y NH₂ de proteínas diversas y de ADN y ARN.

- **Radicales libres:** Los metabolitos con un electrón no emparejado son producidos por reacciones oxidativas o reductoras del citocromo. Normalmente, uno o dos electrones son cedidos por las moléculas del NADPH, por una reductasa, a la forma férrica del hemo, que transfiere los electrones al oxígeno enlazado a la enzima. En ausencia de oxígeno, un electrón es cedido directamente por el citocromo P-450 al fármaco³⁵⁵.

1.8.1.1 CICLO CATALÍTICO DEL CITOCROMO P-450.

Las etapas sucesivas de las reacciones de oxidación son las siguientes:

1. El sustrato o xenobiótico (reducido) interacciona con el citocromo P-450 oxidado.
2. El complejo citocromo P-450 + xenobiótico es reducido por un electrón proveniente del NADPH.
3. El complejo citocromo P-450 + sustrato reducido reacciona con el oxígeno molecular para formar nuevamente un complejo oxidado.

4. El complejo se reduce mediante un electrón proveniente del NADPH, vía citocromo b₅.

5. Tiene lugar una reoxidación y se forma oxígeno activo, altamente inestable.

6. Se descompone el oxígeno activado para formar un sustrato oxidado y recuperar el citocromo P-450 en su forma inicial oxidada.

1.8.1.2 FORMAS DEL CITOCROMO P-450.

Uno de los principales puntos de la investigación de los genes P-450 en humanos, se basa en si la variabilidad individual de los niveles de algunas isoenzimas P-450 están asociados con la oxidación variable de algunos fármacos o con una susceptibilidad o resistencia al cáncer inducido por sustancias químicas. Recientes estudios han relacionado al P-450 con un defecto de metabolismo de fármacos, aunque todavía no ha sido claramente relacionado con el cáncer en el ser humano^{356, 357, 358}.

Por otra parte, se ha demostrado que en pacientes con cáncer de pulmón y fumadores, existía predominio de metabolizadores rápidos de debrisoquina³⁵⁹.

El citocromo P-450, así denominado porque cuando se combina con el monóxido de carbono absorbe la luz a una longitud de onda de 450 nm, se encuentra abundantemente a nivel microsomal.

En realidad se trata de un grupo numeroso de isoenzimas o formas P-450 que poseen especificidades superponibles hacia muy diversos sustratos. Este sistema se encarga de metabolizar abundantes productos endógenos, gran numero de fármacos, pesticidas, carcinógenos y sustancias químicas contaminantes del ambiente. Son los mismos productos que

estimulan o favorecen la producción de diversas formas o isoenzimas P-450.

Esta variabilidad de formas expresa un mecanismo polivalente, genéticamente controlado y explica la variabilidad extraordinaria en la capacidad metabolizante que existe entre una especie y otra y, dentro de una especie, entre diversos individuos.

Se conocen numerosos isoenzimas del citocromo P-450. Cada citocromo P-450 es codificado por un gen diferente. Los genes que codifican la síntesis de los diferentes isoenzimas del citocromo P-450, constituyen una auténtica superfamilia que incluye al menos 10 familias de genes y probablemente un total de más de 100 genes y pseudogenes. Estas familias son distinguibles entre sí según el grado de similitud en las secuencias de AA que codifican³⁶⁰. Hasta el momento se conocen en humanos 9 familias diferentes, cada una de ellas designada con números romanos; cada familia tiene varias subfamilias designadas con una letra; cada subfamilia posee genes individuales que codifican enzimas con una similitud de un 36-70%, los cuales se designan con números arábigos. Las familias de I a IV, presentan gran actividad a nivel hepático y catalizan oxidaciones de ácidos grasos, otros esteroides, fármacos y carcinógenos³⁶¹.

La subfamilia IID se ha conocido recientemente. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 22³⁶² (próximo al protooncogén c-cis y al grupo sanguíneo P) y tiene 9 exones. Esta subfamilia incluye dos genes: P-450 db1 y P-450 db2.

Esta subfamilia ha sido purificada en rata³⁶³ y en hígado humano³⁶⁴. Estas enzimas llevan a cabo la oxidación de fármacos como la debrisoquina y el bufuralol tanto en ratas como en humanos. El defecto en la hidroxilación se puso de manifiesto en un 5-10% de los individuos estudiados tras la administración de una dosis subterapéutica de debrisoquina. Esto se debe a la ausencia de la proteína P-450 IID1.

En el género humano se han encontrado 3 genes, dispuestos en tándem, con una similitud entre ellos de un 92-97%³⁶⁵, relacionados con este P-450. El primero de estos genes, denominado IID8, posee varias mutaciones que lo inactivan. El segundo, designado IID7, tiene una delección en una base, que da lugar a una mutación "frame-shift". Y un tercer gen, IID1, que será el que codifica la enzima debrisoquina 4-hidroxilasa.

El P-450 db1 está claramente implicado en la metabolización (vía oxidación) de la debrisoquina, siendo desconocida la función del otro gen. Se sabe que el gen P-450 db1 es polimórfico. Es interesante mencionar que la isoenzima responsable de la hidroxilación de debrisoquina representa menos del 1% del sistema citocromo P-450, de forma que la deficiencia de esta enzima, no ocasiona una deficiencia medible del conjunto del citocromo P-450.

Las familias de genes P-450 I, II y III, metabolizan fármacos y carcinógenos. Algunas de estas enzimas también hidroxilan esteroides como la testosterona, estrógenos y progesterona. La familia genética P-450 IV codifica ácido graso hidroxilasas que metabolizan ácido laurico, palmítico y araquidónico y prostaglandinas.

En la Tabla 8 se reflejan las distintas familias de genes del citocromo P-450, en humanos.

Tabla 8. Familias de genes del citocromo P-450.

FAMILIA I

Inducida por compuestos aromáticos policíclicos.

Localización cromosómica en 15 q 22-qter.

Consta de 2 genes:

P₁450 (hidroxilación de benzopireno).

P₃450 (hidroxilación de 2-acetil-aminofluorano y estrógenos).

FAMILIA II

Subfamilia A

Localización cromosómica en 19q13, 1-13, 3.

Consta de 1 gen:

P-450a (7- α -hidroxilación de testosterona).

Subfamilia B

Inducida por fenobarbital.

Localización cromosómica en cromosoma 19.

Consta de 1 gen:

P-450b

Subfamilia C

Localización cromosómica en cromosoma 10.

Consta de 1 gen:

P-450mp

Subfamilia D

Localización cromosómica en 22q11, 2-qter.

Consta de 2 genes:

P-450-db1 (metabolismo de debrisoquina y fármacos relacionados).

P-450-db2 (función desconocida).

Subfamilia E

Localización en cromosoma 10.

Consta de 1 gen:

P-450j (metabolismo de etanol, anilina, halotano, nitrosaminas, etc).

FAMILIA III

Inducida por esteroides.

Localización cromosómica en 7p.

Consta de 1 gen:

P-450nf

FAMILIA IV

Inducida por clofibrato.

Localización cromosómica desconocida.

Consta de 1 gen:

P-450LA ω (ω -oxidación del ácido láurico).

1.8.2 INDUCCIÓN ENZIMÁTICA DEL METABOLISMO OXIDATIVO.

La inducción de una enzima está regulada por los factores que afectan a su síntesis y a su degradación, bien por aumento de la síntesis o por disminución de la degradación.

El metabolismo de los fármacos puede ser modificado por factores genéticos o ambientales, pudiendo afectar a la velocidad de metabolización.

El polimorfismo oxidativo de debrisoquina depende de la isoenzima db1 del sistema microsomal dependiente del citocromo P-450 (P-450 IID1). Se trata de una isoenzima poco o nada inducible por agentes externos^{366,367}, sin embargo, es susceptible al bloqueo, competitivo o no, ejercido por numerosos fármacos y productos químicos³⁶⁸ como la cimetidina y quinidina. Este hecho debe ser tenido en cuenta a la hora de incluir pacientes para determinación de fenotipo oxidativo.

Hay gran variedad de componentes extraños que tienen esa capacidad (principalmente sobre la oxidación) por un proceso de inducción enzimática. Este proceso comprende un aumento de la síntesis de citocromo P-450 y de la formación de membranas de las células hepáticas que contiene esa enzima produciéndose también esta inducción a nivel de otros órganos (riñón, tracto intestinal, suprarrenal, pulmón, placenta, piel y páncreas), aunque en un grado más limitado.

Los distintos isoenzimas del citocromo P-450 se diferencian entre sí por reacciones inmunoquímicas (se han descrito anticuerpos específicos contra algunos de ellos) y por diferencias en el peso molecular, movilidad electroforética, especificidad sexual y de sustrato (con algunas superposiciones). También existen diferencias en agentes inductores y en el grado de inducibilidad y bloqueabilidad. Más recientemente se han descrito diferencias en las

secuencias de aminoácidos, modificaciones posttranscripcionales a nivel translacional, y en secuencias N y C-terminal.

También se ha visto que, en la rata, la expresión de algunas enzimas disminuye al alcanzar la pubertad; parece ser que la hormona de crecimiento juega un papel importante en la supresión de la expresión de algunas isoenzimas P-450³⁶⁹.

Los productos inductores de las enzimas hepáticas de metabolización de fármacos son de dos tipos principales:

- Los que, como el fenobarbital³⁷⁰ y la rifampicina producen un aumento de la velocidad de metabolización de numerosos fármacos.

- Los que formados principalmente por hidrocarburos policíclicos³⁷¹, como el benzopireno y el metilcolantreno, aumentan la velocidad de metabolización de algunos fármacos, pero también inducen el metabolismo de los carcinógenos.

Por otra parte, algunos esteroides, como la dexametasona³⁷², pueden inducir alguna isoenzima del citocromo P-450 III en humanos, así como el clofibrato (hipolipemiente) induce enzimas microsomales (P-450 IVA1) y enzimas peroxisómicas, produciendo un aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos³⁷³.

El aumento de actividad enzimática se debe a la inducción de la síntesis de citocromo P-450 y citocromo P-450 reductasa y otras enzimas.

El CO y agentes hepatotóxicos inhiben el metabolismo microsomal de los fármacos ya que destruyen el citocromo P450, interfieren en el metabolismo hepático o disminuyen crónicamente la circulación sanguínea hepática.

Algunos hábitos ambientales como el hábito de fumar cigarrillos (benzopireno) pueden inducir algunas vías metabólicas, modificando así la respuesta a los fármacos.

En el tabaquismo predomina la inducción enzimática, probablemente por la acción de los HPA³⁷⁴. El humo de cigarrillos induce la N-demetilación de teofilina, catalizada por un citocromo P-450³⁷⁵.

Los estudios epidemiológicos establecen una fuerte asociación entre el riesgo de padecer cáncer de pulmón y el humo del tabaco, aunque los mecanismos intrínsecos de la carcinogénesis pulmonar permanecen aún sin determinar.

El mayor interés de las investigaciones sobre cáncer de pulmón se basa en el estudio de los sistemas enzimáticos (y su control genético) que metabolizan los HPA, componentes del humo del tabaco, hacia formas activas carcinogénicas³⁷⁶.

En estudios experimentales realizados se sugiere que el consumo de cigarrillos induce enzimas microsomales metabolizantes de fármacos. Entre ellas se encuentra la aril hidrocarbón hidroxilasa (AHH) dependiente del citocromo P-450 IA1, que metaboliza una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos y que, al igual que otras isoenzimas de dicho citocromo, pueden dar lugar a metabolitos no tóxicos y/o productos tóxicos^{52,53}

1.8.3 VARIACIÓN DEL POLIMORFISMO OXIDATIVO ENTRE GRUPOS RACIALES.

El fenotipo metabólico de la debrisoquina está controlado por un sistema monogénico, pero no está influenciado significativamente por factores ambientales ni por la edad.

La oxidación polimórfica de la debrisoquina ha sido

estudiada en varios grupos étnicos. Las frecuencias estimadas de hidroxiladores lentos varían entre 0 y 30 %, si bien tales diferencias pueden deberse a que algunos de los estudios están basados en grupos muy reducidos de individuos³⁷⁷.

La incidencia de metabolizadores lentos de DB en caucasianos está entre el 5 y 10 %, menos del 2 % en egipcios y árabes, siendo la incidencia en nigerianos y ghaneses semejante a la apreciada en caucásicos.

Alrededor del 9% de europeos, norteamericanos, australianos e ingleses blancos presentan un fenotipo hidroxilador lento³⁷⁸, variando ampliamente desde un 1% en árabes a un 31,6% en nativos³⁷⁹ de Hong-Kong residentes en Canadá y a una ausencia de metabolizadores lentos en japoneses. En el caso de la población española, esta frecuencia es del 6,6%, según notificaron Benítez et al.³⁸⁰. Es interesante mencionar que aunque la prevalencia de FHL varía entre grupos étnicos, es siempre minoritaria. Ver Tabla 9.

Probablemente, las diferencias en la capacidad oxidativa entre FHL y FHR de debrisoquina se deban más a una isoenzima diferente con propiedades catalíticas disminuidas, que a una disminución en la cantidad de la isoenzima^{381, 382}.

El polimorfismo oxidativo esparteína/debrisoquina, resulta de las diferencias en la actividad de una isoenzima del citocromo P-450, la P-450 db1 (P-450 IID1)³⁸³.

Tabla 9. Variaciones interétnicas en la prevalencia de metabolizadores lentos homocigotos de debrisoquina. (modificado de Roots y col., 1987)

PAÍS	NºCasos	%Metab.Lentos	AUTORES
Japón	100	0,0	Nakamura et al., 1985
China	269	0,7	Lou et al., 1987
Arabia Saudí	102	1,0	Islam et al., 1980
Tailandia	173	1,2	Wanwimolruk et al., 1990
Egipto	72	1,4	Mahgoub et al., 1979
Americanos negros	106	1,9	Relling et al., 1991
India (Bombay)	147	2,0	Idle & Smith, 1984
Inglaterra	94	3,2	Mahgoub et al., 1977
Finlandia (fineses)	155	3,2	Arvela et al., 1988
Irak	260	3,5	Idle & Smith, 1984
Suecia	757	5,4	Steiner et al., 1988
Ghana	80	6,0	Woolhouse et al., 1979
Canadá (caucasianos)	48	6,3	Inaba et al., 1979
España	377	6,6	Benítez et al., 1988
Inglaterra	145	7,0	Tucker et al., 1977
Americanos blancos	480	7,7	Relling et al., 1991
Nigeria	123	8,1	Mbanefo et al., 1980
Tasmania	152	8,6	Veronese et al., 1991
Finlandia (lapones)	70	8,6	Arvela et al., 1986
Inglaterra	258	8,9	Evans et al., 1980
Alemania	270	10,0	Roots et al., 1987
Canadá (nativos de Hong-Kong)	19	31,6	Inaba et al., 1981

1.8.4 OXIDACIÓN POLIMÓRFICA DE FÁRMACOS.

La oxidación polimórfica mediante la enzima citocromo P-450 fue demostrada claramente con el fármaco antihipertensivo debrisoquina (DB) por Mahgoub et al. en 1977. Este polimorfismo oxidativo de DB se debe a diferencias en la actividad o cantidad de la isoenzima db1 del citocromo P-450³⁸⁴.

Hay dos picos en la distribución de frecuencias en la metabolización de la debrisoquina que representan dos fenotipos distintos: los rápidos y los lentos.

La DB es metabolizada predominantemente por hidroxilación a 4-hidroxidebrisoquina, su principal metabolito, y a 5, 6, 7 y 8 dihidroxidebrisoquina en pequeñas cantidades.

El cociente entre el % de dosis eliminada como DB y el % de dosis eliminada como 4-HDB nos proporcionará el índice metabólico que nos permitirá diferenciar a la población general como metabolizador rápido (FHR) o metabolizador lento (FHL).

Esta determinación se lleva a cabo en una muestra de orina recogida durante las 8 horas siguientes a la toma de una única dosis oral de 10 mg. de DB.

$$RM = \frac{\% \text{ dosis eliminada como DB}}{\% \text{ dosis eliminada como 4 - OH - DB}}$$

Según Mahgoub et al., los FHR presentan una capacidad de oxidación de DB grande y rápida, con índices metabólicos de un rango entre 0.01-1. Los FHL tienen cocientes metabólicos en el rango 18-200. Hay una amplia variabilidad interindividual. La vida media de la DB no difiere en metabolizadores rápidos y lentos, aunque puede existir una diferencia de niveles plasmáticos de 4 veces³⁸⁵. Los FHL pueden presentar tras el tratamiento con DB una toxicidad aguda marcada, con ataxia e hipotensión severa.

Los individuos con FHR eliminan una gran proporción de dosis como metabolito, luego el cociente será pequeño; los que poseen un FHL eliminan una gran cantidad de dosis de forma inalterada y una pequeña cantidad de metabolito, luego el cociente será grande^{386,387}.

FHR < 12,6 → Autosómico dominante
FHL > 12,6 → Autosómico recesivo

Estudios realizados en familias de sujetos de raza caucásica han demostrado claramente que la hidroxilación de la DB y la oxidación de la esparteína están determinadas por dos alelos de un solo gen.

Los individuos con FHL son homocigotos para un gen autosómico recesivo^{381,388,389,390,391} localizado en el brazo largo del cromosoma 22^{362,381}. Por otro lado, los individuos con FHR son homocigotos o heterocigotos para un gen dominante y el grado de dominancia es del 30%^{366,386}.

Se ha demostrado que el metabolismo oxidativo de la debrisoquina, esparteína y otros fármacos³⁹² está regulado por el mismo locus genético y éste está ocupado por un par de alelos autosómicos: D^H para la oxidación rápida y D^L para la oxidación debilitada^{387,393}.

En la actualidad, todavía no es factible discriminar entre homo y heterocigotos³⁹⁴

1.8.5 CONSECUENCIAS TERAPÉUTICAS Y TÓXICAS DEL FH.

La oxidación polimórfica puede dar lugar a importantes consecuencias clínicas. El deficiente metabolismo puede causar una acumulación del fármaco administrado y, por eso, efectos prolongados o más intensos y reacciones adversas dependientes de la concentración. Las consecuencias farmacocinéticas variarán según la importancia de la vía defectuosa (para la eliminación del fármaco), así como de la existencia o no de rutas alternativas de eliminación.

No resulta tan difícil pensar que otros fármacos puedan ser oxidados por la misma forma de citocromo P-450, que la esparteína y debrisoquina, a la vez que otros puedan sufrir

metabolismo oxidativo independiente de la debrisoquina. Ver Tablas 10 y 11.

Tabla 10. Relación de fármacos metabolizados, al menos en parte, por la misma enzima que la debrisoquina.

- Betabloqueantes:	metoprolol timolol bufuralol propranolol oxoprenolol alprenolol labetalol
- Antiarrítmicos:	esparteína N-propilajmalina propafenona flecainida
- Antidepresivos tricíclicos:	amitriptilina nortriptilina desipramina clomipramina imipramina
- Neurolépticos:	perfenacina tioridacina
- Miscelánea:	penicilamina 4-hidroxianfetamina fenformina perhexilina dextrometorfano guanoxano indoramina metoxifenamina encainida codeína tomoxetina captopril amiflamina

Tabla 11. Clasificación de los citocromos P-450 humanos que oxidan fármacos usados en clínica.

Designación del Gen	Fármaco
- P-450 IA2	fenacetina
- P-450 IIC9	mefenitoína diacepán hexobarbital metilfenobarbital alprenolol N-desmetildiacepán
- P-450 IID6	debrisoquina (y otros)
- P-450 IIIA4	nifedipina eritromicina lidocaina midazolán quinidina triazolán ciclosporina A

Es importante tener en cuenta los factores que influyen en los requerimientos de los fármacos usados en la clínica. En ciertos casos puede ser preciso individualizar la dosificación.

- **β -bloqueantes:** el metabolismo de varias sustancias de este grupo está relacionado con el metabolismo oxidativo de la debrisoquina/esparteína. En 1982, Alvan et al., fenotiparon a cuatro individuos con altas concentraciones plasmáticas de alprenolol, metoprolol o timolol y encontraron que todos ellos eran metabolizadores lentos de debrisoquina³⁹⁵.

El control de la α -hidroxilación de metoprolol es polimórfico y se hereda de forma autosómica recesiva el rasgo de metabolizador lento. El control de la angina pectoris y la presión sanguínea puede lograrse con una dosis

diaria de metoprolol en hidroxiladores lentos, mientras que los hidroxiladores rápidos necesitan dosis más frecuentes. En los metabolizadores lentos hay mayor riesgo de toxicidad debido a su mayor concentración en plasma³⁹⁶.

Otros trabajos también confirman esta asociación y sugieren que propranolol también está envuelto³⁹⁷ en dicho metabolismo, siendo corroborados por otros autores que también indican que la oxidación de propranolol a 4-hidroxi-propranolol es deficiente en metabolizadores lentos de debrisoquina^{389,398}. De cualquier modo, el 4-hidroxi-propranolol es también un efectivo β -bloqueante, y ambos grupos de investigadores han demostrado que el efecto logrado, tanto en intensidad como en duración, es similar en ambos fenotipos (metabolizadores rápidos y lentos).

Recientemente ha sido publicado que, en sujetos metabolizadores lentos de debrisoquina y mefenitoina, se produce una disminución en el aclaramiento de propranolol³⁹⁹.

Las consecuencias clínicas del bufuralol en los metabolizadores lentos de debrisoquina implica una mayor toxicidad debido a las altas concentraciones en plasma, y lo mismo se podría decir respecto al timolol⁴⁰⁰. Las altas concentraciones en plasma hacen que el bufuralol se excrete por orina como tal en mayor % que sus metabolitos⁴⁰¹ (hasta 2 o 3 veces), en los metabolizadores lentos.

- **Fenitoína:** La oxidación metabólica de la fenitoína parece estar también relacionada con los mismos alelos que regulan la hidroxilación de la debrisoquina, al menos de forma parcial.

En individuos fenotipados como hidroxiladores lentos de debrisoquina se ha observado que metabolizan la fenitoína más lentamente que los rápidos, alcanzando también altas concentraciones en plasma; pero al contrario que la debrisoquina, la eliminación renal o biliar de los

metabolizadores lentos de fenitoína pueden ocasionar (al ser menor) la acumulación de esta sustancia, dando lugar a efectos adversos. La medida de las concentraciones plasmáticas es, en general, suficiente para controlar la dosis de fenitoína, ya que estudios llevados a cabo por Steiner et al.(1987), demuestran que el fenotipo hidroxilador de la debrisoquina no tiene valor predictivo para la dosificación de fenitoína⁴⁰² y en experimentos realizados in vitro se ha visto que fenitoína no inhibe la debrisoquina-4-hidroxilasa en los microsomas hepáticos humanos⁴⁰³.

- **Antidepresivos tricíclicos:** Diferentes estudios bioquímicos apoyan la hipótesis de que algunos antidepresivos tricíclicos son oxidados por la misma enzima que la esparteína y la debrisoquina, tales como nortriptilina y desipramina^{390,404} y la imipramina, amitriptilina, fenotiacina y clorpromacina inhiben el metabolismo de la esparteína en preparaciones de hígado humano⁴⁰⁵. Otros fármacos oxidados como la amilobarbitona, tolbutamida y guanetidina no inhiben dicho metabolismo.

Los metabolizadores lentos de debrisoquina tienen muy reducidos los niveles de hidroxiamitriptilina en sangre y orina⁴⁰⁶.

No obstante, como la demetilación de la amitriptilina, y no la oxidación, es la vía principal de eliminación de éste fármaco, las concentraciones en sangre de amitriptilina no pueden ser valoradas mediante el polimorfismo oxidativo.

La posible asociación entre los hidroxiladores lentos de debrisoquina y las reacciones adversas observadas en el tratamiento con algunos antidepresivos tricíclicos, que siguen en parte esta vía oxidativa, es un hecho infrecuente y su transcendencia clínica no es conocida.

1.8.6 OXIDACIÓN DE AGENTES QUÍMICOS AMBIENTALES Y CÁNCER.

El metabolismo oxidativo puede generar metabolitos carcinogénicos activos de compuestos tales como el benzo(a)pireno. Es por tanto posible que el polimorfismo oxidativo genético de debrisoquina/ esparteína esté asociado con la oxidación de sustancias químicas ambientales, dando lugar a metabolitos carcinógenos y al desarrollo de carcinomas.

Según esto, podríamos decir que los individuos con FHL para una determinada isoenzima, tendrían una menor capacidad para formar carcinógenos activos a partir de los productos que siguen esta vía específica. Teóricamente presentarían menor riesgo de padecer determinados tipos de cáncer. Por el contrario, los sujetos con una tasa oxidativa elevada generarían más carcinógenos inmediatos a partir de los procarcinógenos que siguen esta vía.

Pasamos ahora a ver con más detalle los hallazgos referidos a distintos tipos de neoplasias y su relación con el fenotipo hidroxilador (Tabla 12).

- Cáncer de pulmón:

La íntima asociación entre el carcinoma bronquial y el humo del tabaco, el mayor factor de riesgo, apuntan hacia la carcinogénesis química como la causa del proceso, no quedando del todo claros los factores del huésped que regulan el grado de susceptibilidad de los individuos expuestos, encontrándose éste estudio en sus primeras fases⁴⁰⁷.

Algunos tipos histológicos de cáncer pulmonar muestran una mayor inducción de AHH, lo que parece indicar que esta enzima (AHH) puede jugar un importante papel como activador de hidrocarburos aromáticos en la carcinogénesis bronquial⁴⁰⁸ siendo su inducción determinada genéticamente⁴⁰⁹.

Tabla 12. Estudios valorando asociación de neoplasias con polimorfismo oxidativo de debrisoquina.

ENFERMEDAD	OBSERVACIÓN	AUTORES
Carcinoma bronquial	Baja frecuencia de FHL	<i>Heizel et al, 1984</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Ayesh et al, 1984</i>
	Sin cambios	<i>Drakoulis et al, 1986</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Law, 1989</i>
	Sin cambios	<i>Speirs, 1990</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Caporaso et al, 1989</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Benítez et al, 1991</i>
	Sin cambios	<i>Duche et al, 1991</i>
	Sin cambios	<i>Horsmans et al, 1991</i>
Cáncer laríngeo	Baja frecuencia de FHL	<i>Ritter et al, 1986</i>
Cáncer faríngeo	Baja frecuencia de IM(*)	<i>Ritter et al, 1986</i>
Cáncer gástrico	Baja frecuencia de FHL	<i>Roots et al, 1987</i>
Cáncer de vejiga	Baja frecuencia de FHL	<i>Cartwright et al, 1984</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Branch et al, 1984</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Roots et al, 1987</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Kaisary et al, 1987</i>
	Baja frecuencia de FHL	<i>Benítez et al, 1990</i>
Hepatoma	Baja frecuencia de FHL	<i>Idle et al, 1981</i>
Linfomas	Sin cambios	<i>Philip et al, 1987</i>
Mama	Alta frecuencia de FHL	<i>Pontin et al, 1990</i>
	Alta frecuencia de FHL	<i>Ladero et al, 1991</i>
Cáncer colorrectal	Sin cambios	<i>Ladero et al, 1991</i>

(*) Fenotipo oxidativo intermedio.

Los tipos histológicos más relacionados con el tabaco muestran mayor asociación con el fenotipo hidroxilador rápido^{410, 411}.

Los genes que controlan la 4-hidroxilación de la debrisoquina pueden ser un determinante genético del huésped, de la susceptibilidad de padecer cáncer de pulmón en fumadores y esto representa un marcador para ayudar en la

valoración del riesgo individual. Individuos homocigotos dominantes (FHR), aparecen con alto riesgo teórico de desarrollar cáncer, mientras que los heterocigotos y homocigotos recesivos (FHL), tienen relativamente bajo riesgo.

La debrisoquina 4-hidroxilasa puede no estar relacionada con el metabolismo de los carcinógenos químicos, pero sus genes pueden estar al lado de otros con potencial oncogénico (también en el cromosoma 22). Dichos genes pueden ser estructurales o reguladores del citocromo P-450, tal como el locus Ah⁴¹², o ser genes no involucrados en el metabolismo de los carcinógenos químicos, por ejemplo oncogenes celulares.

Además de la inducibilidad aumentada de la AHH y de los oncogenes celulares, existen una serie de posibles vías patogénicas relacionadas con el cáncer de pulmón, como el déficit de glutatión-transferasa, el aumento de la formación de aductos benzo(a)pireno-ADN⁴¹³, ciertos oncogenes⁴¹⁴, síndromes hereditarios de inestabilidad cromosómica o de puntos frágiles cromosómicos⁴¹⁵, o variaciones en el HLA B44⁴¹⁶, W19 y A5⁴¹⁷.

La idea de estudiar la deficiencia de debrisoquina hidroxilasa como marcador genético de la susceptibilidad de padecer cáncer de pulmón fue propuesta en primer lugar por Ayesh et al., que observaron casi 6 veces menor proporción de metabolizadores lentos entre los fumadores con carcinoma broncogénico.

El reciente interés se ha centrado en la actividad de enzimas que actúan en la metabolización de compuestos extraños, la cuales pueden detoxicar o toxificar xenobióticos, incluidos carcinógenos. Así, un procarcinógeno puede ser transformado bien en metabolitos no tóxicos o ser activado a carcinógenos últimos, dependiendo de su naturaleza fisicoquímica y de las enzimas implicadas⁴¹⁸.

La mayor parte de variabilidad individual en el metabolismo de compuestos extraños, reside en el polimorfismo genético de muchos sistemas enzimáticos o sus isoenzimas. Este polimorfismo ha demostrado tener gran impacto en cuanto a la ocurrencia de reacciones adversas o efectos inesperadamente fuertes con fármacos que son metabolizados mediante estas isoenzimas.

- Cáncer gastrointestinal e hígado:

En esta línea, se ha propuesto que el aumento de susceptibilidad al carcinoma hepatocelular y del tracto gastrointestinal en sujetos con FAR de DB, podría estar relacionado con un aumento de hidroxilación de contaminantes en la dieta, como la aflatoxina⁴¹⁹ teóricos a la hora de explicar la patogénesis de estas neoplasias. Algún laboratorio no ha detectado ningún papel de la enzima metabolizadoras de debrisoquina en la activación de aflatoxina⁴²⁰. Estudios recientes han demostrado que el hepatocarcinógeno 2-acetil-aminofluoreno, implicado en la génesis del hepatocarcinoma, se metaboliza por isoenzimas de otra familia del citocromo P-450. Su metabolismo sería independiente de la hidroxilación de DB⁴²¹.

Por otra parte, el polimorfismo oxidativo de debrisoquina no parece estar relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer colorectal en seres humanos⁴²²

- Cáncer de vejiga:

En el caso del cáncer de vejiga, el estudio de Cartwright et al. objetivó una asociación absoluta entre los pacientes con exposición ocupacional a bencidina y FHR. De hecho, no se encontró ningún caso de metabolizador lento. Sin embargo, no se encontró relación alguna con el fenotipo oxidativo en los casos de cáncer de vejiga sin exposición conocida a carcinógenos industriales⁴²³.

Kaisary et al. encontraron una tasa oxidativa más elevada en pacientes con tumores vesicales de mayor

agresividad histológica, frente a tumores menos agresivos.

Benítez et al. encontraron un predominio, aunque no significativo de FHR en pacientes diagnosticados de cáncer de vejiga, comparados con el grupo control, así como un marcado predominio en varones y un papel prominente del tabaco en su génesis⁴²⁴.

- Otras neoplasias:

Se ha encontrado un predominio no significativo de FHR en pacientes con cáncer de **laringe**, pero no de **faringe**⁴²⁵.

No se han encontrado diferencias en pacientes con **linfoma**⁴²⁶.

Pontin et al. han detectado un exceso de FHL en un grupo de mujeres con cáncer de **mama** al compararlas con el grupo control compuesto por mujeres que poseían lesiones benignas en la mama (todas FHR)⁴²⁷

Poseer FHL de DB puede ser un factor de riesgo secundario para el desarrollo de cáncer de mama en mujeres postmenopausicas⁴²⁸.

1.8.7 FENOTIPO HIDROXILADOR Y ENFERMEDAD.

Actualmente se considera a la **enfermedad de Parkinson** como el resultado de la actuación conjunta del envejecimiento y una constelación de efectos ambientales sobre una dotación reducida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. Entre los agente ambientales se encuentra el MPTP, que inhibe competitivamente "in vitro" los isoenzimas del citocromo P-450, responsables de la 4-hidroxilación de la debrisoquina^{429,430}. Este hecho nos sugiere la posible relación entre el citocromo P-450 con el metabolismo y neurotoxicidad del MPTP y con la etiología de la enfermedad de Parkinson⁴³¹.

Barbeau et al.⁴³² detectaron una proporción excesiva de oxidadores lentos de debrisoquina en un grupo de pacientes con Parkinson y una relación inversa entre la edad de comienzo de la enfermedad y la eficacia oxidativa de debrisoquina. Resultados similares fueron obtenidos por Benítez et al.⁴³³.

Posteriormente, el grupo de Barbeau hubo de retractarse de su primera conclusión, al comprobar que algunos antihistamínicos administrados a los pacientes producían un bloqueo enzimático del citocromo P-450, aunque sí confirmaron la validez de la segunda⁴³⁴.

Otros autores tampoco encontraron un exceso de metabolizadores lentos de debrisoquina entre pacientes con parkinson⁴³⁵.

También se ha relacionado el fenotipo hidroxilador lento de debrisoquina con el desarrollo de **lupus eritematoso sistémico**. Aunque no se excluye tal asociación, de existir, sería probablemente de escasa importancia^{436,437}.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 POBLACIÓN ESTUDIADA.

La muestra estudiada comprende un total de 100 individuos divididos en 3 grupos.

El grupo I, formado por 30 individuos sanos y no fumadores; el grupo II, formado por 30 individuos sanos fumadores y el grupo III, constituido por 40 individuos diagnosticados de cáncer pulmonar y fumadores. Todos los individuos estudiados eran varones.

Se elaboró una ficha con los datos de cada individuo, en la que se solicitaba información sobre todos aquellos factores que pudieran interferir con nuestros resultados. Para la selección de la muestra se descartaron aquellos individuos que padecieran cualquier tipo de enfermedad, que hubiesen recibido radiaciones o estuviesen tomando algún tipo de medicación, durante el mes anterior a la prueba. Asimismo, fueron excluidos aquellos que por su profesión o lugar de residencia estaban expuestos a contaminantes ambientales potencialmente genotóxicos.

Se pidió información acerca de los antecedentes personales y familiares (sobre todo, neoplasia o enfermedad congénita), sobre hábitos alimentarios, ingesta de alcohol, consumo de tabaco, especificando la cantidad de cigarrillos por día, el tipo de tabaco (rubio, negro,..) y el tiempo de duración del hábito.

Se obtuvo consentimiento informado de cada participante en el estudio para la determinación del fenotipo hidroxilador y acetilador.

El grupo III se formó con individuos diagnosticados histológicamente de cáncer de pulmón mediante biopsia, que acudieron a diversos servicios del Hospital Miguel Servet y del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza. Los

criterios de inclusión y exclusión de los pacientes se reflejan en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13. Criterios de inclusión de pacientes con cáncer de pulmón.

- 1.- Diagnóstico histológico de cáncer de pulmón.
 - 2.- No haber recibido tratamiento específico previo (incluyendo cirugía, radioterapia o quimioterapia).
 - 3.- Consentimiento de participación en el estudio.
 - 4.- Estado general aceptable, con un "Performance status" superior a 60, según la escala de KARNOFSKY.
 - 5.- Función hepática conservada (no metástasis hepáticas).
 - 6.- Función renal conservada.
-

Tabla 14. Criterios de exclusión de pacientes.

- 1.- Insuficiencia renal.
 - 2.- Insuficiencia hepática o metástasis hepáticas.
 - 3.- Tratamiento con fármacos que puedan interferir con debrisoquina.
 - 4.- Arteriosclerosis severa (angor pectoris, ACVA previo).
 - 5.- Hipotensión ortostática.
 - 6.- Supervivencia esperada inferior a tres meses.
-

2.2 MÉTODOS.

A continuación pasamos a describir la metodología utilizada en nuestro trabajo.

2.2.1 ESTUDIO CITOGENÉTICO.

En todos los individuos estudiados se cuantificaron y valoraron los siguientes parámetros:

- Frecuencia de "Intercambio de Cromátides Hermanas" (SCEs).
- Cinética celular, mediante el índice de proliferación celular (PRI).
- Cuantificación de micronúcleos.
- Cuantificación de aberraciones cromosómicas totales y divididas en: aberraciones tipo cromatídico y aberraciones tipo cromosómico.
- Índice mitótico.

La realización de estas determinaciones se hizo a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica.

2.2.1.1 FRECUENCIA DE "INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDES HERMANAS" (SCEs).

Para su obtención se realizó cultivo de linfocitos a partir de sangre completa heparinizada, según la técnica descrita por Wolff y Perry⁴³⁸.

El medio de cultivo contenía Tc-199 (GIBCO), suero bovino fetal (SBF, GIBCO) al 2 %, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 U/ml). Como mitógeno se añadió fitohemaglutinina (PHA-M, DIFCO) a una concentración final en el medio de 250 U/ml.

Tras realizar la siembra de 10 gotas de sangre (0,5 ml) con ayuda de una pipeta Pasteur se incubaron los tubos a 37°C en estufa de cultivo durante 72 horas, agitando cuidadosamente cada 12 horas.

A las 24 horas de la siembra se añadió 5,Br-2'-deoxyuridine (Brd Urd, SIGMA) en la proporción de 10 µgr/ml, concentración que no afecta a la frecuencia de intercambios. A partir de la adición de Brd Urd fueron protegidos de la luz mediante papel de aluminio.

Dos horas antes del final del cultivo (70 horas desde el inicio) se suspendió el crecimiento con 0,µgr/ml de colchicina (Colcemid, GIBCO) con el fin de paralizar la mitosis en metafase.

Al cabo de las 72 horas, y previa transferencia de los cultivos a tubos cónicos, se centrifugaron a una velocidad entre 2500 - 3000 rpm por espacio de 10 minutos. Se desechó el sobrenadante, de forma que en el fondo del tubo quedara el "pellet" celular más una pequeña parte del medio de cultivo.

Se realizó un choque hipotónico con solución de ClK al 0,075 M durante 20 minutos a 37°C. Se centrifugó nuevamente y resuspendió varias veces con fijativo de Carnoy (metanol y ácido acético en proporción de 3:1), hasta que el sobrenadante fue claro y transparente.

Los tubos fueron protegidos de la luz mediante papel de aluminio y almacenado en nevera a 4°C por un espacio de 24 horas durante el cual se produjo la crioprecipitación celular.

A partir del "pellet" celular subyacente, y mediante una pipeta Pasteur, se tomaron unas gotas que se dejaron caer desde una altura aproximada de 10 cm en número de 4 ó 5, sobre portas limpios, desengrasados y fríos.

Una vez secas las preparaciones, se tiñeron con una solución de Hoescht DYE 33258 (Bisbenzimidazole, SIGMA) a una concentración de 10^{-4} M durante 30 minutos. Se lavaron y se expusieron a una fuente de luz ultravioleta durante 2 horas a 60 cm de distancia de la lámpara, tras interponer unas gotas de tampón fosfato (pH 7) entre porta y cubre.

Finalmente se lavaron y se tiñeron con Giemsa a una concentración del 4% durante 3 minutos.

Para su análisis se utilizó microscopio óptico OLYMPUS BH2, usando un objetivo de 100 aumentos, mediante inmersión en aceite de cedro.

La valoración de los SCEs se efectuó contando el número de intercambios de material genético entre cromátides hermanas, en cada mitosis.

El resultado para cada prueba fue la media del número de intercambios por metafase, contando un total de 50 metafases por muestra estudiada⁴³⁹.

2.2.1.2 CINÉTICA CELULAR (PRI).

A partir de las preparaciones, para el análisis de intercambios de cromátides, se procedió a contabilizar el porcentaje de metafases que habían pasado por una, dos o tres fases S, tras la incorporación del BrdUrd.

Se contaron 100 células anotando el porcentaje de cada una de las formas celulares, siguiendo el criterio de TICE et al.(1976), según el cual, las células en primera metafase presentan cromosomas teñidos uniformemente, y que están sustituidos sólo unifilarmente. Las mitosis en segundo ciclo celular son las que habían servido para analizar la frecuencia de intercambios y exhibían en todos los cromosomas una cromátide unifilarmente sustituida y la otra,

su homóloga, con sustitución de ambos cordones de ADN de la base análoga (tinción diferencial o en arlequín, mostrando una cromátide con tinción intensa y su homóloga no teñida).

El índice de proliferación celular (PRI) se utilizó como parámetro y se evaluó de acuerdo con la fórmula propuesta por Lamberti et al.⁴⁴⁰:

$$PRI = (1M_1 + 2M_2 + 3M_3) / 100$$

Donde:

M_1	=	células de 1 ^{er} ciclo	
M_2	=	"	2° "
M_3	=	"	3° "

2.2.1.3 CUANTIFICACIÓN DE MICRONÚCLEOS.

Se realizó a partir de microcultivo de linfocitos, según el método descrito por Fenech y Morley.

El medio de cultivo y agente mitógeno utilizados fueron los mismos que en los cultivos anteriores. A las 44 horas de la siembra se añadió citocolasina B (Cyt-B), a una concentración final de 3 µg/ml, para interrumpir la división del citoplasma tras la división nuclear. A las 72 horas se interrumpió el cultivo procesándose el "pellet celular" mediante choque hipotónico con solución de ClNa 0,32 gr/100 ml durante 1 minuto, para obtener hemólisis sin daño de los linfocitos, los cuales se fijaron con solución de Carnoy y se extendieron sobre portas limpios y desengrasados, tiñéndolos con May-Grunwald-Giemsa.

Los criterios seguidos para la identificación de los micronúcleos fueron los descritos por Countryman (1976)⁴⁴¹.

Se contaron un total de 1000 células por muestra estudiada, obteniendo de esta manera el "tanto por mil" de micronúcleos observados.

2.2.1.4 ABERRACIONES CROMOSÓMICAS Y SUS TIPOS.

Su estudio se llevó a cabo a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica procesado tal como se ha descrito. Posteriormente, las preparaciones se tiñeron con Giemsa al 4% durante 3 minutos. La observación fue hecha en microscopio óptico (descrito anteriormente), siendo descartadas en primer lugar las alteraciones numéricas o de cariotipo de todos los pacientes, no contabilizándose aquellas células con menos de 43 cromosomas.

Para el análisis de las alteraciones morfológicas de los cromosomas, fueron estudiadas 100 mitosis para cada una de las muestras de cada paciente, siendo necesaria la observación de varios portas, en cada uno de los casos, para este estudio.

Las lesiones consideradas fueron clasificadas según el sistema internacional de nomenclatura para citogenética, en uno de los siguientes grupos:

- 1) aberraciones tipo cromatídico: cuando afectan a una sola cromátide, que incluyen:
 - roturas cromatídicas.
 - gaps cromatídicos.
 - intercambios cromatídicos (radiales).

- 2) aberraciones tipo cromosómico: cuando afectan a ambas cromátides, que incluyen:
 - roturas cromosómicas.
 - gaps cromosómicos.
 - intercambios cromosómicos.
 - anillos (simétricos).
 - dicéntricos (asimétricos).
 - minutos (fragmentos acéntricos).

El conjunto de las aberraciones tipo cromatídico y tipo cromosómico constituyen las aberraciones cromosómicas totales.

2.2.1.5 ÍNDICE MITÓTICO.

Su valoración se realizó a partir de las preparaciones empleadas para el estudio de las aberraciones cromosómicas, tal como se explicó en el apartado anterior. Para su evaluación se contó el número de células en división (metafases) entre un total de 300 células blásticas.

2.2.2 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN EN ERITROCITOS.

La cuantificación de la concentración de glutatión en eritrocitos se realizó según el método de Karem M.Toth et al.⁴⁴²

Las muestras fueron obtenidas a partir de 2 ml. de sangre completa, que habían sido extraídos previamente a cada individuo por venopunción, recogiendo en tubos que contenían EDTA como anticoagulante.

De cada muestra de 2 ml se tomaron 0,25 ml en tubos test y se mezclaron con 2 ml de SO_4H_2 0,08 N. Se agitó la solución dejándose en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurridos los cuales se añadieron 0,25 ml de Tungstato de Sodio de una solución 0,3 M, agitándose nuevamente la solución. Posteriormente se almacenaron las muestras en nevera a 4°C durante 24 horas. Después se sacaron las muestras de la nevera y fueron sometidas a centrifugación durante 10 minutos.

Del sobrenadante formado tras la centrifugación se tomaron 0,3 ml con pipeta Pasteur que se añadieron a un tubo de ensayo que contenía 1 ml de tampón Buffer TRIS (pH 8,0). A esta solución se añadieron 0,06 ml de DTNB (ácido 5-5' ditiobis-(2-nitrobenzoico)) (SIGMA), agitando la mezcla resultante y dejándolo a temperatura ambiente durante 5 minutos.

La cuantificación colorimétrica se realizó en espectrofotómetro marca ST 30 UV, previamente calibrado con una solución "blanco" preparada con 1 ml de Buffer TRIS, 0,3 ml de agua destilada (en sustitución del sobrenadante) y 0,06 ml de DTNB.

La medida de la densidad óptica (DO) de cada muestra se realizó a una longitud de onda de 412 nm.

El valor de densidad óptica obtenido fue llevado a una curva patrón donde se obtuvo el valor de la concentración de glutatión en sangre, expresado μM GSH/ gr% Hb.

La curva patrón se realizó mediante varias soluciones de glutatión standard 0,1 Mm, preparado previamente con una solución de EDTA 0,1 M. Para realizar dicha curva se añadieron, a iguales cantidades de glutatión standard, cantidades distintas de tampón Buffer TRIS, para obtener disoluciones distintas. De cada disolución se tomaron 0,3 ml en tubos de ensayo y se añadieron a 1 ml de tampón Buffer TRIS y 0,06 ml de DTNB. La densidad óptica de estas soluciones se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm. Los valores obtenidos fueron llevados al eje de abscisas y se hicieron corresponder con los valores de las concentraciones de las disoluciones a los que pertenecían, previamente colocadas en el eje de ordenadas; así se trazó la curva patrón sobre la que después se calcularon los valores de las muestras.

La concentración de hemoglobina se midió previamente en cada muestra mediante el método de la cianmetahemoglobina⁴⁴³.

Para realizar ésta técnica se necesitaron 0,2 ml de la sangre total de cada muestra, que se añadieron a 5 ml de reactivo de Drabkin.

Se agitó suavemente la solución para conseguir que se mezclaran homogéneamente, y pasados 20 minutos se leyó en el

espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, utilizando como blanco el reactivo de Drabkin.

Los valores obtenidos se trasladaron a una curva patrón, previamente realizada con un patrón de cianmetahemoglobina equivalente a 20 gr Hb/ 100 ml, colocando estos valores en ordenadas y extrapolando para calcular en abscisas la concentración de hemoglobina de la muestra expresada en gr % de Hb. Para su posterior estudio estadístico el glutatión fue valorado en función de la hemoglobina de cada individuo, expresándose en μM GSH/ gr% Hb.

2.2.3 DETERMINACIÓN DE TIOÉTERES EN ORINA.

a) Recogida de las muestras:

Se recogió una muestra de orina al final del día a cada uno de los individuos de los grupos I, II y III.

b) Conservación de las muestras:

Para la conservación de las muestras de orina se procedió a su almacenamiento a -20°C hasta el momento de su análisis. En ningún caso se han mantenido las muestras en estas condiciones durante más de tres meses y no se ha observado pérdida de sus propiedades en cuanto a tioéteres y creatinina.

c) Determinación de la creatinina urinaria:

Los valores de tioéteres urinarios se expresan en milimoles de SH/ mol de creatinina, por lo que se procedió al análisis de la concentración de creatinina de cada una de las muestras. La determinación se realizó según el método de Jaffé, que se fundamenta en la reacción de la creatinina con picrato, en solución alcalina, dando lugar a un compuesto coloreado. Se trata de medir la rapidez de formación del colorante. La metodología fue la siguiente: se diluyó la orina en una proporción de 0,25 a 12 con agua destilada. De esta disolución se tomaron 0,2 ml, a los que se añadió el

reactivo: "test-combination-creatinine" (Boehringer Mannheim).

A los 30 segundos exactamente se midió la reacción colorimétrica mediante espectrofotómetro SP 30UV a una longitud de onda de 490 nm. Dos minutos después de la primera determinación se procedió a repetir la medición de la reacción colorimétrica en la misma forma que la ocasión anterior.

El mismo procedimiento se llevó a cabo con solución standard de concentración 8,84 Mm/l.

Con el resultado de ambas lecturas de cada muestra y de la solución standard se calculó el incremento de la reacción colorimétrica.

Para calcular la concentración de creatinina urinaria en cada caso, se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = 8,84 \times \frac{\Delta\text{Prueba}}{\Delta\text{Standard}}$$

C: Concentración de creatinina en orina.

Δ Prueba: Incremento de la reacción colorimétrica en la disolución problema.

Δ Standard: Incremento de la preparación estándar.

La concentración de creatinina resultante de la fórmula anterior viene expresada en mMol/l. Dado que el valor de los tioéteres urinarios se expresa en mMoles SH/Mol de creatinina, se dividió por 1000 la concentración de creatinina resultante para expresarlo en Moles de creatinina. Las orinas con escasa cantidad de creatinina presentaron cifras de tioéteres urinarios anormalmente elevadas. Por esta razón se eliminaron aquellas muestras con valores de creatinina menores de 5 Mmoles/l.

d) Descripción de la determinación de tioéteres urinarios:

El método utilizado para dicha determinación se basa en la reacción de Ellman⁴⁴⁴ y ha sido descrito por Van Doorn et al^{445,49}. En síntesis, se trata de acidificar la orina para su extracción con acetato de etilo, redisolución del extracto seco con agua destilada e hidrólisis alcalina. Finalmente, se valoran por la reacción colorimétrica de Ellman los grupos SH liberados en las dos fracciones, es decir, antes y después de la hidrólisis alcalina, como se observa en la Figura 14.

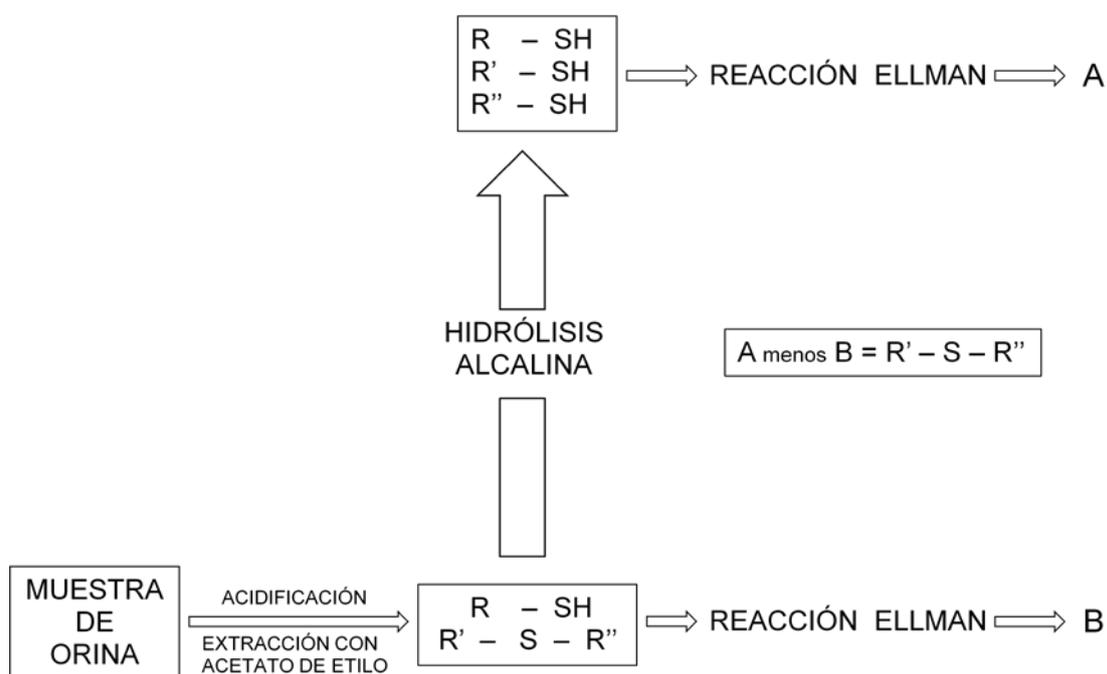


Figura14. Esquema de determinación de la excreción urinaria de tioéteres, según la reacción de Ellman.

El procedimiento se realizó como sigue: se descongelaron las muestras de orina a temperatura ambiente y se tomaron 7 ml que, posteriormente, fueron centrifugados para eliminar las partículas sedimentables. El sobrenadante se destinó a la determinación de creatinina y tioéteres urinarios. En el proceso de extracción de los tioéteres de la orina existen dos fases bien diferenciadas: la acidificación y la hidrólisis alcalina.

Acidificación:

De cada muestra se tomaron 5 ml de orina ya centrifugada, a los que se añadieron 0,25 ml de ClH 4 N y 8 ml de acetato de etilo. Todo ello se colocó en un tubo de cristal tapado que, posteriormente, se sometió a agitación mecánica. A los 3 minutos de agitación se abrió el tubo de cristal para liberar el contenido gaseoso generado durante la agitación. Se volvió a cerrar el tubo de ensayo y se prosiguió la agitación hasta un total de 15 minutos. Al término de este tiempo, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos.

Tras la centrifugación se produjo la separación de la mezcla en 2 fases, superior e inferior; la fase superior se recogió por medio de una pipeta Pasteur y se colocó en otro tubo de ensayo. Esta fase contiene el acetato de etilo, los tioéteres extraídos de la orina y los grupos SH libres existentes. A la fase inferior se le añadieron de nuevo 8 ml de acetato de etilo, se repitió el proceso de agitación y centrifugación y se realizó una nueva separación de fases, la fase superior se añadió a la anterior guardada y la inferior se desechó definitivamente.

El total de ambas fases superiores se sometió a evaporación lenta con Rotavapor, hasta obtener un residuo seco. El Rotavapor utilizado fue el Protovapor R110 (Buchi).

Al extracto seco resultante de la evaporación se le añadieron 2 ml de agua destilada para redissolver el contenido de cada residuo. La disolución resultante de cada extracto fue introducida en tubo de cristal topacio. En dicha disolución se encuentran los tioéteres (R-S-R') de la orina problema, así como los grupos R-SH libres. Posteriormente, de los 2 ml de la disolución de agua y extracto obtenido se tomaron:

a) 0,25 ml para la lectura directa de los grupos SH libres tras la reacción de Ellman.

b) 1 ml para realizar la hidrólisis alcalina con la que los tioéteres se convierten en grupos SH libres y tras la reacción de Ellman se leen en el Espectrofotómetro.

Reacción de Ellman

La lectura en el Espectrofotómetro de los grupos SH se basa en dicha reacción. Consiste en valorar la intensidad de color adquirido al reaccionar los grupos SH libres con el ácido 5-5' ditrio-bis (2-nitrobenzeno-esare) (DTNB). Esta reacción se realizó de la siguiente manera:

- A 0,25 ml de la solución acuosa se le añadió una mezcla compuesta por 2 ml de tampón fosfato buffer 0,5 M Sorensen de pH 7,1 y 0,3 ml de DTNB (0,4 mg de DTNB por ml al 1% de solución de citrato sódico).

- La absorbancia se leyó exactamente 5 minutos después en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm.

Hidrólisis alcalina

Se introduce 1 ml de residuo acuoso en un tubo de cristal topacio. Se añaden 0,5 ml de NaOH 4 N y se satura con una corriente de nitrógeno durante 25 seg. Rápidamente se tapa el tubo de ensayo y se pone en ebullición durante 50 min., al cabo de este tiempo los tubos se enfrían colocándolos en un recipiente con hielo durante 10 min.; posteriormente se añaden 0,5 ml de ClH 4 N para neutralizar la sosa. De esta nueva disolución se toman 0,25 ml a los que se aplica la reacción de Ellman para la lectura de los grupos SH.

En este momento disponemos de la fase hidrolizada y del resto inicial de la redisolución. Recordemos que en la fase hidrolizada ahora tenemos únicamente grupos R-SH libres, resultantes de los tioéteres, que se han producido con la hidrólisis alcalina y los R-SH libres que existían previamente; en cambio, en el resto de la redisolución

inicial, se encuentran solamente los grupos R-SH libres no procedentes de los tioéteres. Por tanto, la determinación de los grupos R-SH libres en cada una de las dos muestras, hidrolizadas y sin hidrolizar, permitiría calcular la cantidad de SH procedentes de los tioéteres, puesto que los grupos R-SH de la muestra hidrolizada menos los de la muestra sin hidrolizar darán como resultado la cantidad de grupos R-SH procedentes de los tioéteres.

Para cuantificar el número de moles de tioéteres de la orina se estableció una recta patrón con N-acetilcisteína. Para realizar dicha recta, el procedimiento es exactamente igual; 0,25 ml de concentraciones diferentes y conocidas de N-acetilcisteína reaccionan con 0,3 ml de una solución de DTNB y 2 ml de tampón fosfato Sorensen. Después de 5 min., se lee en el espectrofotómetro la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm.

2.2.4 EVALUACIÓN DE MUTÁGENOS Y PREMUTÁGENOS EN ORINA.

La evaluación de mutágenos y premutágenos en orina se llevó a cabo según la técnica descrita por Ames et al.⁴⁴⁶ en 1975 y perfeccionada posteriormente por Maron y Ames en 1983.

- Preparación de medios de cultivo.

Los medios utilizados fueron los siguientes:

- Solución madre medio Vogel-Bonner E x 50
- Medio E x 2
- Medio Agar x 2
- Medio Agar blando base
- Solución histidina biotina
- Medio sólido E

El medio sólido E fue extendido sobre placas de Petri estériles que fueron conservadas a 4°C en nevera, hasta su utilización.

- Preparación de cultivo de noche.

En este cultivo se utilizó el medio Nutrien Broth (NB) y la cepa bacteriana Salmonella Typhimurium TA98. Esta cepa presenta como características las siguientes mutaciones:

- **Mutación His⁻**. El gen afectado es el HisD 3052 y corresponde a un decalaje en el código de lectura (frame-shift) a consecuencia de una pequeña delección en un par de bases, lo que la hace especialmente sensible a determinados mutágenos⁴⁴⁷.

- **Mutación rfa**. Aumenta la permeabilidad de esta cepa a las moléculas de gran tamaño, ya que afecta a los lipopolisacaridos de la membrana externa de la bacteria.

- **Mutación uvrB**. Conlleva una deficiencia en el proceso de reparación por escisión, por lo tanto un gran número de lesiones primitivas del ADN no pueden ser reparadas. Esta mutación confiere a las cepas una sensibilidad mayor para numerosos agentes susceptibles de dañar el ADN. Esta mutación es una delección que cubre también el gen de la biotina, por lo tanto se le considera también biotina⁻.

- **Factor R** introducido en la cepa. Es el plásmido pkM 101 que aumenta la mutagénesis inducida y espontánea por crecimiento notable de los riesgos de error en el curso de la replicación^{448,215}.

Estas mutaciones fueron comprobadas en varias ocasiones a lo largo de la realización de este trabajo.

Para la obtención de la cepa en condiciones de uso para el test se partió de un "stabb" de conservación de Salmonella typhimurium sembrándose en 10 ml de medio Nutrien Broth al que se le había añadido previamente 50µl de una solución de ampicilina sódica de 4 mg/ml. A continuación, el medio sembrado se envolvió en papel de aluminio y se colocó en estufa de cultivo durante toda la noche a 37°C, siendo trasvasado a la mañana siguiente a nevera a 4°C y conservado así hasta su posterior utilización.

- Preparación de la fracción S9 mix.

Como agente inductor enzimático se utilizó el 3-metil-colantreno.

- Fracción microsomal S9

Primer día: a una rata de aproximadamente 200 gr se le inyectó intraperitonealmente con jeringa subcutánea y aguja IM de 25x9 una solución de 3-metil-colantreno de 20 mg/kg de peso, disuelto en aceite vegetal puro. La rata permaneció con comida y agua durante este primer día^{201,449} .

2º día: se inyectó a la misma rata, bajo las mismas condiciones, una solución de 3-metil-colantreno de 10 mg/kg de peso y se la dejó toda la noche sin alimento.

Tercer día: al tercer día del tratamiento inductor se decapitó a la rata y se le extrajo el hígado, el cual fue lavado con unos mililitros de ClK 0,150 M hasta quedar exangüe. Posteriormente se añadieron 3 ml de ClK por gramo de peso de tejido y fue homogeneizado con un homogeneizador Potter de vidrio con mango de teflón.

El homogeneizado se distribuyó en tubos de policarbonato y se centrifugó en centrífuga refrigerada a 9800 rpm durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y fue distribuido en tubos eppendorf y conservado

a -80°C hasta su utilización^{450,451}.

- Fracción S9 mix

Para la determinación de premutágenos en cada uno de los ensayos se obtuvo el S9 mix a partir de la fracción S9, añadiendo en un tubo estéril ClMg 0.4 M, ClK 1.65 M, NADP 0.1 M, glucosa-6-fosfato (G-6-P) de una solución de 152 mg de G-6-P en 0.5 ml de agua destilada estéril, tampón fosfato 0.2 M y fracción microsomal S9. Todo esto se realizó en hielo picado y lo último en añadirse fue siempre la fracción microsomal.

- Medida del efecto mutagénico en orina. Test de Ames.

Cada muestra de orina fue descongelada a temperatura ambiente y filtrado un volumen de 15 ml a través de una columna cromatográfica, según el método descrito por Yamasaki y Ames. Una vez filtrada la orina, la resina fue eluida con 7 ml de acetona y recogida en tubos de cristal. A continuación, este componente fue colocado en Rotavapor a 45°C hasta la total evaporación de la acetona, quedando solo el mutágeno en forma de residuo seco. Este residuo fue redissuelto en 200 μl de dimetilsulfóxido (DMSO).

Posteriormente se procedió según la técnica descrita por Maron y Ames. Se añaden en un tubo de cristal estéril 100 μl (aprox. 10^8 bacterias) de un cultivo de noche en medio Nutrien Broth de la cepa bacteriana TA 98, 100 μl de la muestra disuelta en dimetilsulfóxido y 735 μl de S9 mix si lo que se pretende valorar son los premutágenos; si, por el contrario, son los mutágenos los que vamos a determinar, no se añadirá el S9 mix.

Una vez homogeneizado el contenido de los tubos y evitando su exposición a la luz solar, serán puestos en baño a 37°C durante 30-45 minutos. A continuación se vierte sobre cada uno de los tubos 2 ml de agar blando que se encuentra a 45°C . El contenido se mezcla por rotación del tubo entre las

manos y se extiende sobre una placa de Petri que contendrá el medio sólido E. Se protegen las placas de la luz solar hasta que se solidifica el agar y se incuban en estufa a 37°C durante 48 horas, pasadas las cuales serán leídas las colonias revertientes en cada placa.

En el ensayo se incluirán dos controles: el primero conteniendo 100 µl de un cultivo de noche de cepa bacteriana TA 98, 100 µl de DMSO y 2 ml de agar blando que corresponde al control del estudio de mutágenos y el segundo, conteniendo 100 µl de cultivo de noche de la misma cepa bacteriana, 100 µl de DMSO y 735 µl de S9 mix que corresponde al control del estudio de premutágenos.

La actividad mutagénica final se calculó de acuerdo con Falck et al..

$$AM = \frac{RM-RC}{mM C}$$

Donde:

AM = actividad mutagénica

RM = nº colonias revertientes de la muestra

RC = nº colonias revertientes de la placa control

mM C = miliMoles de creatinina de la muestra de orina

2.2.5 DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO ACETILADOR EN ORINA.

Se realizó según la técnica descrita por Jessamine et al..

Para su determinación se administró una dosis única oral de 10 mg/kg de isoniacida. Se desechó la orina correspondiente a las 6 primeras horas tras la ingesta de la misma, recogién dose durante las dos horas siguientes, y una alícuota de ésta se usó para el análisis. Cuando la determinación no se realizó inmediatamente, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su procesamiento, que en ningún caso se pospuso más de un mes.

La metodología empleada fue la siguiente: las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y se tomaron 10 ml de orina, que fue sometida a centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se recogieron 4 ml de orina clara, la cual fue trasladada a un tubo de ensayo, al que se le añadieron 2 ml de ClH 0,5 N; se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

De la orina acidificada se tomaron dos alícuotas en tubos de test A y B, con 1'5 ml de dicha orina cada uno de ellos.

A continuación se añadió 1 gota (aprox. $\mu 50$) de anhídrido acético al tubo B y se agitó durante 1 minuto; se hizo lo mismo vertiendo una gota de NaOH 7 N. Para equilibrar el volumen de ambos tubos (A y B), se añadieron 2 gotas de agua destilada al tubo A.

Pasados 15 minutos de la acidificación de la orina, se añadieron 0'50 ml de NaOH 0'5 N a ambas alícuotas y se agitó suavemente. Se diluyeron con 8 ml de agua destilada, lo que equivalió a una dilución final de 1:10, siendo homogeneizada posteriormente.

Se tomaron 2 ml de cada una de las alícuotas diluidas y se vertieron en tubos de ensayo, añadiéndose más tarde 1 ml de tampón fosfato amortiguador 0'5 M. Seguidamente se añadieron 1 ml de cianuro potásico y 4 ml de cloramina T en ambos tubos y la mezcla se agitó suavemente.

Tras una espera de 90 segundos se vertieron 5 ml de acetona en cada tubo mezclándolos bien para disolver el precipitado.

Seguidamente se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos y se tomó el sobrenadante para medir la absorbancia de ambos tubos (A y B) a 550 nm en el espectrofotómetro, que previamente habíamos calibrado con 2 ml de agua destilada que sirvió de reactivo blanco.

La determinación del fenotipo acetilador se realizó según la fórmula propuesta por Eidus et al:

$$\% \text{ de acetilación} = \frac{\text{Absorbancia de la solución A} \text{ (isoniacida acetilada por el individuo)}}{\text{Absorbancia de la solución B} \text{ (isoniacida acetilada total)}}$$

Los individuos que presentaron un porcentaje de acetilación igual o superior a 70, se consideró que tenían un fenotipo acetilador rápido (FAR), y aquellos que presentaron un porcentaje de acetilación inferior a 70, que poseían un fenotipo acetilador lento (FAL).

2.2.6 DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO HIDROXILADOR EN ORINA.

El fenotipo oxidativo se determinó por una técnica de extracción por éter para cromatografía de gases con detector de ionización de llama de hidrógeno, siguiendo la técnica de Lennard et al.⁴⁵².

Tras la toma de una dosis única de 10 mg de debrisoquina (Declinax), se recogió una muestra de orina, transcurridas 8 horas desde su ingestión. Las muestras de orina fueron congeladas a -20°C hasta su posterior análisis, no excediendo en ninguno de los casos de más de tres meses.

Una vez descongeladas las muestras, manteniéndolas a temperatura ambiente, se procedió de la siguiente manera:

Incubación

Se tomó 1 ml de orina y se vertió en un tubo de vidrio de 10 ml con tapón de rosca, al que añadimos sucesivamente:

- 0'5 ml de solución saturada de NaHCO₃.
- 0'5 ml de metanol.
- 75 µl de hemisulfato de guanoxán (PFIZER), que se añadió con microjeringa de vidrio de 100 µl (es muy importante la exactitud de esta medida, ya que es el estándar interno).
- 0'5 ml de acetilacetona.

La mezcla así obtenida se agita en un vortex durante 15 segundos, y se introduce en una baño de agua con agitación a 50°C, durante 16 horas. En esta fase se preparan las muestras para que, durante el tiempo de incubación, la acetilacetona reaccione con un radical que poseen la debrisoquina, la 4-hidroxidebrisoquina y el guanoxán, para formar un derivado pirimidínico, el cual es soluble en solventes orgánicos y puede detectarse por cromatografía de gases. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Extracción

Tras el período de incubación, los mencionados compuestos deben ser extraídos. Para separarlos de los residuos orgánicos procedemos del siguiente modo:

Tras añadir 5 ml de dietiléter, con pipeta de vidrio, se agitó enérgicamente durante 15 segundos en un vortex. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos en una centrífuga Hettich Universal 2S, con el fin de separar la fase orgánica de la fase acuosa.

Tras extraer la fase superior (la del éter) con pipeta Pasteur y ponerla en tubos cónicos (con tapón de vidrio esmerilado), se añadieron 250 µl de ClH 4M y se agitó durante 15 segundos en un vortex. Se dejó reposar y se formaron dos nuevas fases. Separamos la fase inferior acuosa, en la cual se disuelven los compuestos formados, para ponerla en nuevos tubos de vidrio con pipeta Pasteur, desechando el éter. Los posibles restos de éter que pudieran haber sido trasladados en el paso anterior, se eliminaron colocando las muestras en un baño de agua a 56°C, durante 10-15 minutos.

Tras añadir 350 µl de una solución de NaOH 4M, para neutralizar la acidez del ClH, se adicionaron 40 µl de disulfuro de carbono (S₂C) con microjeringa de vidrio. Este solvente orgánico nos servirá de soporte para la inyección en el cromatógrafo de los derivados pirimidínicos.

Se agitaron de nuevo los tubos en vortex durante 15 seg. (este paso debe hacerse con los tubos tapados, dada la gran volatilidad del S₂C) y, posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500-2000 rpm, para que la gota de S₂C, que contiene disueltos los compuestos pirimidínicos formados por la debrisoquina, el 4-hidroxidebrisoquina y el guanoxán se deposite en el vértice del tubo cónico.

Por último, se tomaron 0.1 de la muestra con una microjeringa Hamilton de vidrio y se inyectaron en el cromatógrafo de gases GCD (Chromatograph PYE-UNICAM, equipado con detector de ionización de llama).

Finalmente se obtienen unos cromatogramas en los que se identifican 3 picos que, según la técnica de Lennard et al., aparecen tras un tiempo de retención de 1.2 minutos para la debrisoquina, 2.8 minutos para el guanoxán y 3.2 minutos para la 4-hidroxidebrisoquina. El pico de la debrisoquina es el que se identifica con más dificultad, ya que pueden formarse derivados de la 3,4-dihidro-1-metil-2(H)-isoquinolinocarboxamida que tienen un tiempo de retención similar. Ver Figura 15.

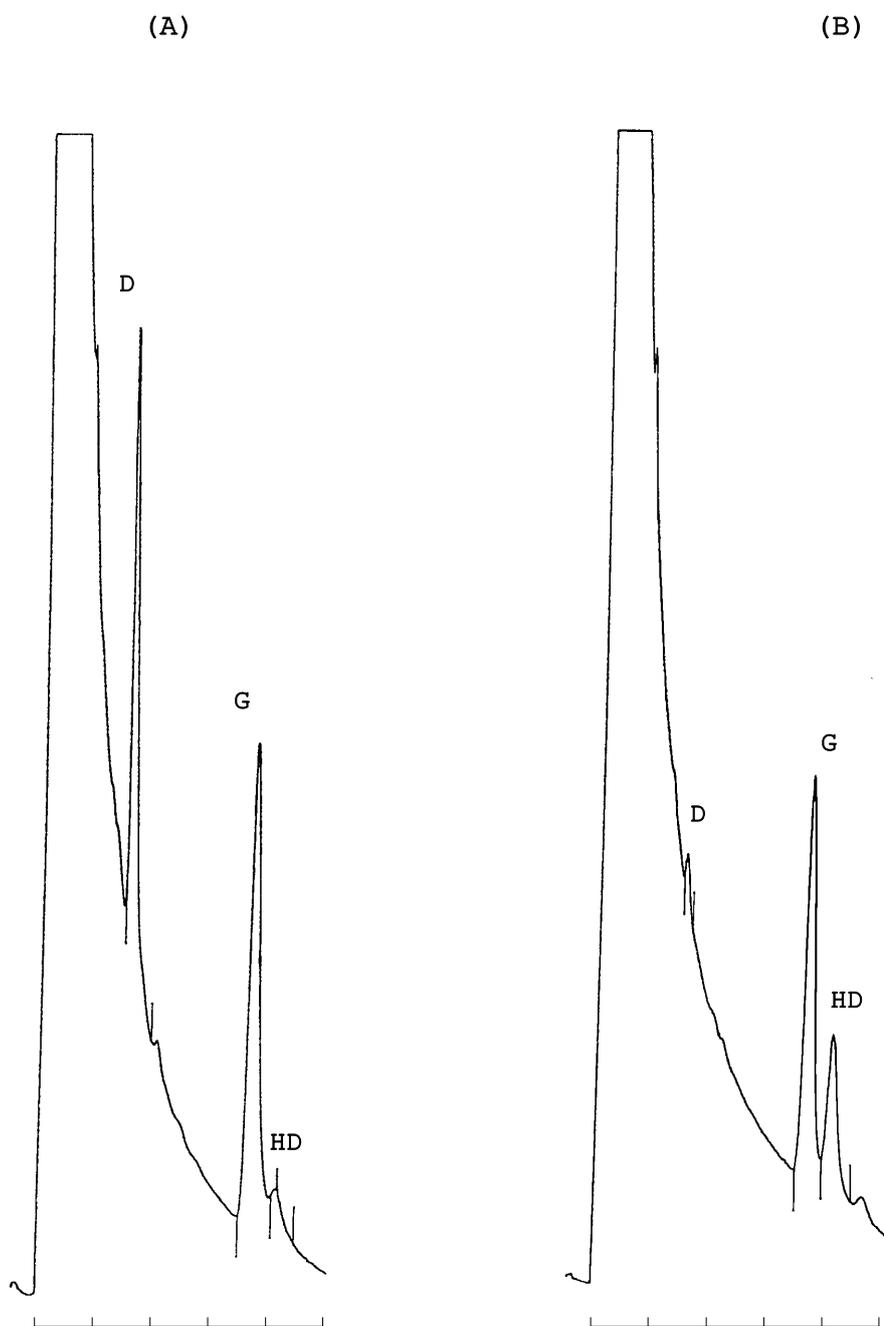


Figura 15. Cromatogramas correspondientes a un hidroxilador lento (A) y uno rápido (B). Los picos corresponden a debrisoquina (D), guanoxán (G) y 4-hydroxidebrisoquina (HD).

Hay que tener en cuenta que el tamaño de los picos depende de muchos factores, como la temperatura del aparato, el grado de pureza de los gases reactivos y sobre todo de la atenuación eléctrica del aparato (que en ocasiones hay que modificar) y de la calidad de la inyección. Para evitar dichos factores y conseguir una homogeneidad y reproductibilidad de los resultados, se utiliza el estándar interno (guanoxán), que tiene una estructura química similar a la de los compuestos a detectar, y que, como ya se comentó, se añade al comienzo de la técnica.

Los gases utilizados son: hidrógeno de calidad para producir la llama del detector, aire sintético puro como soporte a la combustión del hidrógeno y nitrógeno como transportador.

Las condiciones de funcionamiento son: una temperatura constante de 250°C en el inyector, columna y detector; unos flujos de gases de 60 ml/min. para el Hidrógeno, 240 ml/min. para el aire sintético puro y 50 ml/min para el nitrógeno.

Para calcular el índice metabólico, se procede a la medición de la altura de los picos del cromatograma, transformando estas medidas de longitud en unidades de concentración, utilizando una curva patrón.

Finalmente, relacionando el porcentaje de 4-hidroxidebrisoquina con el de debrisoquina, obtendremos el índice metabólico (MR).

$$MR = \frac{\% \text{ dosis eliminada como DB}}{\% \text{ dosis eliminada como 4-OH-DB}}$$

Se considerarán hidroxiladores lentos de debrisoquina a los individuos cuyo índice metabólico sea superior a 12.6, siendo hidroxiladores rápidos aquellos que no superen dicho límite.

2.2.7 MÉTODO ESTADÍSTICO.

El estudio estadístico de las diferentes pruebas realizadas se efectuó siguiendo el método de J.L.Carrasco de la Peña⁴⁵³, con el programa estadístico StatView para Macintosh y el paquete estadístico BMDP (versión PC 90).

Como primera medida exploratoria de las variables se realizó un análisis factorial (multivariante) para ver las relaciones generales existentes entre las variables.

- Comparación de medias.

Como paso previo se realizó el test de Shapiro y Wilk (que utiliza el estadístico w), que permitió comprobar si cada una de las variables utilizadas en nuestro estudio se ajustaba o no a la normal.

La hipótesis que se siguió fue la de considerar a la media poblacional como la muestral y a la desviación típica poblacional como la muestral.

Tras aplicar el test de Levene para comprobar que las varianzas eran homogéneas, en las variables que seguían una distribución normal se aplicó el análisis de la varianza o Anova, donde F nos proporcionó la probabilidad p .

Con los datos que no seguían una distribución normal se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde H nos proporcionó la probabilidad p .

Para el contraste entre grupos, aplicamos la t de Student para datos no apareados, donde t nos proporcionó la probabilidad p .

En el caso de las variables que no se ajustaban a la normal, para el contraste entre grupos se aplicó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney, donde Z nos dio la

probabilidad **p**.

En otros casos aplicamos una tabla de contingencia con el test de χ^2 , o el test exacto de Fisher cuando fue posible realizar una matriz 2x2.

En el caso de las aberraciones cromosómicas, como su frecuencia fue baja, se intentaron varias transformaciones de la variable x, sin conseguir normalizar las varianzas, por lo que, para su estudio, se utilizaron test no paramétricos. Las transformaciones utilizadas fueron:

$$\sqrt{(x+1)}, \frac{\sqrt{(x)} + \sqrt{(x+1)}}{2}, \ln(x+1), \arcsin$$

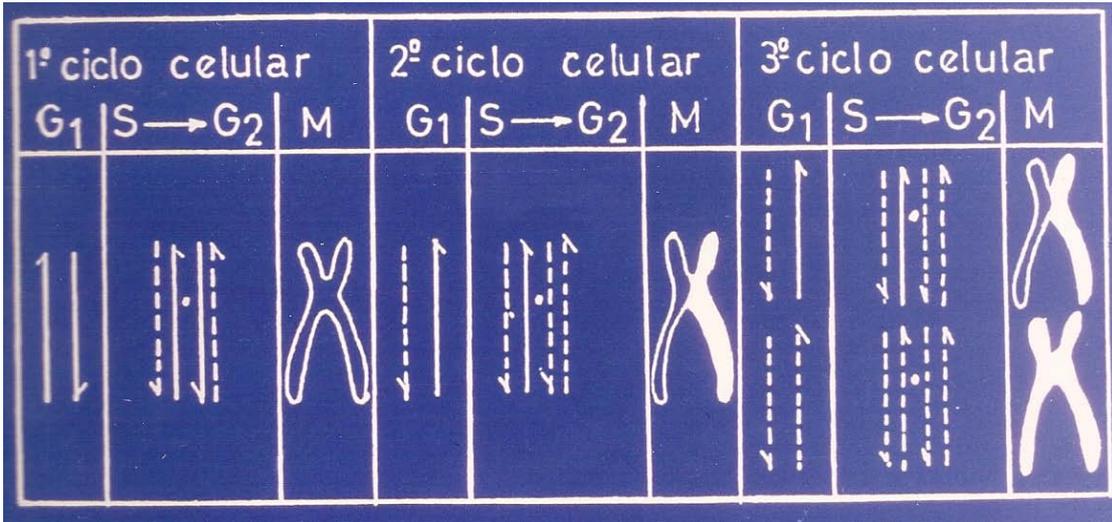
- **Correlaciones.**

Para el estudio de las correlaciones entre parámetros se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (**r**) para las variables continuas, y el coeficiente de correlación de Spearman (**r**) para las variables no continuas.

En todos los casos, el nivel exigido para el rechazo de la hipótesis fue del 95 % ($p < 0.05$).

En las representaciones gráficas de todos los contrastes entre medias realizados, se representó el grado de significación de la probabilidad por medio de asteriscos, según el siguiente criterio:

* : $p < 0.05$
** : $p < 0.01$
*** : $p < 0.001$



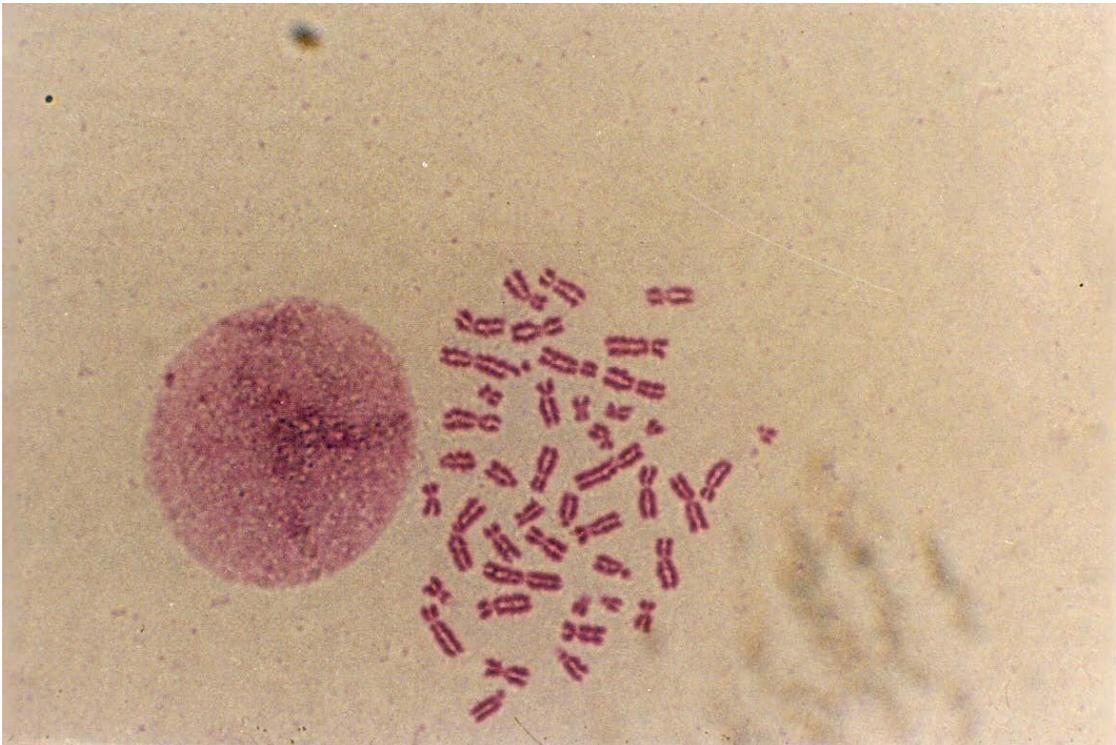
Microfotografía 1. Esquema del método de marcaje con BrdUrd para el análisis de la cinética celular y los SCEs.



Microfotografía 2. Metafase en segundo ciclo celular tras la adición de BrdUrd, donde se aprecian SCEs.



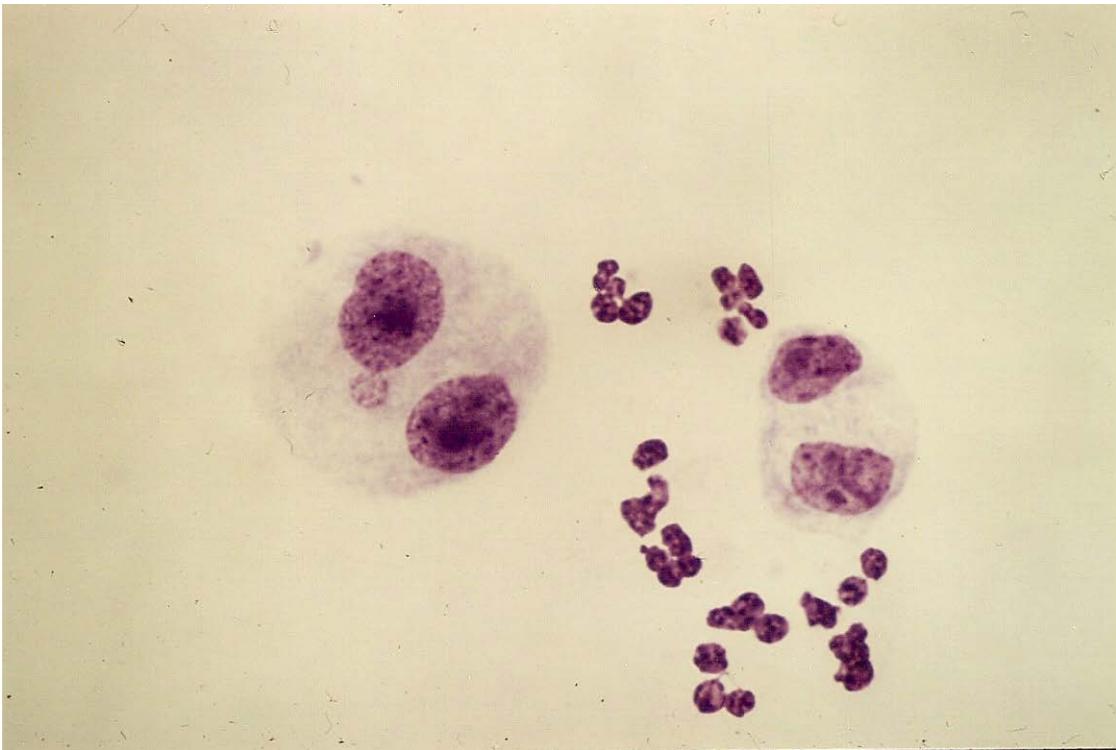
Microfotografía 3. Metafase con un cromosoma radial.



Microfotografía 4. Metafase mostrando rotura cromosómica.



Microfotografía 5. Metafase con cromosomas dicéntricos.



Microfotografía 6. Célula binucleada con micronúcleo.

3. RESULTADOS

3.1 AJUSTE ESTADÍSTICO

3.1.1 ESTUDIO DE LA POSIBLE INTERFERENCIA DE LA EDAD.

En el análisis de la varianza de los grupos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

A partir de los datos reflejados en las tablas I, II y III, se han obtenido los siguientes datos estadísticos:

TABLA 15. Medida estadística de la edad en los distintos grupos.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	58.73	11.04	2.01	34-74	70
II	30	59.03	9.65	1.76	35-73	70
III	40	60.90	9.15	1.44	37-73	71

Al realizar el contraste entre los distintos grupos se obtuvieron los siguientes resultados:

Entre I y II: $Z=-0.11$ $p > 0.05$

Entre I y III: $Z=-0.69$ $p > 0.05$

Entre II y III: $Z=-0.74$ $p > 0.05$

Se trata, por tanto, de grupos de población homogéneos respecto a la edad, según puede observarse en la Figura 16, lo que hace que la edad no interfiera en los resultados.

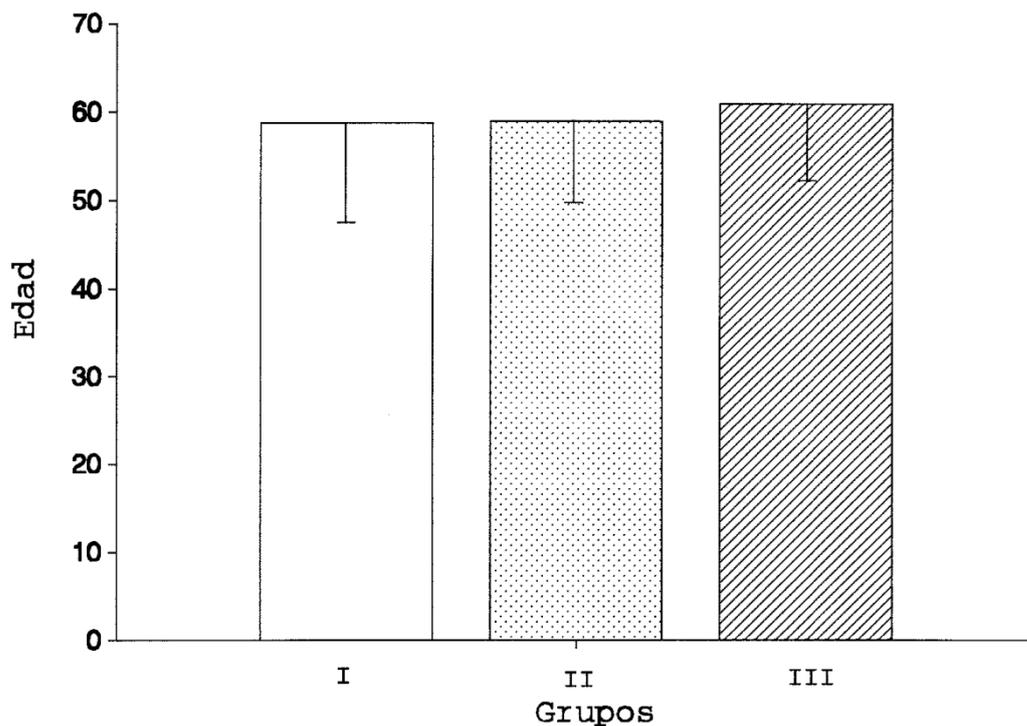


Figura 16. Medias y DE de la Edad en los distintos grupos.

3.1.2 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LA INFLUENCIA DEL TABACO Y VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TABAQUISMO (EN AÑOS) SOBRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS.

TABLA 16. Estudio estadístico de la duración del hábito tabáquico (en años).

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
II	30	37.46	9.88	1.80	20-52	50
III	40	42.07	9.07	1.43	24-60	52,5

Al realizar el contraste entre ambos grupos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Entre II y III: $Z = -1.78$ $p > 0.05$

3.1.2.1 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE EL GLUTATIÓN REDUCIDO EN ERITROCITOS (GSH).

A partir de los datos reflejados en las tablas IV, V y VI, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 17. Medidas estadísticas del glutati3n reducido eritrocitario.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	4.87	1.31	0.23	2.67-7.67	6.71
II	30	6.03	2.08	0.38	2.43-11.43	9.04
III	40	5.69	1.87	0.29	1.76-10.80	8.13

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II: t=-2.57 **p < 0.05**
 Entre I y III: t=-2.14 p > 0.05
 Entre II y III: t= 0.70 p > 0.05

Existe un aumento significativo de los niveles de GSH en el grupo de sanos fumadores al compararlo con los sanos no fumadores, seg3n se puede ver en la Figura 17.

Al valorar la influencia del tiempo del h3bito tab3quico sobre el GSH, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II r=-0.014
 Grupo III r=0.145

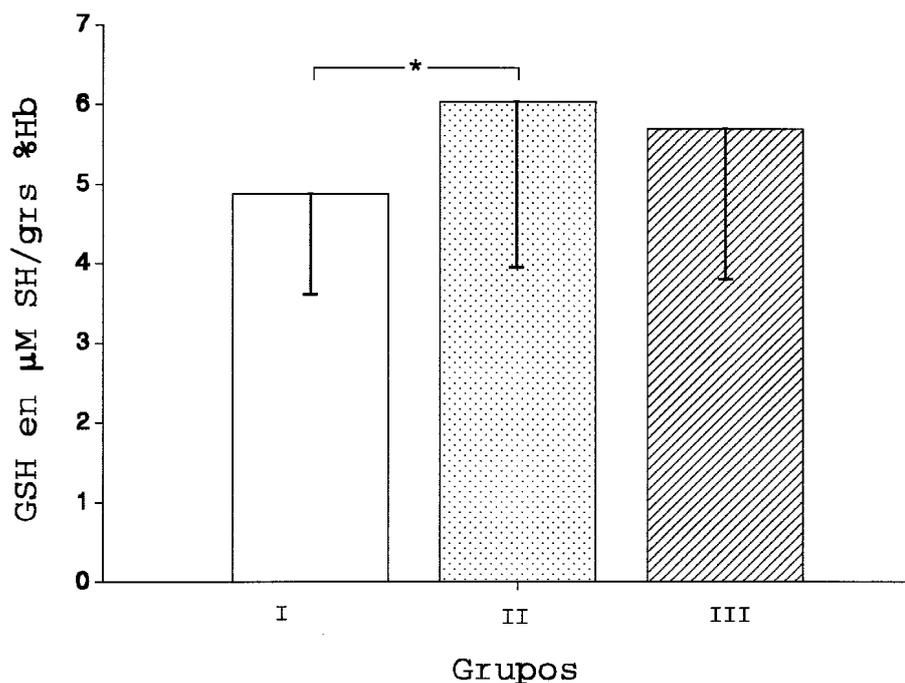


Figura 17. Medias y DE del GSH en los distintos grupos.

3.1.2.2 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LA ELIMINACIÓN DE TIOÉTERES URINARIOS (TU).

A partir de los datos reflejados en las tablas IV, V y VI, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 18. Medidas estadísticas de tioéteres urinarios.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	3.75	1.71	0.31	1.16-6.66	5.98
II	30	7.63	3.12	0.57	2.60-14.90	11.60
III	40	4.64	3.15	0.49	1.10-15.16	10.00

El contraste realizado entre los distintos grupos, arrojó los siguientes resultados:

Entre I y II	Z=-4.99	p<0.0001
Entre I y III	Z=-0.62	p>0.05
Entre II y III	Z=-4.14	p<0.0001

Hubo un aumento estadísticamente significativo de la eliminación de TU en el grupo II respecto al I, así como una disminución significativa de los mismos en el grupo III respecto al grupo II, según podemos ver en la Figura 18.

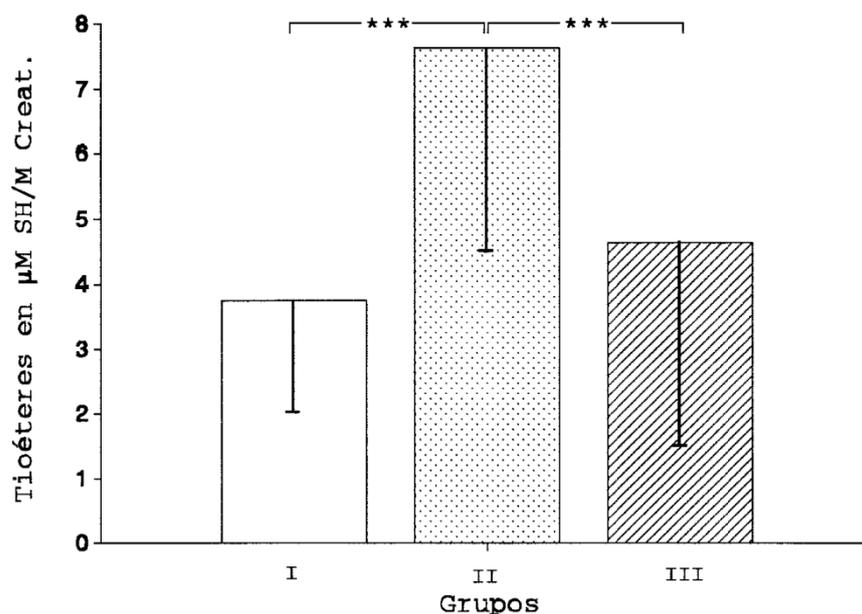


Figura 18. Medias y DE de Tioéteres Urinarios en los distintos grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre los TU, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II. r=0.377

Grupo III. r=0.167

En el grupo II hay una relación, aunque no muy fuerte, mientras que en el grupo III no existe tal relación.

3.1.2.3 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LA EXCRECIÓN DE PREMUTÁGENOS EN ORINA.

A partir de los datos reflejados en las tablas IV, V y VI, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 19. Medidas estadísticas de premutágenos en orina.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	1.84	1.95	0.35	0.20-9.27	3.33
II	30	6.84	4.34	0.79	1.11-19.00	14.12
III	40	2.34	3.07	0.48	0.00-15.65	5.55

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II.	Z=-5.59	p<0.0001
Entre I y III	Z=-0.44	p>0.05
Entre II y III	Z=-5.07	p<0.0001

El grupo II mostró un aumento estadísticamente significativo de premutágenos en orina al compararlo con el grupo I y con el III; al comparar el grupo I con el III, no se encontraron diferencias, como queda reflejado en la Figura 19.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre la excreción de premutágenos por orina, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II.	r=-0.008
Grupo III.	r=-0.019

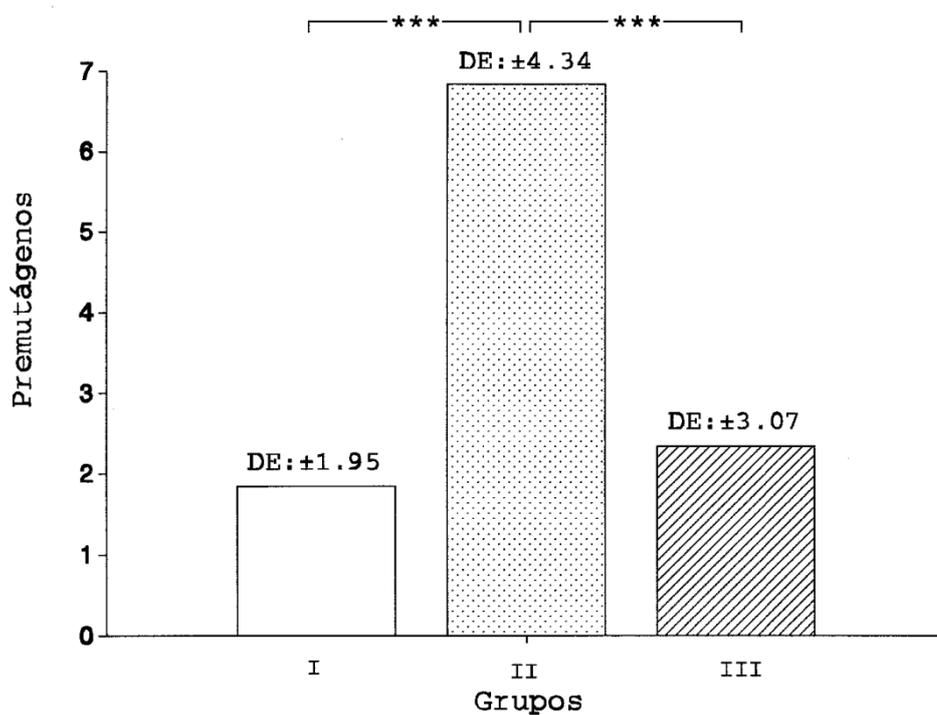


Figura 19. Medias y DE de Premutágenos en los distintos grupos.

3.1.2.4 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LA EXCRECIÓN DE MUTÁGENOS POR ORINA.

A partir de los datos reflejados en las tablas IV, V y VI, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 20. Medidas estadísticas de mutágenos en orina.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	0.89	1.34	0.24	0.00-6.29	2.13
II	30	0.94	1.45	0.22	0.00-8.12	1.75
III	40	0.48	0.68	0.10	0.00-3.44	1.25

Del contraste realizado entre los distintos grupos obtuvimos los siguientes resultados:

Entre I y II.	Z=-0.88	p>0.05
Entre I y III.	Z=-1.75	p>0.05
Entre II y III	Z=-2.70	p<0.01

Existió una menor excreción de mutágenos en el grupo III, que solo alcanzó significación estadística al compararlo con el grupo II, según podemos ver en la Figura 20.

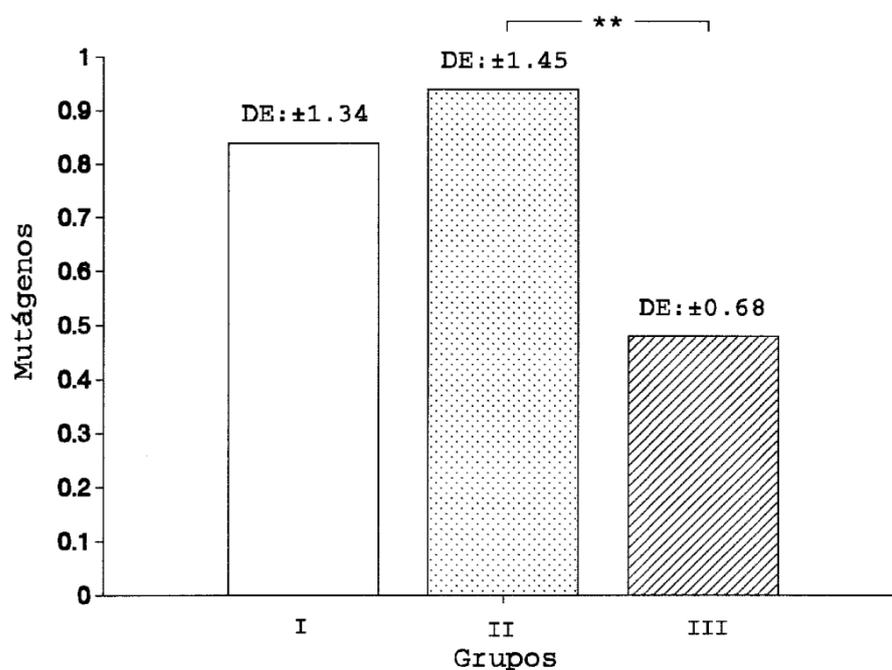


Figura 20. Medias y DE de los Mutágenos en los distintos grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre la excreción de mutágenos, obtuvimos los siguientes resultados:

Grupo II.	r=0.261
Grupo III.	r=-0.338

3.1.2.5 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDES HERMANAS (SCEs).

A partir de los datos reflejados en las tablas VII, VIII y IX, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 21. Medidas estadísticas de los intercambios entre cromátides hermanas.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	6.16	0.77	0.14	4.9-7.8	7.37
II	30	6.83	1.28	0.23	4.6-9.9	8.58
III	40	7.61	0.94	0.14	5.8-10.2	8.70

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II.	t=-2.43	p>0.05
Entre I y III	t=-7.05	p<0.001
Entre II y III	t=-2.82	p<0.05

Observamos un aumento estadísticamente significativo de SCEs en el grupo III al compararlo, tanto con el grupo I como con el II, como puede verse en la Figura 21.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre los SCE, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II.	r=0.114
Grupo III.	r=0.156

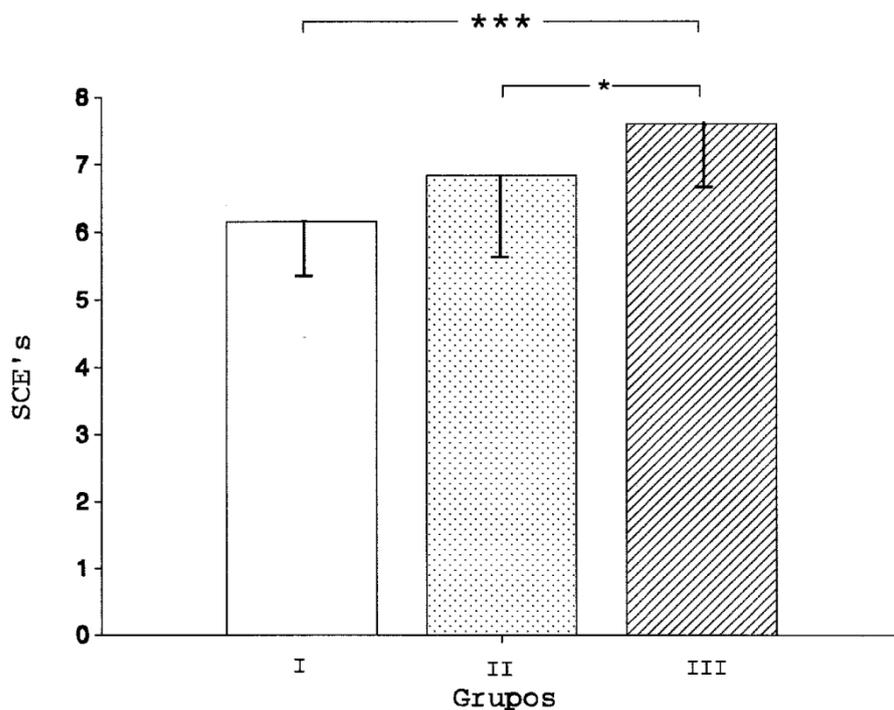


Figura 21. Medias y DE de los SCEs en los distintos grupos.

3.1.2.6 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PRI).

A partir de los datos reflejados en las tablas VII, VIII y IX, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 22. Medidas estadísticas del (PRI).

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	1.46	0.23	0.04	1.07-1.80	1.74
II	30	1.44	0.26	0.04	1.07-1.85	1.78
III	40	1.29	0.18	0.03	1.04-1.75	1.61

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II.	Z=-0.25	p>0.05
Entre I y III	Z=-2.92	p<0.01
Entre II y III	Z=-2.05	p<0.05

Encontramos una disminución estadísticamente significativa del PRI en el grupo III, al compararlo con el grupo I y con el II, como se puede apreciar en la Figura 22.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre los PRI, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II.	r=0.350
Grupo III.	r=0.048

En el grupo II existió una correlación, aunque no muy fuerte, mientras que en el III no existió tal correlación.

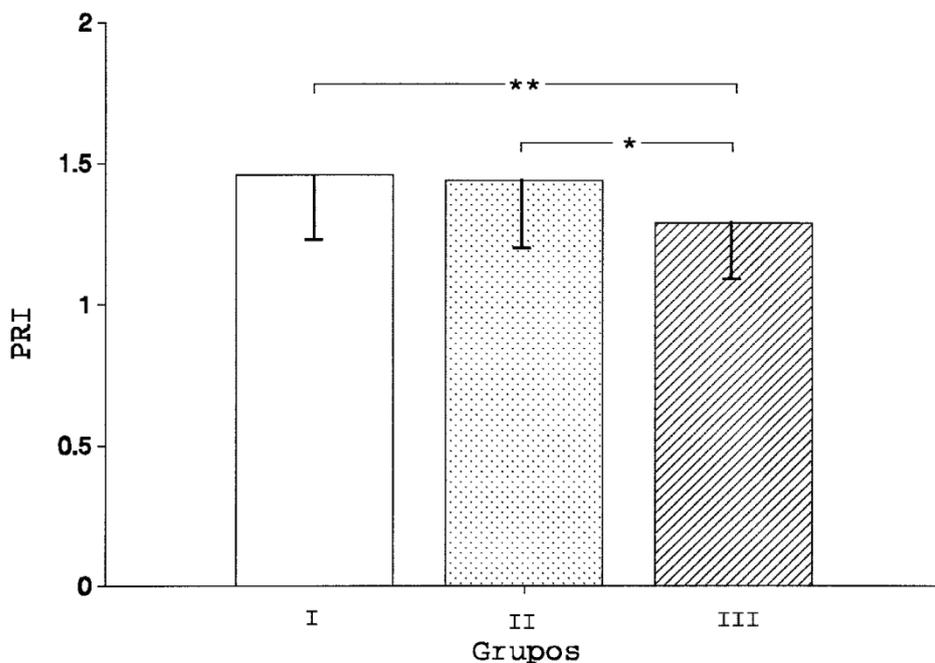


Figura 22. Medias y DE de los PRI en los distintos grupos.

3.1.2.7 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LA FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS (MN).

A partir de los datos reflejados en las tablas VII, VIII y IX, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 23. Medidas estadísticas de micronúcleos (MN).

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	7.66	4.26	0.77	1-19	13.00
II	30	11.20	4.99	0.91	3-24	18.50
III	40	22.47	7.63	1.20	10-48	32.00

El contraste realizado entre los distintos grupos arrojó los siguientes resultados:

Entre I y II.	t=-2.95	p<0.05
Entre I y III	t=-10.31	p<0.001
Entre II y III	t=-7.45	p<0.001

Existió un valor más elevado, y estadísticamente significativo, en el grupo III respecto a los otros dos grupos, así como cifras más elevadas de MN en el grupo II respecto al I, como puede observarse en la Figura 23.

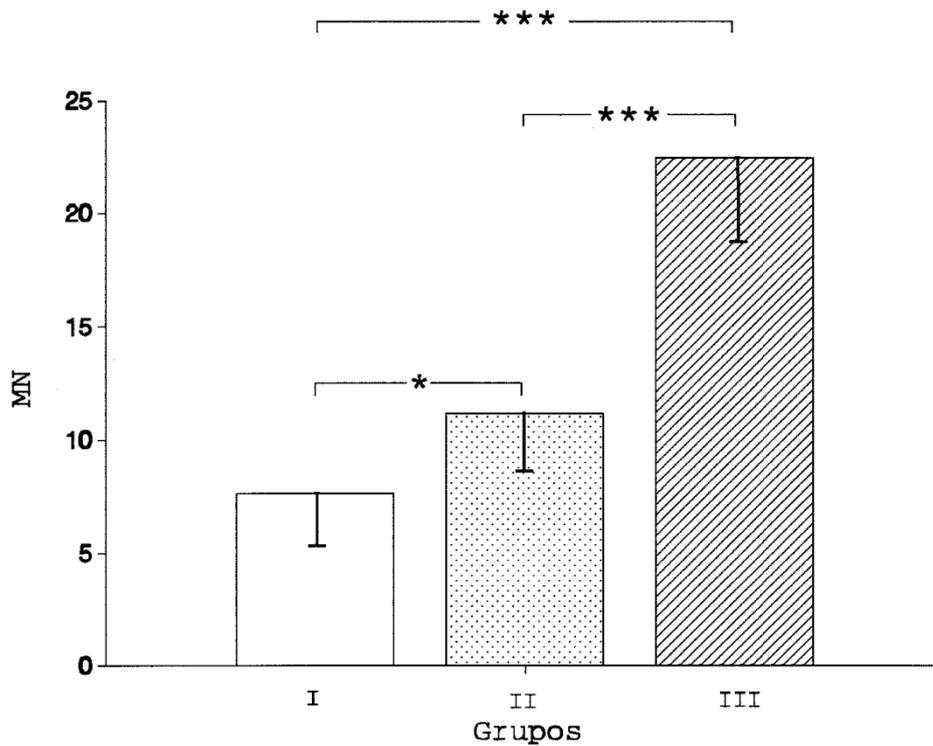


Figura 23. Medias y DE de los Micronúcleos en los distintos grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre los micronúcleos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II. $r=-0.025$

Grupo III. $r=-0.023$

3.1.2.8 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE EL ÍNDICE MITÓTICO (IM).

A partir de los datos reflejados en las tablas VII, VIII y IX, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 24. Medidas estadísticas del índice mitótico (IM).

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	30	14.06	9.94	1.81	3-50	26.00
II	30	14.66	12.43	2.27	5-68	26.00
III	40	22.32	8.33	1.31	2-44	31.50

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II: Z=-0.03 p>0.05
 Entre I y III: Z=-3.98 **p<0.0001**
 Entre II y III: Z=-3.93 **p<0.0001**

Existió un aumento estadísticamente significativo del IM en el grupo III, al compararlo con el grupo I y con el II, según se aprecia en la Figura 24.

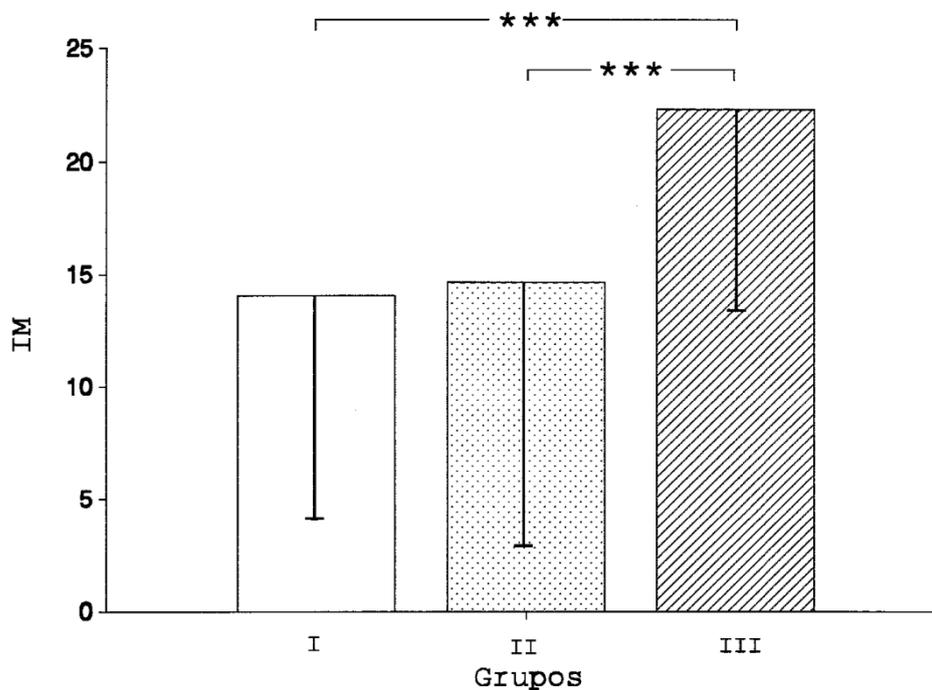


Figura 24. Medias y DE del Índice Mitótico en los distintos grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre el IM, obtuvimos los siguientes resultados:

Grupo II. r= 0.088
 Grupo III. r=-0.158

3.1.2.9 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LAS ABERRACIONES TIPO CROMATÍDICO (ROTURAS).

A partir de los datos reflejados en las tablas X, XI y XII, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 25. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromatídico (roturas).

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	0.57	0.74	0.16	0-3	1.00
II	28	0.75	0.75	0.14	0-2	2.00
III	40	1.02	1.02	1.62	0-4	2.00

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II Z=-0.85 p>0.05
 Entre I y III Z=-1.60 p>0.05
 Entre II y III Z=-0.88 p>0.05

Los valores más altos de aberraciones cromatídicas (roturas) se encontraron en el grupo III, si bien no mostraron significación estadística. Ver Figura 25.

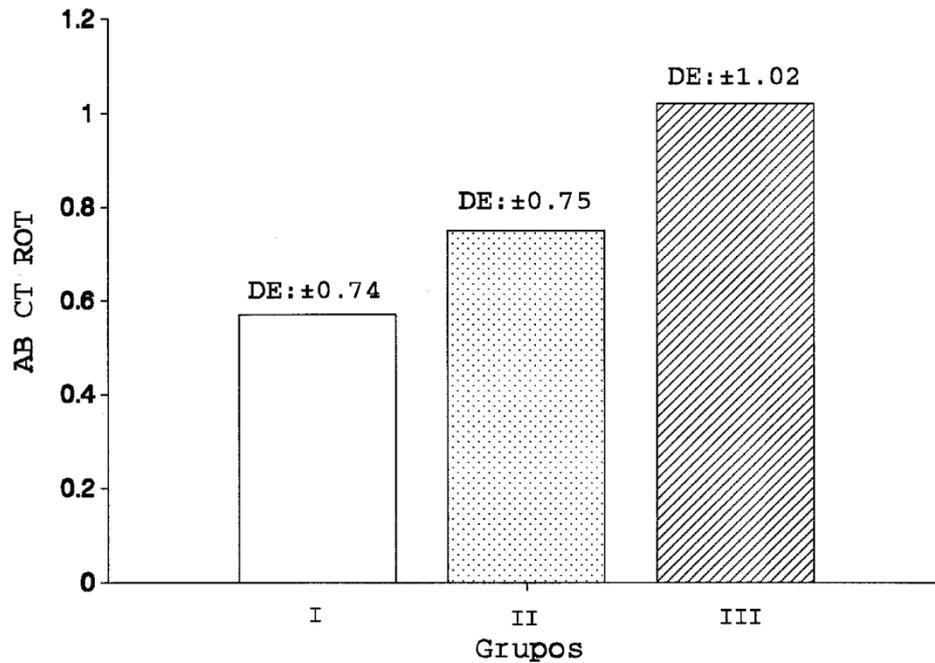


Figura 25. Medias y DE de las aberraciones tipo cromatídico (roturas) en los distintos grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre las aberraciones tipo cromatídico (roturas), se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	$r=0.286$
Grupo III	$r=0.201$

3.1.2.10 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LAS ABERRACIONES TIPO CROMATÍDICO (RADIALES).

A partir de los datos reflejados en las tablas X, XI y XII, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 26. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromatídico (radiales).

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	0.28	0.56	0.12	0-2	1.00
II	28	0.32	0.54	0.10	0-2	1.00
III	40	0.32	0.57	0.09	0-2	1.00

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II	Z=-0.25	p>0.05
Entre I y III	Z=-0.22	p>0.05
Entre II y III	Z=-0.04	p>0.05

No existieron diferencias estadísticamente significativas al proceder al contraste de grupos. Ver figura 26.

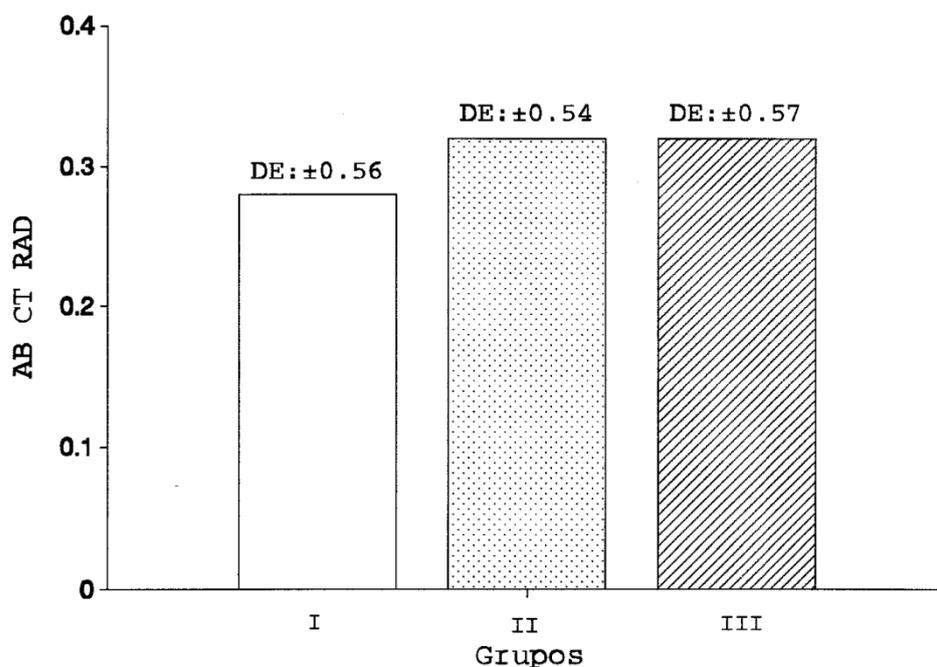


Figura 26. Medias y DE de las aberraciones tipo cromatídico (radiales) en los distintos grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre las aberraciones cromatídicas radiales, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II r=0.15
 Grupo III r=-0.15

3.1.2.11 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LAS ABERRACIONES TIPO CROMOSÓMICO (ROTURAS).

A partir de los datos reflejados en las tablas X, XI y XII, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 27. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromosómico (roturas).

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	0.09	0.30	0.06	0-1	0.40
II	28	0.17	0.39	0.07	0-1	1.00
III	40	2.22	1.59	0.25	0-7	4.50

El contraste realizado entre los distintos grupos, arrojó los siguientes resultados:

Entre I y II Z=-0.49 p>0.05
 Entre I y III Z=-5.67 **p<0.0001**
 Entre II y III Z=-5.98 **p<0.0001**

Existió un aumento estadísticamente significativo de las aberraciones tipo cromosómico (roturas) en el grupo III, con respecto al grupo I y II. No existieron diferencias significativas al comparar el grupo I y el II. Ver Figura 27.

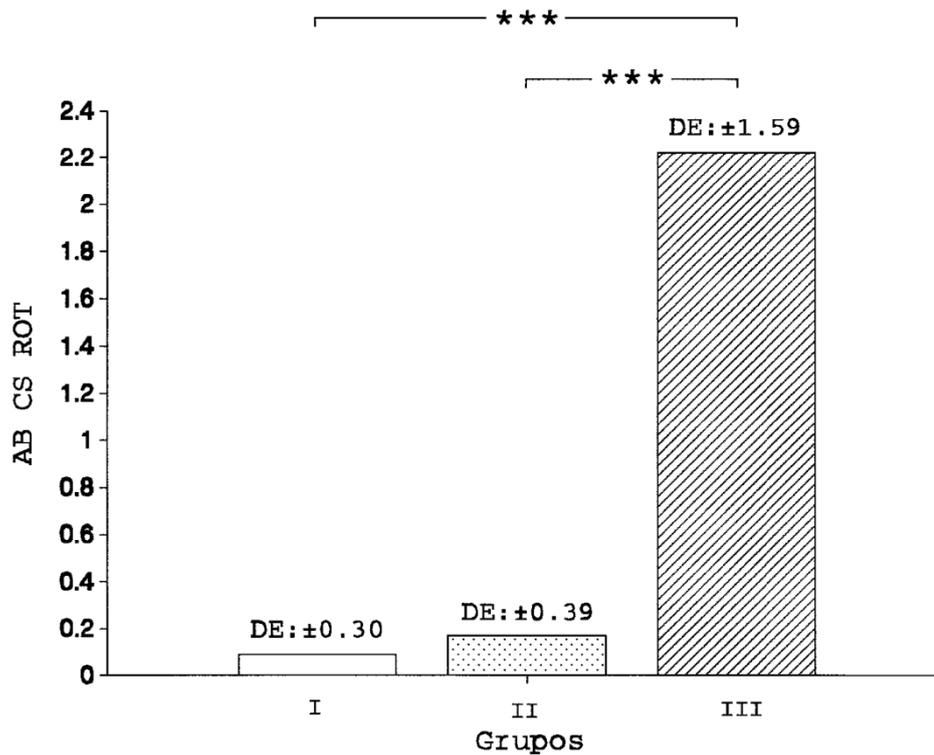


Figura 27. Medias y DE de las aberraciones tipo cromosómico (roturas) en los distintos grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre las aberraciones cromosómicas (roturas), se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	$r=0.07$
Grupo III	$r=0.15$

3.1.2.12 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LAS ABERRACIONES TIPO CROMOSÓMICO (ANILLOS, DICÉNTRICOS...).

A partir de los datos reflejados en las tablas X, XI y XII, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 28. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromosómico (anillos, dicéntricos...)

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	0.28	0.46	0.10	0-1	1.00
II	28	0.28	0.46	0.08	0-1	1.00
III	40	0.27	0.50	0.08	0-2	1.00

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II	Z=0.00	p>0.05
Entre I y III	Z=-0.18	p>0.05
Entre II y III	Z=-0.19	p>0.05

No existieron diferencias estadísticamente significativas al proceder al contraste de grupos. Ver Figura 28.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre las aberraciones cromosómicas (anillos, dicéntricos,...), se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	r=0.32
Grupo III	r=0.31

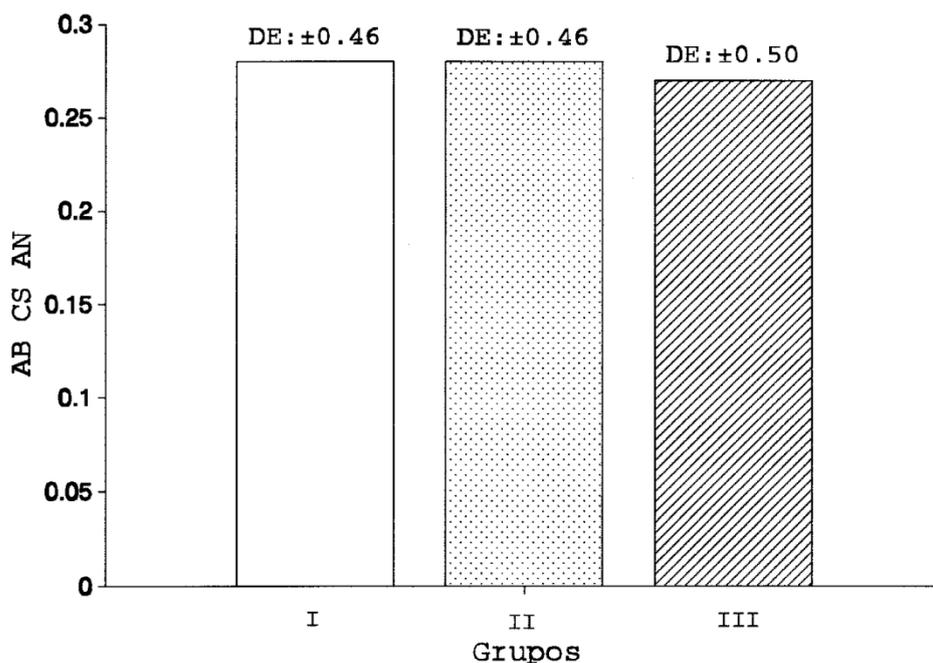


Figura 28. Medias y DE de las aberraciones tipo cromosómico (anillos, dicéntricos,..) en los distintos grupos.

3.1.2.13 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LOS GAPS CROMATÍDICOS, CROMOSÓMICOS Y TOTALES.

A partir de los datos reflejados en las tablas XIII, XIV y XV, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 29. Medidas estadísticas de los gaps cromatídicos.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	0.95	0.86	0.18	0-3	2.00
II	28	1.21	1.03	0.19	0-4	2.70
III	40	1.57	1.15	0.18	0-5	3.00

El contraste realizado entre los distintos grupos, nos proporcionó los siguientes resultados:

Entre I y II	Z=-0.77	p>0.05
Entre I y III	Z=-2.01	p>0.05
Entre II y III	Z=-1.30	p>0.05

Aunque encontramos los valores más altos en el grupo III, no existieron diferencias estadísticamente significativas al proceder al contraste de grupos. Ver Figura 29.

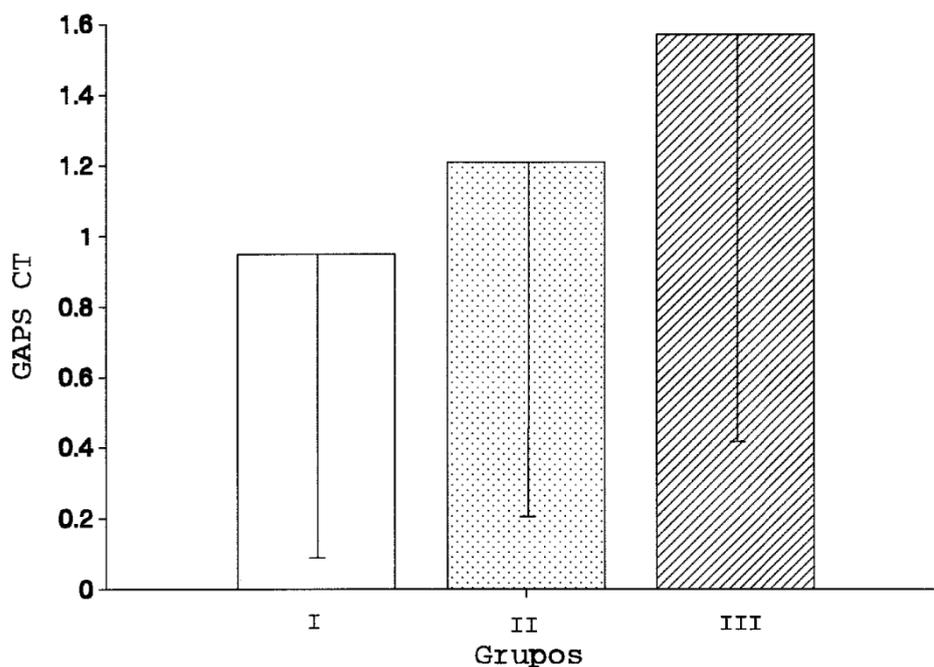


Figura 29. Medias y DE de los gaps cromatídicos en los diferentes grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre los gaps cromatídicos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	r=0.18
Grupo III	r=-0.01

TABLA 30. Medidas estadísticas de gaps cromosómicos.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	0.19	0.40	0.08	0-1	1.00
II	28	0.39	0.56	0.10	0-2	1.00
III	40	0.95	0.87	0.13	0-3	2.00

El contraste realizado entre los distintos grupos, arrojó los siguientes resultados:

Entre I y II	Z=-1.03	p>0.05
Entre I y III	Z=-3.33	p<0.001
Entre II y III	Z=-2.56	p<0.01

Existió un aumento estadísticamente significativo de los gaps cromosómicos en el grupo III, al contrastarlo con los grupos I y II; por el contrario, no existieron diferencias significativas entre los grupos I y II. Ver Figura 30.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre los gaps cromosómicos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	r=0.23
Grupo III	r=-0.15

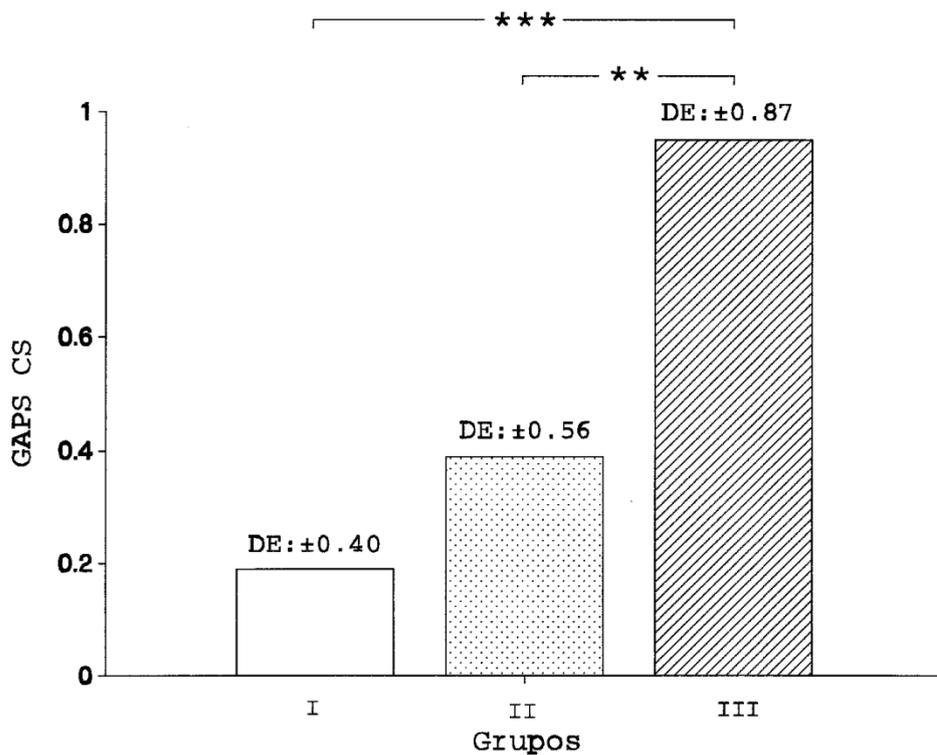


Figura 30. Medias y DE de los gaps cromosómicos en los diferentes grupos.

TABLA 31. Medidas estadísticas de gaps totales.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	1.14	0.96	0.21	0-4	2.00
II	28	1.60	1.22	0.23	0-4	3.70
III	40	2.52	1.37	0.21	1-7	4.00

El contraste realizado entre los distintos grupos nos dio los siguientes resultados:

Entre I y II	Z=-1.26	p>0.05
Entre I y III	Z=-3.84	p<0.001
Entre II y III	Z=-2.63	p<0.01

Existió un aumento estadísticamente significativo de los gaps totales en el grupo III, al contrastarlo con los

grupos I y II; por el contrario, no existieron diferencias significativas entre los grupos I y II. Ver Figura 31.

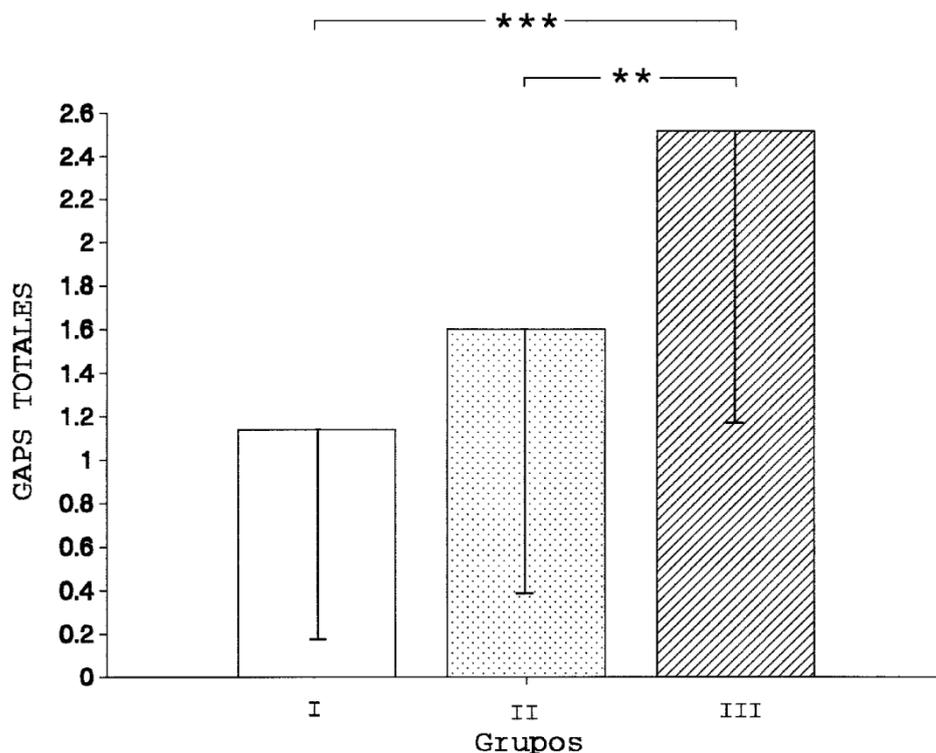


Figura 31. Medias y DE de los gaps totales en los diferentes grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre los gaps totales, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	$r=0.22$
Grupo III	$r=-0.10$

3.1.2.14 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LAS ABERRACIONES TOTALES, EXCLUYENDO LOS GAPS.

A partir de los datos reflejados en las tablas XIII, XIV y XV, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 32. Medidas estadísticas de las aberraciones totales excluyendo los gaps.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	1.23	1.17	0.25	0-3	3.00
II	28	1.57	1.10	0.21	0-4	3.00
III	40	3.85	2.04	0.32	0-9	6.50

El contraste realizado entre los distintos grupos, dio los siguientes resultados:

Entre I y II	Z=-0.97	p>0.05
Entre I y III	Z=-4.67	p<0.001
Entre II y III	Z=-4.69	p<0.001

Existió un aumento estadísticamente significativo de las aberraciones totales, excluyendo los gaps, en el grupo III, al contrastarlo con los grupos I y II; por el contrario, no existieron diferencias significativas entre los grupos I y II. Ver Figura 32.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre las aberraciones totales, excluyendo gaps, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	r=0.40
Grupo III	r=0.30

En ambos grupos existió una moderada correlación positiva.

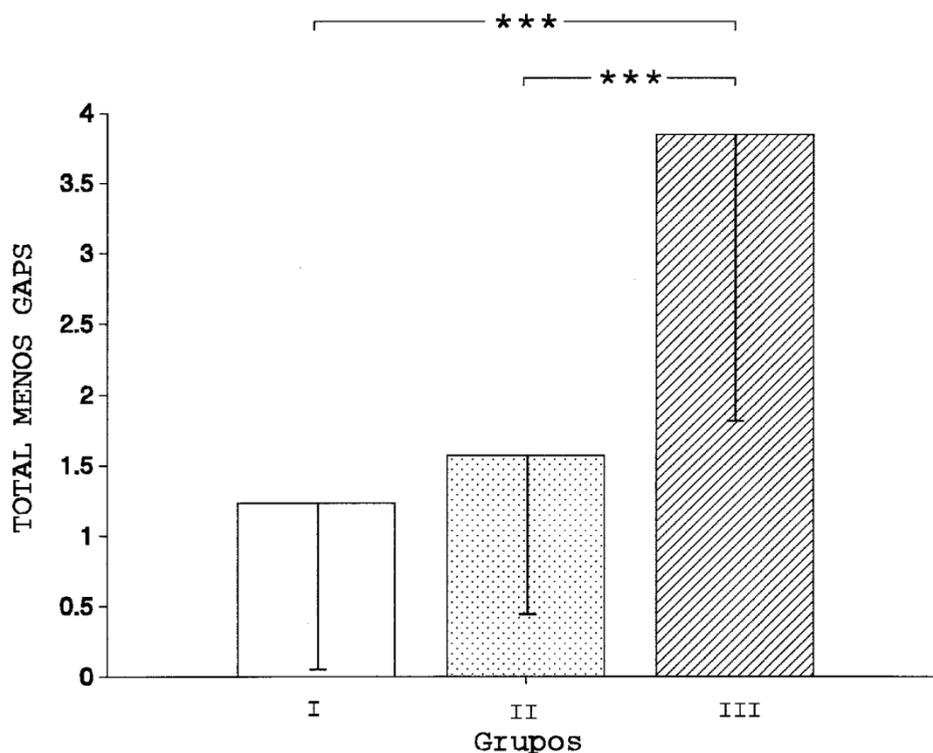


Figura 32. Medias y DE de las aberraciones totales, excluyendo los gaps, en los diferentes grupos

3.1.2.15 VALORACIÓN DEL EFECTO DEL TABACO SOBRE LAS ABERRACIONES TOTALES, INCLUYENDO LOS GAPS.

A partir de los datos reflejados en las tablas XIII, XIV y XV, se han obtenido los siguientes valores estadísticos:

TABLA 33. Medidas estadísticas de las aberraciones totales, incluyendo los gaps.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	21	2.38	1.32	0.28	0-5	4.40
II	28	3.18	1.74	0.32	0-6	5.70
III	40	6.37	2.40	0.38	2-13	9.50

El contraste realizado entre los distintos grupos, reflejó los siguientes resultados:

Entre I y II	t=-1.82	p>0.05
Entre I y III	t=-8.37	p<0.001
Entre II y III	t=-6.35	p<0.001

Existió un aumento estadísticamente significativo de las aberraciones totales, incluyendo gaps, en el grupo III, al contrastarlo con los grupos I y II; por el contrario, no existieron diferencias entre los grupos I y II. Ver Figura 33.

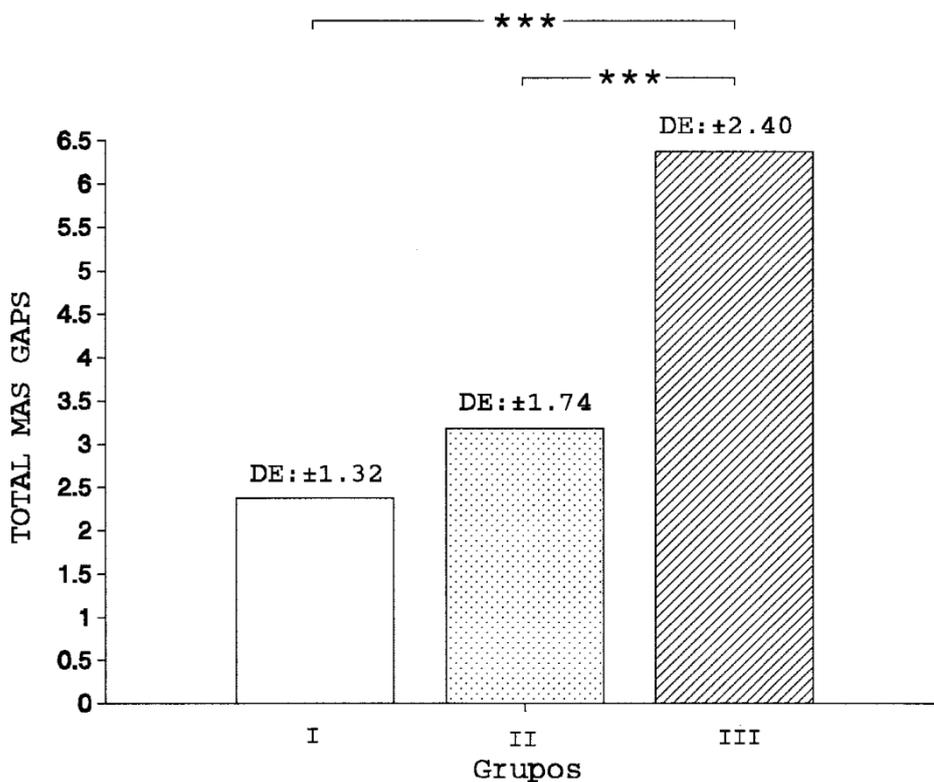


Figura 33. Medias y DE de las aberraciones totales, incluyendo los gaps, en los diferentes grupos.

Al valorar la influencia del tiempo del hábito tabáquico sobre las aberraciones totales, incluyendo gaps, se obtuvieron los siguientes resultados:

Grupo II	$r=0.35$
Grupo III	$r=0.09$

Encontramos una moderada correlación positiva en el grupo II, no hallándola en el grupo III.

3.1.3 VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TIPO DE TABACO (R-N) SOBRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS.

Los siguientes datos se han obtenido a partir de las Tablas II a la XV.

TABLA 34. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en los subgrupos de fumadores de tabaco rubio (R) y negro (N).

Subgrupos	n	m	DE	EE	Rango
GSH					
IIN	14	5.72	1.85	0.49	2.43-10.00
IIIN	32	5.56	1.89	0.33	1.76-10.80
IIR	16	6.30	2.30	0.57	3.76-11.43
IIIR	8	6.21	1.83	0.64	4.52-9.11
TU					
IIN	14	7.51	2.87	0.76	2.60-13.87
IIIN	32	4.56	2.84	0.50	1.10-11.60
IIR	16	7.74	3.41	0.85	2.63-14.90
IIIR	8	4.94	4.40	1.55	1.36-15.16
PMUT					
IIN	14	7.45	3.87	1.03	4.24-16.38
IIIN	32	2.32	3.17	0.56	0.00-15.65
IIR	16	6.29	4.77	1.19	1.11-19.00
IIIR	8	2.41	2.82	1.00	0.16-7.16
MUT					
IIN	14	0.86	0.62	0.16	0.09-2.06
IIIN	32	0.48	0.74	0.13	0.00-3.44
IIR	16	1.02	1.94	0.48	0.00-8.12
IIIR	8	0.47	0.46	0.16	0.08-1.50
SCEs					
IIN	14	6.30	0.91	0.24	4.70-7.61
IIIN	32	7.55	0.81	0.14	5.80-9.12
IIR	16	7.29	1.40	0.35	4.60-9.90
IIIR	8	7.86	1.39	0.49	6.00-10.20
PRI					
IIN	14	1.57	0.23	0.06	1.07-1.85
IIIN	32	1.30	0.20	0.03	1.04-1.75
IIR	16	1.32	0.24	0.06	1.07-1.79
IIIR	8	1.26	0.11	0.04	1.12-1.42
MN					
IIN	14	10.00	4.55	1.21	10-19
IIIN	32	22.43	7.66	1.35	10-48
IIR	16	12.25	5.26	1.31	6-24
IIIR	8	22.62	8.05	2.84	11-34
IM					
IIN	14	16.64	16.61	4.44	5-68
IIIN	32	22.28	9.04	1.60	2-44
IIR	16	12.93	7.27	1.81	5-26
IIIR	8	22.50	4.95	1.75	12-29

TABLA 34. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en los subgrupos de fumadores de tabaco rubio (R) y negro (N). (Continuación)

Subgrupos	n	m	DE	EE	Rango
Ab. tipo cromatídico (roturas)					
IIN	12	0.66	0.65	0.18	0-2
IIIN	32	1.06	1.07	0.19	0-4
IIR	16	0.81	0.83	0.20	0-2
IIIR	8	0.87	0.83	0.29	0-2
Ab. tipo cromatídico (radiales)					
IIN	12	0.16	0.38	0.11	0-1
IIIN	32	0.37	0.60	0.10	0-2
IIR	16	0.43	0.62	0.15	0-2
IIIR	8	0.12	0.35	0.12	0-1
Ab. tipo cromosómico (roturas)					
IIN	12	0.08	0.28	0.08	0-1
IIIN	32	2.43	1.66	0.29	0-7
IIR	16	0.25	0.44	0.11	0-1
IIIR	8	1.37	0.91	0.32	0-3
Ab. tipo cromosómico (anillos, dicéntricos)					
IIN	12	0.33	0.49	0.14	0-1
IIIN	32	0.25	0.50	0.09	0-2
IIR	16	0.25	0.44	0.11	0-1
IIIR	8	0.37	0.51	0.18	0-1
Total gaps (cromatídicos+cromosómicos)					
IIN	12	1.75	1.21	0.35	0-4
IIIN	32	2.28	1.02	0.18	1-4
IIR	16	1.50	1.26	0.31	0-4
IIIR	8	3.50	2.13	0.75	1-7
Gaps cromatídicos					
IIN	12	1.33	1.15	0.33	0-4
IIIN	32	1.37	0.90	0.16	0-3
IIR	16	1.12	0.95	0.23	0-3
IIIR	8	2.37	1.68	0.59	0-5
Gaps cromosómicos					
IIN	12	0.41	0.51	0.14	0-1
IIIN	32	0.90	0.85	0.15	0-3
IIR	16	0.37	0.61	0.15	0-2
IIIR	8	1.12	0.99	0.35	0-3
Ab. totales (excluyendo gaps)					
IIN	12	1.25	1.05	0.30	0-3
IIIN	32	4.12	2.04	0.36	0-9
IIR	16	1.81	1.10	0.27	0-4
IIIR	8	2.7	51.75	0.62	1-6
Ab. totales (incluyendo gaps)					
IIN	12	3	2	0.57	0-6
IIIN	32	6.40	2.04	0.36	3-12
IIR	16	3.31	1.58	0.39	1-6
IIIR	8	6.25	3.69	1.30	2-13

Al realizar el contraste de los valores de cada parámetro para ver la influencia del tipo de tabaco fumado (N/R) en el grupo II, se obtuvieron los siguientes resultados:

GSH	t=-0.74	p>0.05
TU	Z=-0.12	p>0.05
PMUT	Z=-1.49	p>0.05
MUT	Z=-1.06	p>0.05
SCE	t=-2.27	p<0.05
PRI	Z=-2.57	p<0.01
MN	t=-1.24	p>0.05
IM	Z=-0.35	p>0.05
AB CT ROT	Z=-0.34	p>0.05
AB CT RAD	Z=-0.97	p>0.05
AB CS ROT	Z=-0.74	p>0.05
AB CS AN	Z=-0.37	p>0.05
GAPS CT	Z=-0.46	p>0.05
GAPS CS	Z=-0.34	p>0.05
GAPS TOT	Z=-0.67	p>0.05
TOTAL-GAPS	Z=-1.03	p>0.05
TOTAL+GAPS	t=-0.46	p>0.05

Solo encontramos un aumento estadísticamente significativo de SCEs en fumadores de tabaco rubio, así como un aumento estadísticamente significativo del PRI en fumadores de tabaco negro.

Al realizar el contraste de los valores de cada parámetro para ver la influencia del tipo de tabaco fumado (N/R) en el grupo III, se obtuvieron los siguientes resultados:

GSH	t=-0.88	p>0.05
TU	Z=-0.08	p>0.05
PMUT	Z=-0.40	p>0.05
MUT	Z=-0.89	p>0.05
SCE	t=-0.83	p>0.05
PRI	Z=-0.18	p>0.05
MN	t=-0.06	p>0.05
IM	Z=-0.16	p>0.05
AB.CT.ROT.	Z=-0.27	p>0.05
AB.CT.RAD.	Z=-0.84	p>0.05
AB.CS.ROT.	Z=-1.70	p>0.05
AB.CS.AN.	Z=-0.62	p>0.05
GAPS CT.	Z=-1.55	p>0.05
GAPS CS.	Z=-0.54	p>0.05
GAPS TOT.	Z=-1.45	p>0.05
TOTAL-GAPS	Z=-1.77	p>0.05
TOTAL+GAPS	t=0.16	p>0.05

No hubo diferencias estadísticamente significativas en las variables estudiadas con respecto al tipo de tabaco fumado.

3.1.4 VALORACIÓN ESTADÍSTICA DE LA INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR.

Los datos de este estudio están reflejados en las tablas XVI, XVII y XVIII.

Los individuos participantes en el estudio fueron divididos en dos grupos, según presentaran un fenotipo acetilador lento (FAL) o un fenotipo acetilador rápido (FAR). Para ello se consideraron acetiladores lentos aquellos que poseían un índice metabólico inferior a 0.70, y acetiladores rápidos los que su índice metabólico era superior o igual a 0.70.

En la tabla 35 se muestra el número y porcentaje de individuos con uno u otro fenotipo en los distintos grupos.

No se encontraron diferencias significativas entre los individuos sanos fumadores y no fumadores y los pacientes de cáncer pulmonar.

La muestra posee una distribución bimodal, tal como queda reflejado en la Figura 34.

TABLA 35. Distribución de la población en acetiladores lentos (FAL) y rápidos (FAR).

Grupos	n	FAL(%)	FAR(%)
I	30	15(50%)	15(50%)
II	30	14(46.7%)	16(53.3%)
III	40	27(67.5%)	13(32.5%)
TOTAL	100	56(56%)	44(44%)

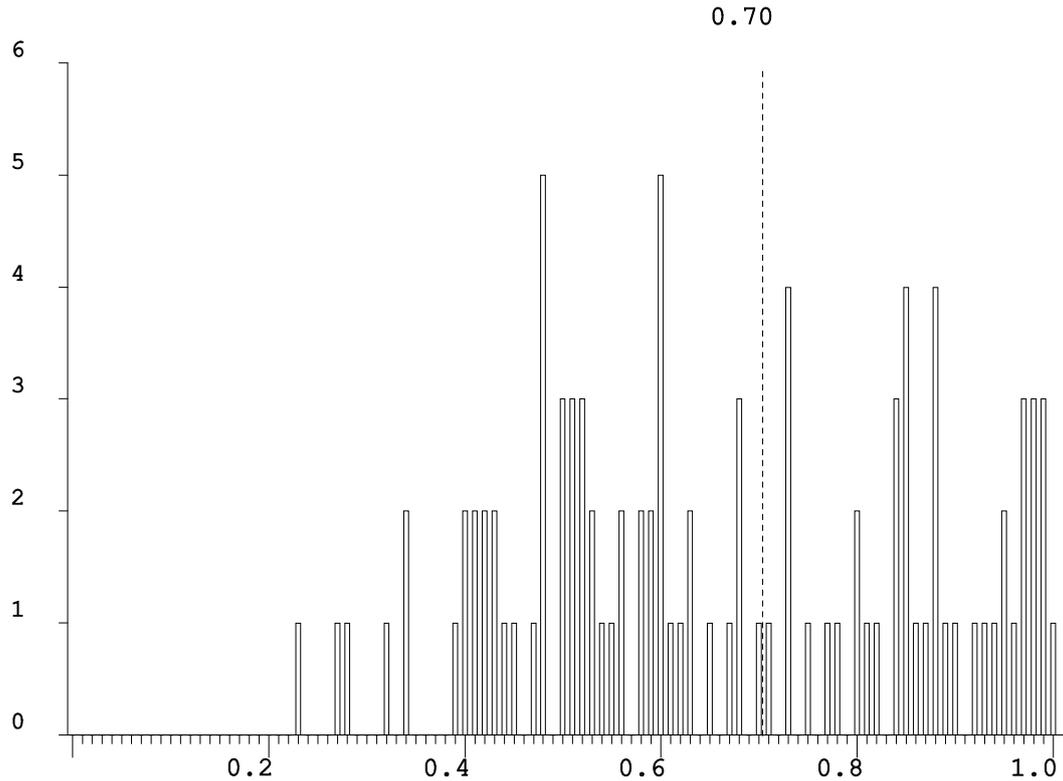


Figura 34. Distribución de frecuencias de los índices de acetilación de isoniacida. Valores inferiores a 0.70: FAL, valores superiores o iguales a 0.70: FAR.

3.1.4.1 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE EL GLUTATIÓN REDUCIDO ERITROCITARIO (GSH).

TABLA 36. Medidas estadísticas de GSH en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	5.39	1.31	0.34	2.94-7.67	7.05
II	14	6.30	2.15	0.57	3.76-11.43	10.14
III	27	5.74	1.56	0.30	3.16-9.11	8.18

TABLA 37. Medidas estadísticas de GSH en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	4.36	1.11	0.28	2.67-6.49	6.47
II	16	5.79	2.06	0.51	2.43-9.94	8.13
III	13	5.58	2.47	0.68	1.76-10.08	8.50

Se realizó el contraste entre FAL y FAR, en relación al GSH, en los distintos grupos obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $F=5.35$ $p<0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $F=0.44$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $F=0.07$ $p>0.05$

Solo existió un aumento estadísticamente significativo del GSH en los acetiladores lentos respecto a los acetiladores rápidos, en el grupo I. En los demás grupos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Ver Figura 35.

3.1.4.2 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LA ELIMINACIÓN DE TIOÉTERES URINARIOS (TU).

TABLA 38. Medidas estadísticas de TU en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	3.75	1.68	0.43	1.33-6.66	5.87
II	14	8.15	3.41	0.91	2.63-14.90	12.20
III	27	4.64	3.29	0.63	1.36-15.16	10.00

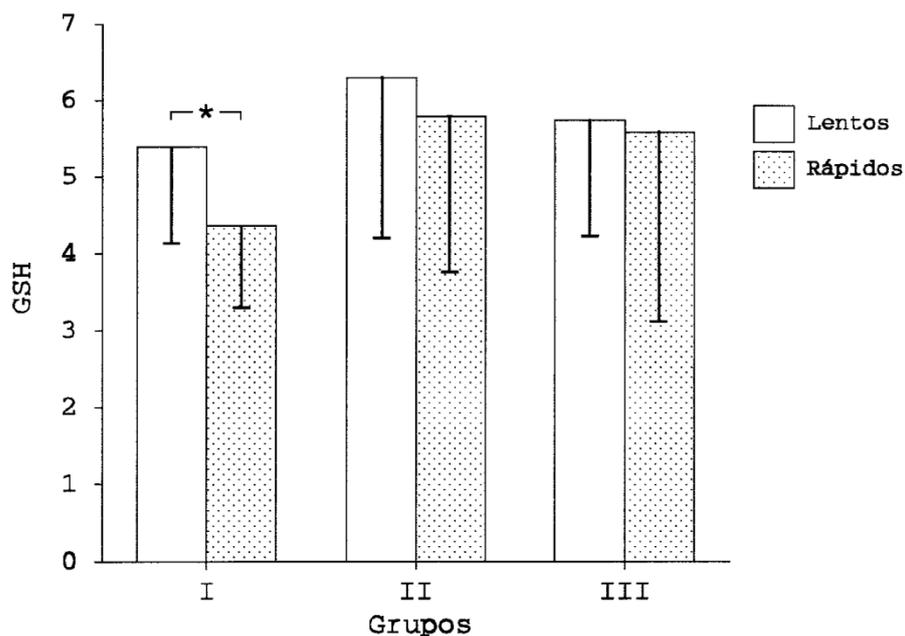


Figura 35. Medias y DE del GSH en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

TABLA 39. Medidas estadísticas de TU en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	3.74	1.80	0.46	1.16-6.63	6.10
II	16	7.18	2.87	0.71	2.60-13.87	10.98
III	13	4.62	2.96	0.82	1.10-11.60	8.56

Se realizó el contraste entre FAL y FAR, en relación a los TU, en los distintos grupos obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $F=0.00$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $F=0.72$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.11$ $p>0.05$

Aunque los valores de TU fueron más elevados en el grupo II para ambos fenotipos, no reflejaron diferencias estadísticamente significativas. Ver Figura 36.

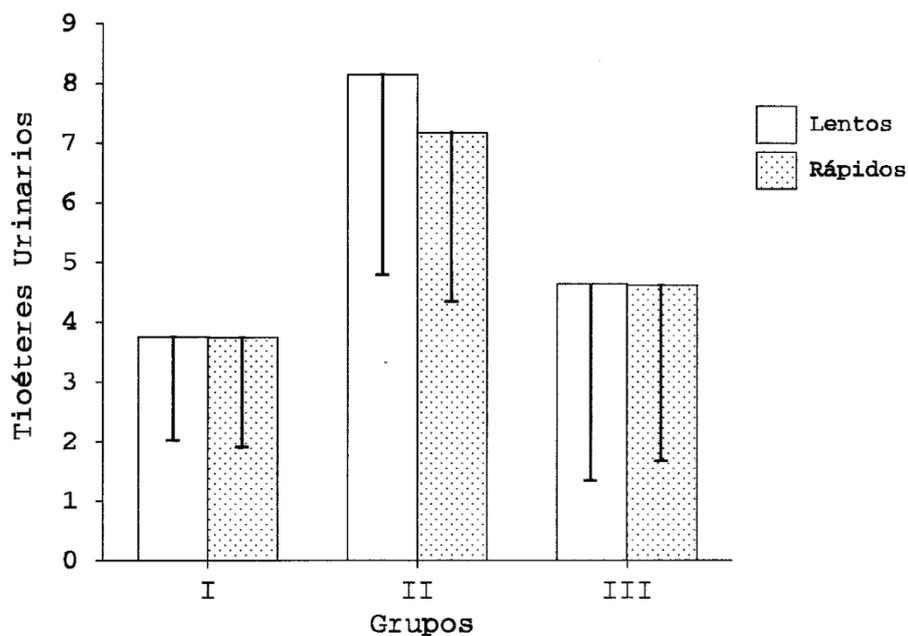


Figura 36. Medias y DE de los Tioéteres Urinarios en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.3 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LA ELIMINACIÓN DE PREMUTÁGENOS POR ORINA.

TABLA 40. Medidas estadísticas de premutágenos en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	1.29	1.04	0.26	0.20-3.50	3.16
II	14	7.35	5.11	1.36	2.09-19.00	16.64
III	27	2.15	2.45	0.47	0.00-8.56	5.58

TABLA 41. Medidas estadísticas de premutágenos en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	2.39	2.49	0.64	9.27-0.58	7.23
II	16	6.39	3.65	0.91	1.11-15.79	11.98
III	13	2.72	4.17	1.15	0-15.65	6.47

Se realizó el contraste entre FAL y FAR, en relación a la eliminación de premutágenos por orina, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-1.53$ $p>0.05$

Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.29$ $p>0.05$

Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.05$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas. Ver Figura 37.

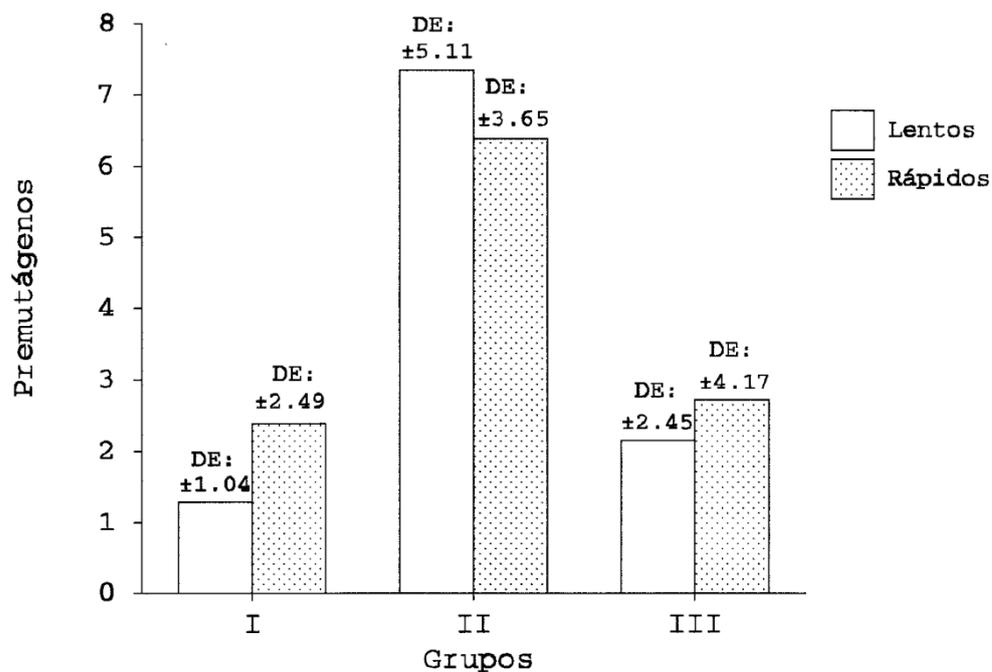


Figura 37. Medias y DE de los Premutágenos en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.4 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LA ELIMINACIÓN DE MUTÁGENOS POR ORINA.

TABLA 42. Medidas estadísticas de mutágenos en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	1.13	1.74	0.45	0-6.29	4.09
II	14	0.75	0.64	0.17	0-2.06	1.97
III	27	0.48	0.55	0.10	0-2.17	1.40

TABLA 43. Medidas estadísticas de mutágenos en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	0.64	0.75	0.19	0-2.72	1.55
II	16	1.11	1.92	0.48	0-8.12	1.53
III	13	0.49	0.91	0.25	0-3.44	1.48

Se realizó el contraste entre FAL y FAR, en relación a mutágenos urinarios, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.70$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.02$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.76$ $p>0.05$

Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Ver Figura 38.

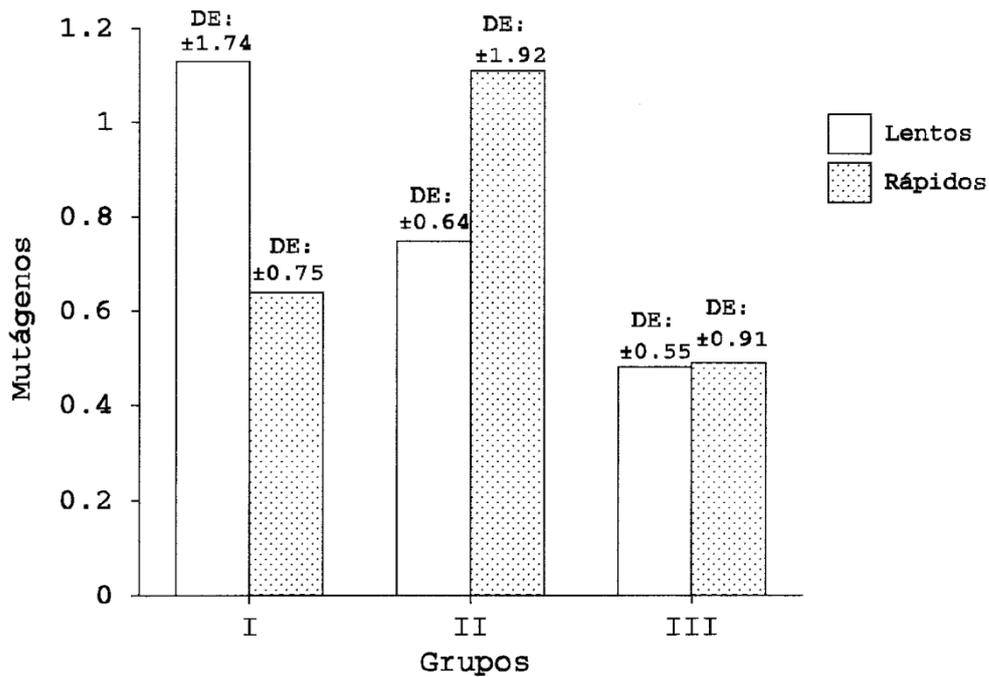


Figura 38. Medias y DE de los Mutágenos en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.5 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE EL INTERCAMBIO ENTRE CROMÁTIDES HERMANAS (SCEs)

TABLA 44. Medidas estadísticas de SCEs en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	6.28	0.86	0.22	4.90-7.80	7.78
II	14	6.67	1.13	0.30	4.60-8.45	7.94
III	27	7.72	0.94	0.18	6.00-10.2	8.79

TABLA 45. Medidas estadísticas de SCEs en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	6.04	0.68	0.17	4.90-7.25	6.82
II	16	6.97	1.42	0.35	4.70-9.90	8.85
III	13	7.40	0.95	0.26	5.80-8.80	8.64

Se realizó el contraste entre FAL y FAR, en relación a los SCEs, en los distintos grupos obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $F=0.67$ $p>0.05$

Grupo II: entre FAL y FAR, $F=0.40$ $p>0.05$

Grupo III: entre FAL y FAR, $F=1.01$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas. Ver Figura 39.

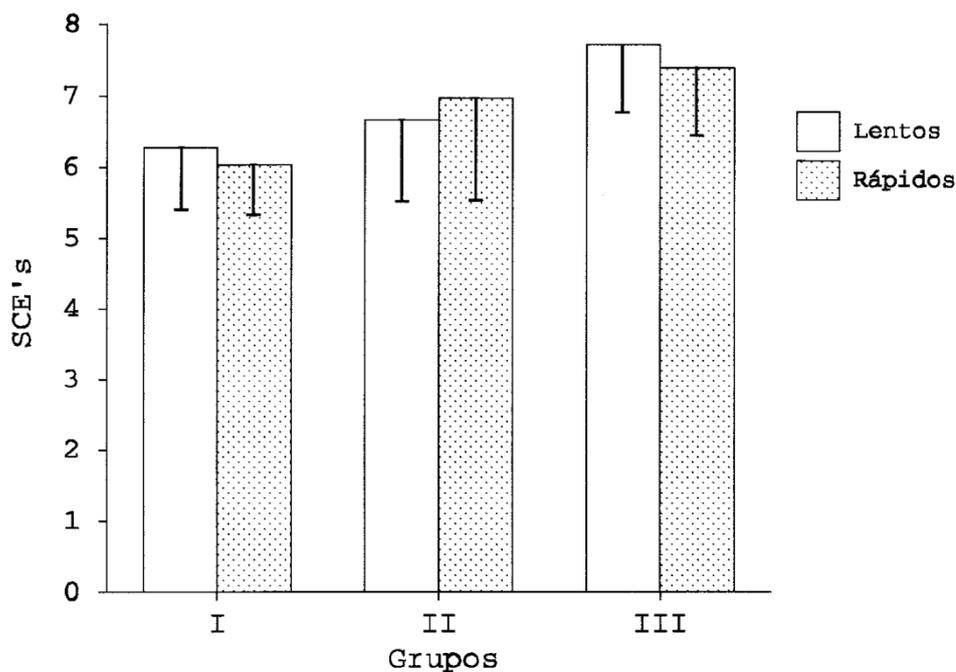


Figura 39. Medias y DE de los SCEs en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.6 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PRI).

TABLA 46. Medidas estadísticas del PRI en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	1.39	0.25	0.06	1.07-1.80	1.76
II	14	1.51	0.27	0.07	1.07-1.85	1.84
III	27	1.28	0.18	0.03	1.04-1.71	1.51

TABLA 47. Medidas estadísticas del PRI en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	1.52	0.20	0.05	1.07-1.80	1.72
II	16	1.38	0.25	0.06	1.10-1.78	1.69
III	13	1.32	0.21	0.05	1.08-1.75	1.70

Se realizó el contraste entre FAL y FAR, en relación al PRI, en los distintos grupos obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $F=2.44$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-1.01$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.59$ $p>0.05$

Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Ver Figura 40.

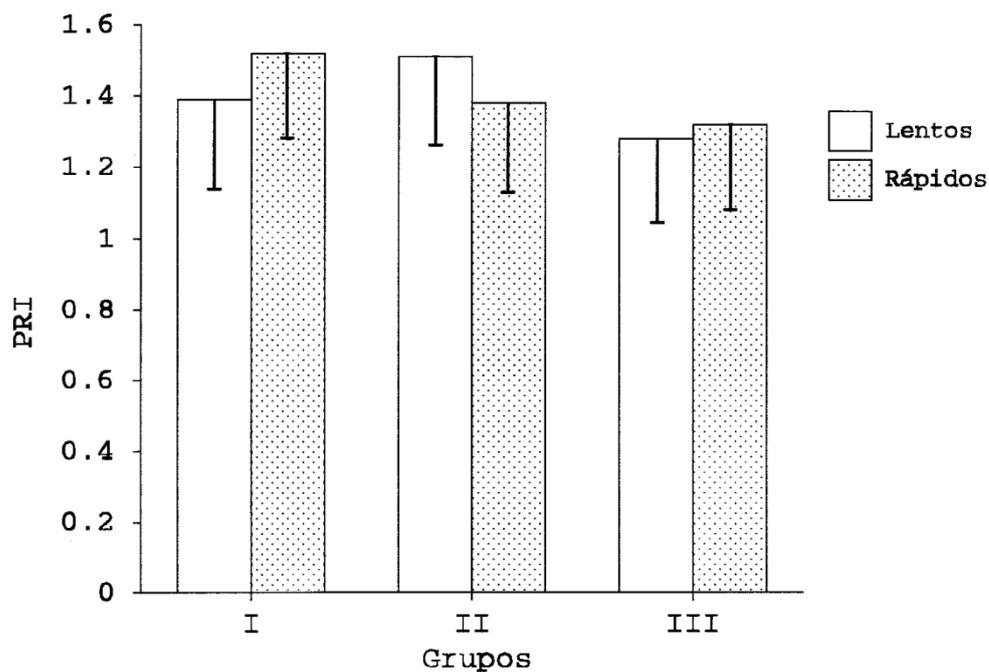


Figura 40. Medias y DE del PRI en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.7 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LA APARICIÓN DE MICRONÚCLEOS (MN).

TABLA 48. Medidas estadísticas de MN en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	8.53	4.62	1.19	2-19	13.00
II	14	9.50	3.52	0.94	5-18	14.40
III	27	22.59	8.17	1.57	11-48	32.60

TABLA 49. Medidas estadísticas de MN en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	6.80	3.82	0.98	1-15	12.00
II	16	12.68	5.68	1.42	3-24	18.90
III	13	22.23	6.68	1.85	10-34	30.80

El contraste realizado entre FAL y FAR, en relación a los micronúcleos, en los distintos grupos arrojó los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $F=1.25$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $F=3.28$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $F=0.02$ $p>0.05$

Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Ver Figura 41.

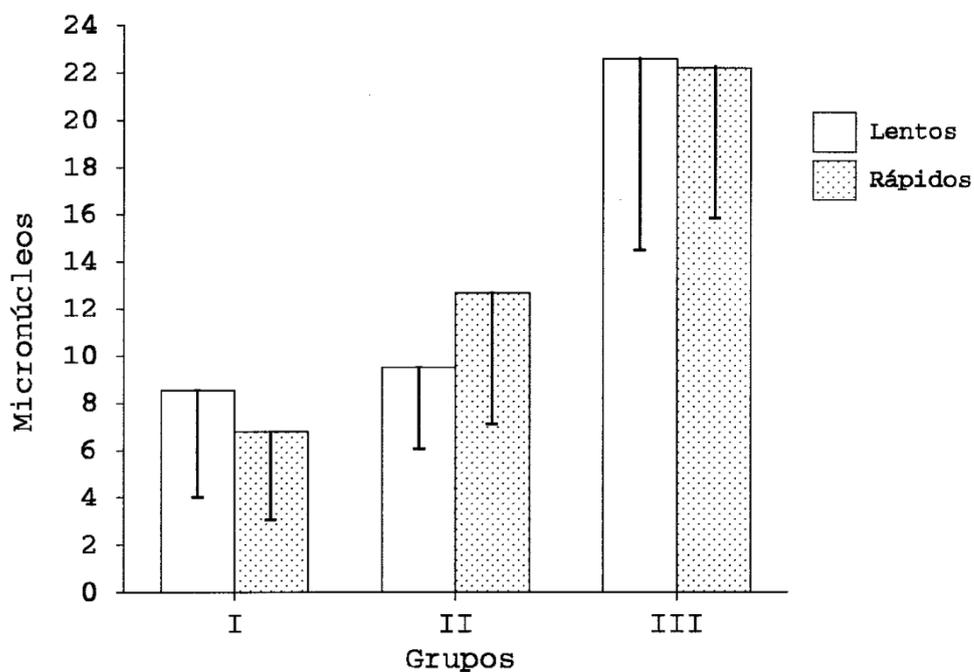


Figura 41. Medias y DE de los Micronúcleos en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.8 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE EL ÍNDICE MITÓTICO (IM).

TABLA 50. Medidas estadísticas del IM en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	14.06	12.74	3.29	3-50	30.00
II	14	13.21	8.04	2.14	5-29	26.30
III	27	24.70	8.03	1.54	6-44	32.80

TABLA 51. Medidas estadísticas del IM en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	15	14.06	6.49	1.67	7-28	22.00
II	16	15.93	15.46	3.86	5-68	25.70
III	13	17.38	6.85	1.90	2-28	24.80

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación al índice mitótico en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.97$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.04$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $F=7.97$ $p<0.01$

Los resultados no mostraron diferencias significativas en los grupos I y II; sin embargo, el grupo III mostró un aumento significativo del índice mitótico de los acetiladores lentos, respecto a los rápidos. Ver Figura 42.

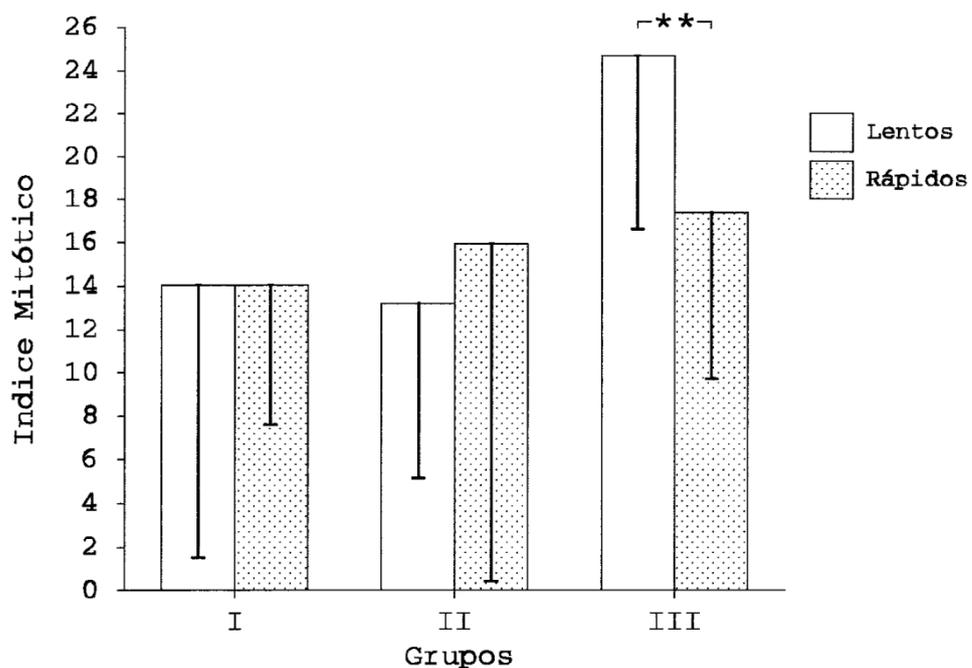


Figura 42. Medias y DE del Índice Mitótico en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.9 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LAS ABERRACIONES TIPO CROMATÍDICO (ROTURAS).

TABLA 52. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromatídico (roturas) en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	0.40	0.51	0.16	0-1	1
II	13	0.69	0.85	0.23	0-2	2
III	27	0.96	0.89	0.17	0-3	2

TABLA 53. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromatídico (roturas) en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	0.72	0.90	0.27	0-3	1
II	15	0.80	0.67	0.17	0-2	2
III	13	1.15	1.28	0.35	0-4	3.2

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a este parámetro, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.70$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.50$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.17$ $p>0.05$

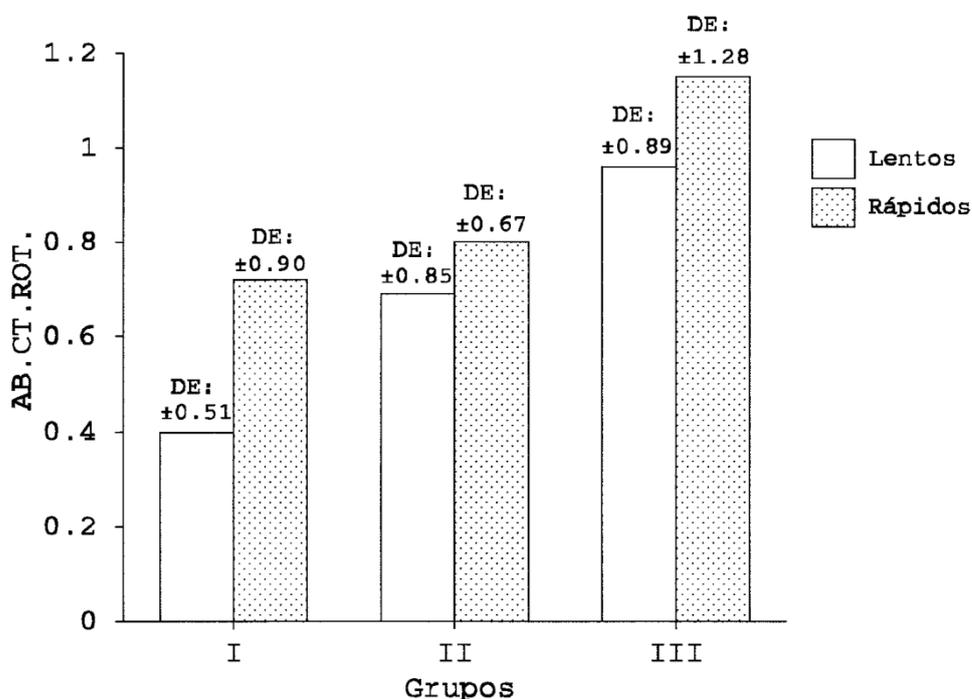


Figura 43. Medias y DE de las aberraciones tipo cromatídico (roturas) en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos, si bien los valores medios fueron más elevados en los acetiladores rápidos. Ver Figura 43.

3.1.4.10 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LAS ABERRACIONES TIPO CROMATÍDICO (RADIALES).

TABLA 54. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromatídico (radiales) en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	0.4	0.69	0.22	0-2	1.5
II	13	0.46	0.51	0.14	0-1	1
III	27	0.40	0.63	0.12	0-2	1

TABLA 55. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromatídico (radiales) en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	0.18	0.40	0.12	0-1	1
II	15	0.20	0.56	0.14	0-2	1
III	13	0.15	0.37	0.10	0-1	1

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a este parámetro, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.52$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-1.33$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.96$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias

estadísticamente significativas en ninguno de los grupos, si bien los valores medios fueron, en todos ellos, más elevados en los acetiladores lentos. Ver Figura 44.

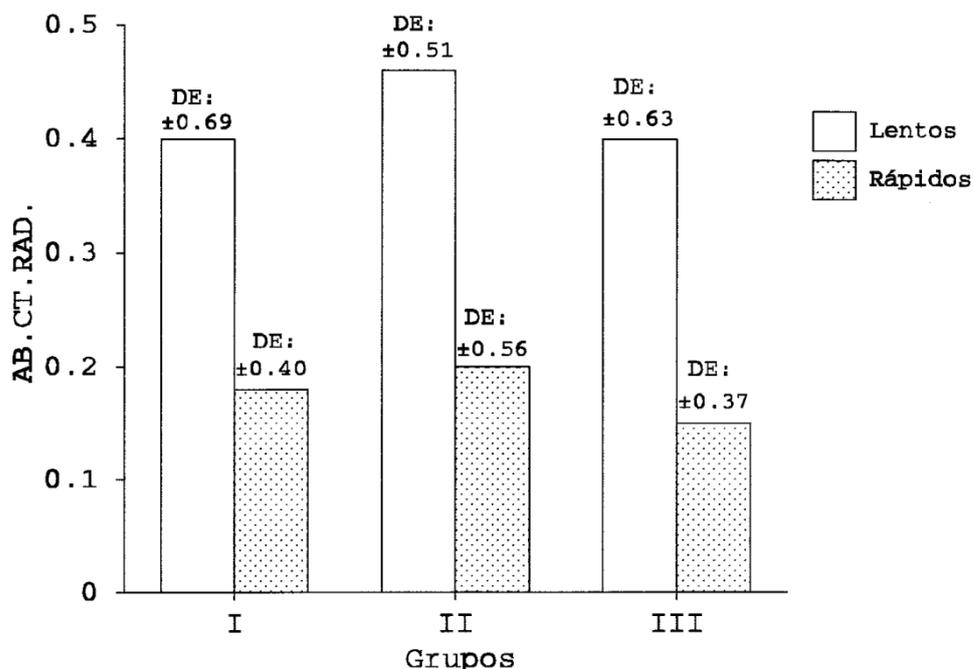


Figura 44. Medias y DE de las aberraciones tipo cromatídico (radiales) en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.11 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LAS ABERRACIONES DE TIPO CROMOSÓMICO (ROTURAS).

TABLA 56. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromosómico (roturas) en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	0.10	0.31	0.10	0-1	0.5
II	13	0.15	0.37	0.10	0-1	1
III	27	2.29	1.68	0.32	0-7	4.8

TABLA 57. Medidas estadísticas de las aberraciones tipo cromosómico (roturas) en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	0.09	0.30	0.09	0-1	0.4
II	15	0.20	0.41	0.10	0-1	1
III	13	2.07	1.44	0.40	0-5	4.2

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a este parámetro, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.03$ $p>0.05$

Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.20$ $p>0.05$

Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.33$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Ver Figura 45.

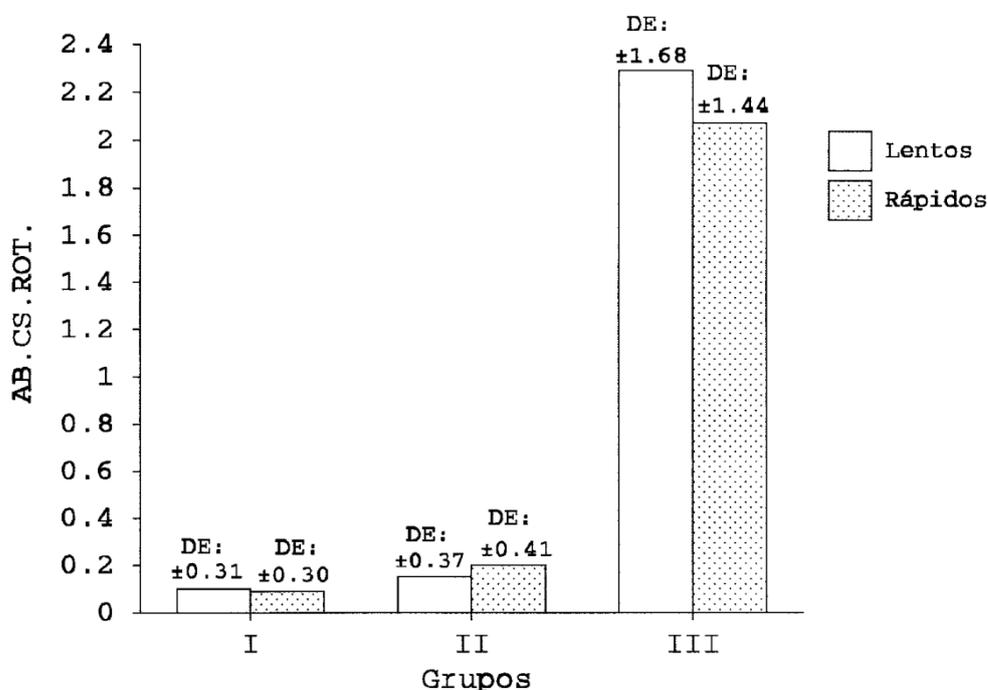


Figura 45. Medias y DE de las aberraciones tipo cromosómico (roturas) en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.12 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LAS ABERRACIONES TIPO CROMOSÓMICO (ANILLOS, DICÉNTRICOS).

TABLA 58. Medidas estadísticas de las aberraciones de tipo cromosómico (anillos, dicéntricos) en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	0.20	0.42	0.13	0-1	1
II	13	0.23	0.43	0.12	0-1	1
III	27	0.29	0.46	0.09	0-1	1

TABLA 59. Medidas estadísticas de las aberraciones de tipo cromosómico (anillos, dicéntricos) en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	0.36	0.50	0.15	0-1	1
II	15	0.33	0.48	0.12	0-1	1
III	13	0.23	0.59	0.16	0-2	1.2

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a este parámetro, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.63$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.46$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.60$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Ver Figura 46.

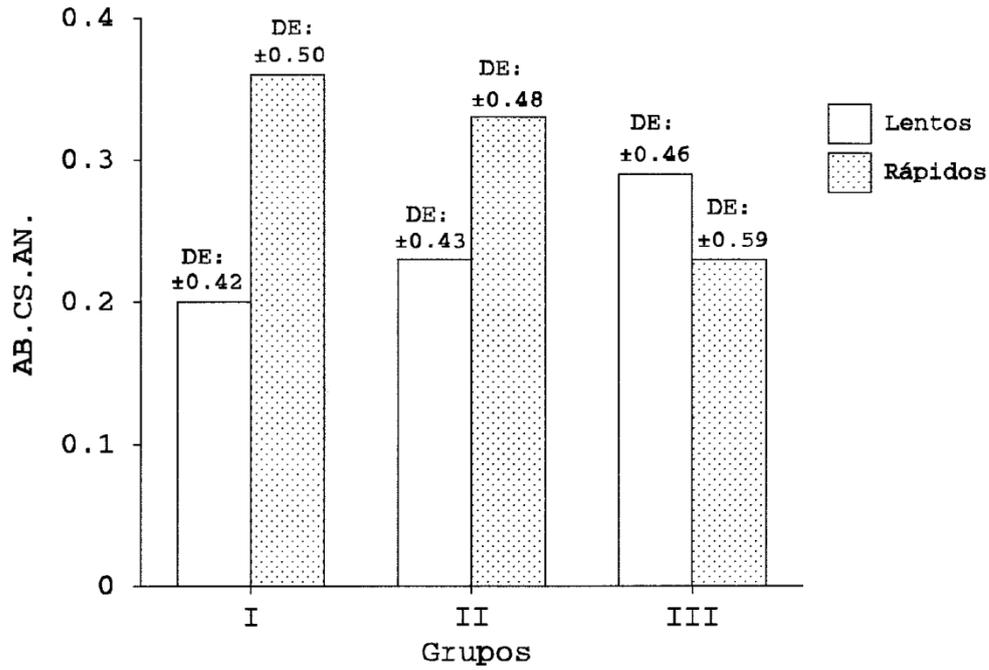


Figura 46. Medias y DE de las aberraciones tipo cromosómico (anillos, dicéntricos,..) en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.13 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LOS GAPS CROMATÍDICOS.

TABLA 60. Medidas estadísticas de los gaps cromatídicos en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	1.00	0.94	0.29	0-3	2.5
II	13	1.00	0.91	0.25	0-3	2.2
III	27	1.66	1.24	0.23	0-5	3

TABLA 61. Medidas estadísticas de los gaps cromatídicos en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	0.90	0.83	0.25	0-2	2
II	15	1.4	1.12	0.28	0-4	3
III	13	1.38	0.96	0.26	0-3	2.2

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a este parámetro, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.10$ $p>0.05$

Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.92$ $p>0.05$

Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.41$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Ver Figura 47.

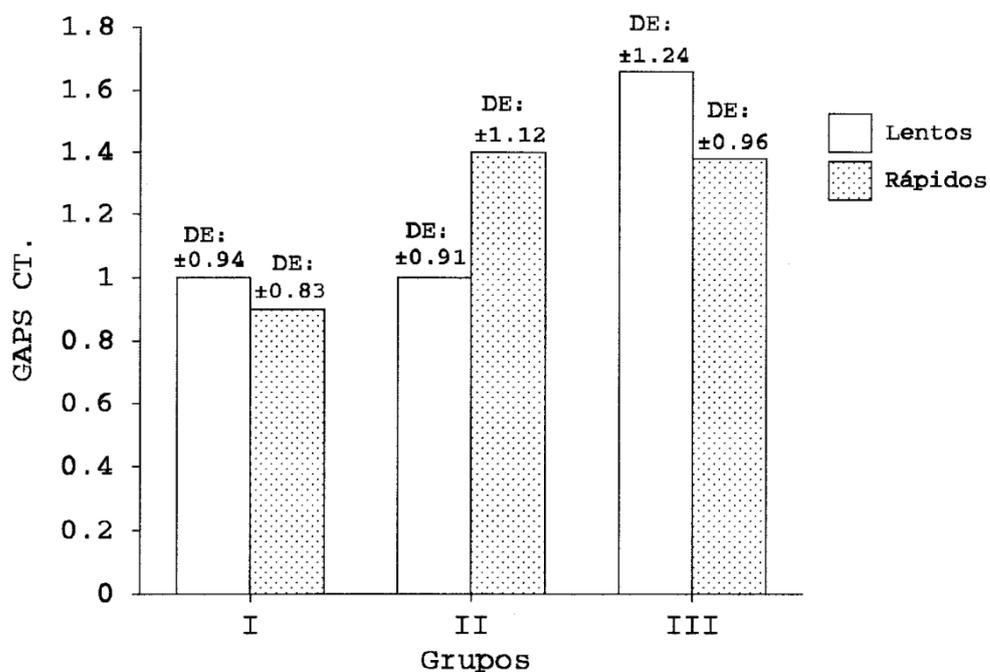


Figura 47. Medias y DE de los gaps cromatídicos en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido

3.1.4.14 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LOS GAPS CROMOSÓMICOS.

TABLA 62. Medidas estadísticas de los gaps cromosómicos en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	0.30	0.48	0.15	0-1	1
II	13	0.53	0.51	0.14	0-1	1
III	27	0.88	0.84	0.16	0-3	2

TABLA 63. Medidas estadísticas de los gaps cromosómicos en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	0.09	0.30	0.09	0-1	0.4
II	15	0.26	0.59	0.15	0-2	1
III	13	1.00	7	0.95	0.26	0-32.2

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a este parámetro, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.81$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-1.35$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.59$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Ver Figura 48.

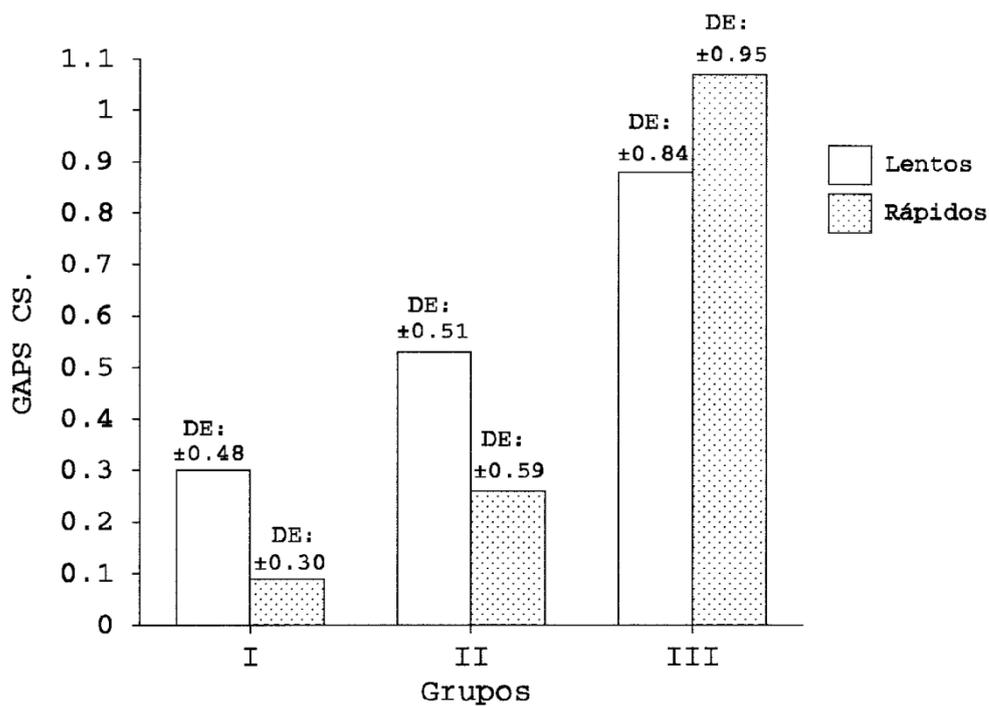


Figura 48. Medias y DE de los gaps cromosómicos en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.15 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LOS GAPS TOTALES.

TABLA 64. Medidas estadísticas de gaps totales en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	1.30	1.16	1.36	0-4	3
II	13	1.53	1.12	0.31	0-4	3.2
III	27	2.55	1.47	0.28	1-7	4.8

TABLA 65. Medidas estadísticas de gaps totales en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	1	0.77	0.23	0-2	2
II	15	1.66	1.34	0.34	0-4	4
III	13	2.46	1.19	0.33	1-4	4

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a este parámetro, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.38$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.13$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.01$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Ver Figura 49.

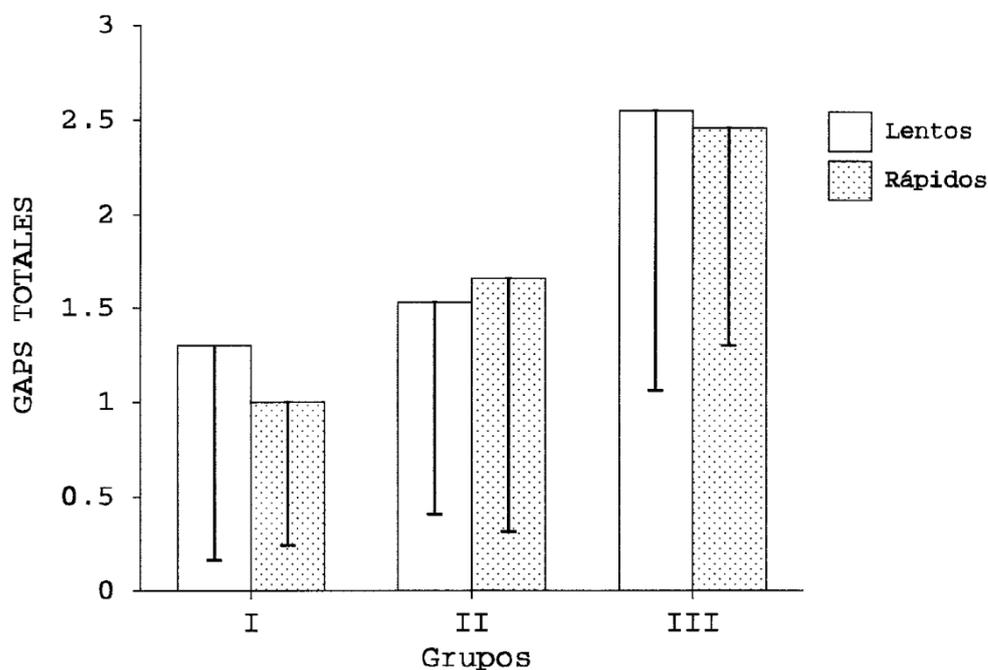


Figura 49. Medias y DE de los gaps totales en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.16 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LAS ABERRACIONES TOTALES, EXCLUYENDO LOS GAPS.

TABLA 66. Medidas estadísticas de las aberraciones totales, excluyendo los gaps, en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	1.10	1.37	0.43	0-3	3
II	13	1.62	1.04	0.29	0-3	3
III	27	3.96	2.17	0.41	0-9	6.8

TABLA 67. Medidas estadísticas de las aberraciones totales, excluyendo los gaps, en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	1.36	1.02	0.31	0-3	2.4
II	15	1.53	1.19	0.31	0-4	3
III	13	3.61	1.80	0.50	1-7	5.4

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a las aberraciones totales, excluyendo los gaps, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, $Z=-0.56$ $p>0.05$
 Grupo II: entre FAL y FAR, $Z=-0.29$ $p>0.05$
 Grupo III: entre FAL y FAR, $Z=-0.28$ $p>0.05$

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Ver Figura 50.

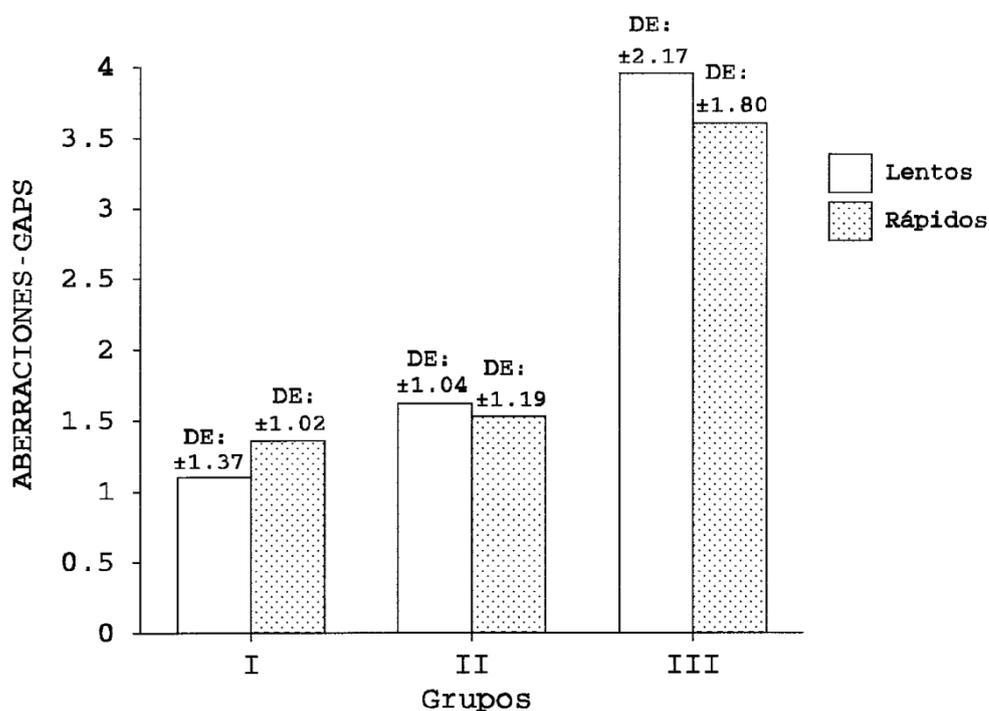


Figura 50. Medias y DE de las aberraciones totales, excluyendo los gaps, en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.4.17 INFLUENCIA DEL FENOTIPO ACETILADOR SOBRE LAS ABERRACIONES TOTALES, INCLUYENDO LOS GAPS.

TABLA 68. Medidas estadísticas de las aberraciones totales, incluyendo los gaps, en individuos con FAL.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	10	2.40	1.35	0.42	1-5	4.5
II	13	3.15	1.57	0.44	1-6	5.2
III	27	6.51	2.70	0.52	2-3	10

TABLA 69. Medidas estadísticas de las aberraciones totales, incluyendo los gaps, en individuos con FAR.

Grupo	n	m	DE	EE	Rango	P ₉₀
I	11	2.36	1.36	0.41	0-5	4.4
II	15	3.20	1.93	0.50	0-6	6
III	13	6.07	1.65	0.45	4-9	9

Se realizó el contraste entre FAL y FAR en relación a las aberraciones totales, incluyendo los gaps, en los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo I: entre FAL y FAR, F=0.00 p>0.05
 Grupo II: entre FAL y FAR, F=0.00 p>0.05
 Grupo III: entre FAL y FAR, F=0.29 p>0.05

Estos resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Ver Figura 51.

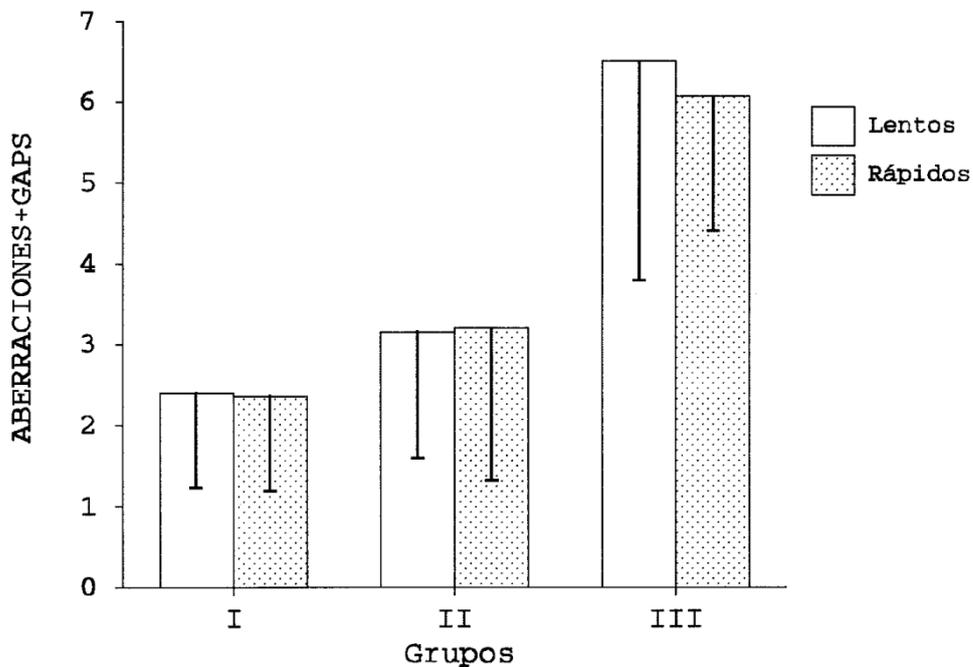


Figura 51. Medias y DE de las aberraciones totales, incluyendo los gaps, en los distintos grupos, según el fenotipo acetilador, lento o rápido.

3.1.5 VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL FENOTIPO HIDROXILADOR.

Los datos del siguiente estudio están reflejados en las tablas XVI, XVII y XVIII. De los 100 individuos que componen la muestra, sólo pudo determinarse el fenotipo hidroxilador en 80 de ellos. La tabla 70 muestra los resultados obtenidos, en los que no encontramos diferencias significativas en la frecuencia de uno u otro fenotipo entre los individuos sanos, fumadores y no fumadores, y los pacientes de cáncer de pulmón.

TABLA 70. Distribución de la población atendiendo a su fenotipo hidroxilador.

Grupos	n	FHL(%)	FHR(%)
I	23	0(0%)	23(100%)
II	22	2(10%)	20(90%)
III	35	2(6.06%)	33(93.94%)
TOTAL	80	4(5%)	76(95%)

La figura 52 muestra la distribución de frecuencias de los individuos en relación a su fenotipo hidroxilador

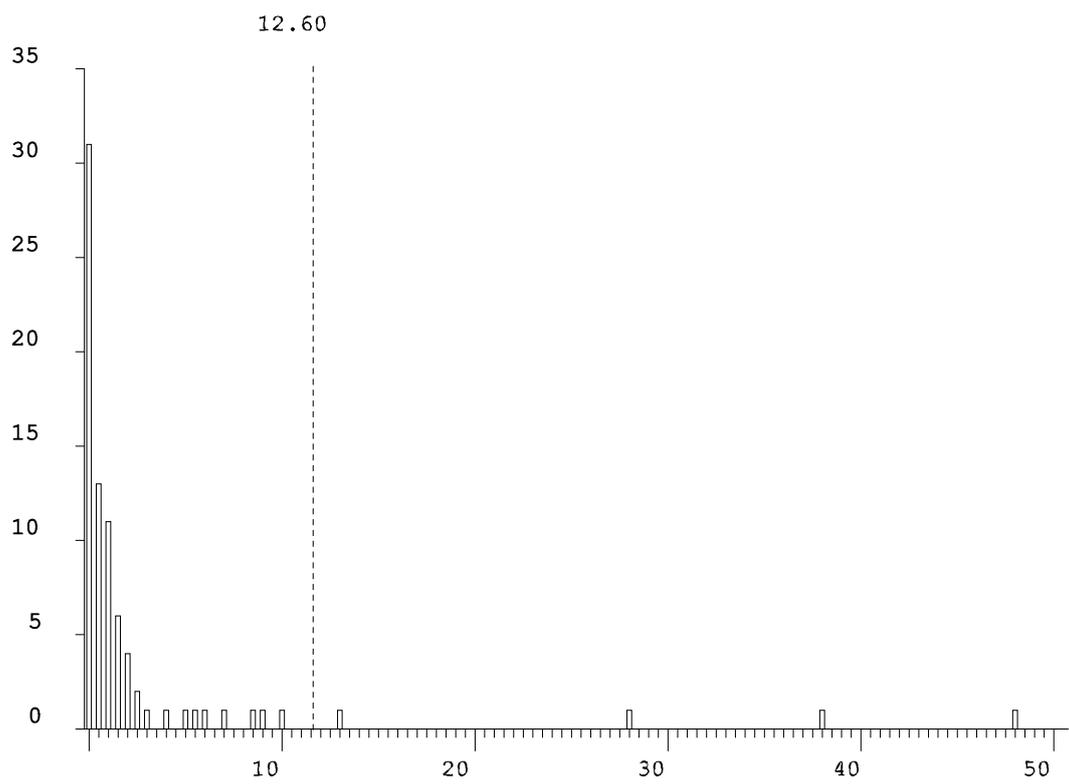


Figura 52. Distribución de frecuencias de los índices de hidroxilación de debrisoquina. Valores superiores a 12.6: FHL, valores inferiores o iguales a 12.6: FHR.

3.1.6 ESTUDIO ESTADÍSTICO CONJUNTO DEL FENOTIPO ACETILADOR E HIDROXILADOR.

Los resultados de este estudio se han obtenido a partir de las Tablas IV a XVIII del Apéndice.

3.1.6.1 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS INDIVIDUOS CON FAL Y FHR EN RELACIÓN A LOS DIFERENTES PARÁMETROS.

TABLA 71. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en individuos del grupo I (no fumadores y sanos) que presentan FAL y FHR.

	n	m	DE	EE	V _m	V _M
GSH	9	5.42	1.41	0.47	3.95	7.67
TU	9	3.87	1.85	0.61	1.50	6.66
PMUT	9	1.54	1.13	0.37	0.20	3.50
MUT	9	0.85	1.28	0.42	0.00	4.09
SCE	9	6.48	0.98	0.32	5.30	7.80
PRI	9	1.34	0.22	0.07	1.07	1.72
MN	9	8.77	5.11	1.70	2.00	19.00
IM	9	14.22	14.61	4.87	5.00	50.00
AB.TIPO CROMATÍDICO						
ROT	6	0.50	0.54	0.22	0.00	1.00
RAD	6	0.33	0.51	0.21	0.00	1.00
AB.TIPO CROMOSÓMICO						
ROT	6	0.16	0.40	0.16	0.00	1.00
AN/DIC	6	0.33	0.51	0.21	0.00	1.00
GAPS						
CT	6	1.16	1.16	0.47	0.00	3.00
CS	6	0.33	0.51	0.21	0.00	1.00
TOT	6	1.50	1.37	0.56	0.00	4.00
AB. TOTALES						
-GAPS	6	1.33	1.36	0.55	0.00	3.00
+GAPS	6	2.83	1.47	0.60	1.00	5.00

TABLA 72. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en individuos del grupo II (fumadores y sanos) que presentan FAL y FHR.

	n	m	DE	EE	V _m	V _M
GSH	8	6.72	1.52	0.53	5.24	10.00
TU	8	7.30	2.88	1.01	2.63	11.90
PMUT	8	8.56	5.93	2.09	2.09	19.00
MUT	8	0.82	0.61	0.21	0.09	1.97
SCE	8	6.32	1.07	0.37	4.60	7.56
PRI	8	1.52	0.30	0.10	1.07	1.85
MN	8	8.62	3.02	1.06	5.00	14.00
IM	8	13.5	9.02	3.19	5.00	29.00
AB.TIPO CROMATÍDICO						
ROT	7	0.57	0.78	0.29	0.00	2.00
RAD	7	0.42	0.53	0.20	0.00	1.00
AB.TIPO CROMOSÓMICO						
ROT	7	0.28	0.48	0.18	0.00	1.00
AN/DIC	7	0.42	0.53	0.20	0.00	1.00
GAPS						
CT	7	1.28	0.48	0.18	1.00	2.00
CS	7	0.57	0.53	0.20	0.00	1.00
TOT	7	1.85	0.69	0.26	1.00	3.00
AB. TOTALES						
-GAPS	7	1.71	1.11	0.42	0.00	3.00
+GAPS	7	3.57	1.72	0.65	1.00	6.00

TABLA 73. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en individuos del grupo III (fumadores con cáncer de pulmón) que presentan FAL y FHR.

	n	m	DE	EE	V _m	V _M
GSH	21	5.69	1.45	0.31	3.16	8.98
TU	21	4.16	2.41	0.52	1.36	10.00
PMUT	21	2.53	2.65	0.57	0.00	8.56
MUT	21	0.50	0.56	0.12	0.00	2.17
SCE	21	7.89	0.90	0.19	6.00	10.20
PRI	21	1.27	0.19	0.04	1.04	1.71
MN	21	21.42	6.72	1.46	11.00	34.00
IM	21	24.23	7.66	1.67	6.00	34.00
AB.TIPO CROMATÍDICO						
ROT	21	1.04	0.92	0.20	0.00	3.00
RAD	21	0.47	0.68	0.14	0.00	2.00
AB.TIPO CROMOSÓMICO						
ROT	21	2.33	1.46	0.31	0.00	6.00
AN/DIC	21	0.33	0.48	0.10	0.00	1.00
GAPS						
CT	21	1.81	1.32	0.29	0.00	5.00
CS	21	1.00	0.89	0.19	0.00	3.00
TOT	21	2.81	1.50	0.32	1.00	7.00
AB. TOTALES						
-GAPS	21	4.19	1.86	0.40	1.00	9.00
+GAPS	21	7.00	2.56	0.56	2.00	13.00

Se llevó a cabo el contraste de aquellos individuos con FAL+FHR entre los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados.

	I vs II	I vs III	II vs III
GSH	t=-1.81*	t=-0.47	t=1.68
TU	Z=-2.30	Z=-0.06	Z=-2.53*
PMUT	Z=-3.17*	Z=-0.02	Z=-2.87*
MUT	Z=-0.77	Z=-0.38	Z=-1.65
SCE	t=0.32	t=-3.79***	t=-3.96**
PRI	Z=-1.34	Z=-0.88	Z=-1.90
MN	t=0.08	t=-5.03***	t=-5.14***
IM	Z=-0.67	Z=-2.76*	Z=-2.46
AB.CT ROT	Z=0.00	Z=-1.22	Z=-1.14
AB.CT RAD	Z=-0.28	Z=-0.29	Z=-0.02
AB.CS ROT	Z=-0.35	Z=-3.29*	Z=-3.34*
AB.CS AN	Z=-0.28	Z=0.00	Z=-0.37
GAPS CT	Z=-0.42	Z=-1.02	Z=-0.84
GAPS CS	Z=-0.71	Z=-1.63	Z=-0.98
GAPS TOT	Z=-1.00	Z=-2.01	Z=-1.53
TOT+GAPS	t=-0.83	t=-3.76***	t=-3.27**
TOT-GAPS	Z=-0.57	Z=-2.97*	Z=-2.99*

La significación estadística aparece reflejada en la tabla mediante asteriscos (*), según el siguiente criterio:

- * : p<0.05
- ** : p<0.01
- *** : p<0.001

3.1.6.2 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS INDIVIDUOS CON FAR Y FHR EN RELACIÓN A LOS DIFERENTES PARÁMETROS.

TABLA 74. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en individuos del grupo I (no fumadores y sanos) que presentan FAR y FHR.

	n	m	DE	EE	V _m	V _M
GSH	14	4.31	1.14	0.30	2.67	6.49
TU	14	3.54	1.67	0.44	1.16	6.10
PMUT	14	2.36	2.58	0.69	0.58	9.27
MUT	14	0.49	0.51	0.13	0.00	1.55
SCE	14	6.10	0.67	0.18	4.90	7.25
PRI	14	1.52	0.21	0.05	1.07	1.80
MN	14	6.92	3.93	1.05	1.00	15.00
IM	14	14.50	6.51	1.74	7.00	28.00
AB.TIPO CROMATÍDICO						
ROT	11	0.72	0.90	0.27	0.00	3.00
RAD	11	0.18	0.40	0.12	0.00	1.00
AB.TIPO CROMOSÓMICO						
ROT	11	0.09	0.30	0.09	0.00	1.00
AN/DIC	11	0.36	0.50	0.15	0.00	1.00
GAPS						
CT	11	0.90	0.83	0.25	0.00	2.00
CS	11	0.09	0.30	0.09	0.00	1.00
TOT	11	1	0.77	0.23	0.00	2.00
AB. TOTALES						
-GAPS	11	1.36	1.02	0.31	0.00	3.00
+GAPS	11	2.36	1.36	0.41	0.00	5.00

TABLA 75. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en individuos del grupo II (fumadores y sanos) que presentan FAR y FHR.

	n	m	DE	EE	V _m	V _M
GSH	12	5.88	2.06	0.59	3.92	9.94
TU	12	6.81	3.08	0.89	2.60	13.87
PMUT	12	6.18	4.16	1.20	1.11	15.79
MUT	12	1.18	2.22	0.64	0	8.12
SCE	12	7.06	1.58	0.45	4.70	9.90
PRI	12	1.41	0.27	0.07	1.10	1.78
MN	12	13.91	5.56	1.60	5	24
IM	12	17.41	17.40	5.02	5	68
AB.TIPO CROMATÍDICO						
ROT	11	0.81	0.60	0.18	0	2
RAD	11	0.27	0.64	0.19	0	2
AB.TIPO CROMOSÓMICO						
ROT	11	0.27	0.46	0.14	0	1
AN/DIC	11	0.45	0.52	0.15	0	1
GAPS						
CT	11	1.63	1.20	0.36	0	4
CS	11	0.36	0.67	0.20	0	2
TOT	11	2	1.41	0.42	0	4
AB. TOTALES						
-GAPS	11	1.82	1.17	0.35	0	4
+GAPS	11	3.82	1.83	0.55	0	6

TABLA 76. Medidas estadísticas de los diferentes parámetros en individuos del grupo III (fumadores con cáncer de pulmón) que presentan FAR y FHR.

	n	m	DE	EE	V _m	V _M
GSH	12	5.86	2.35	0.68	1.76	10.80
TU	12	4.73	3.06	0.88	1.10	11.60
PMUT	12	2.95	4.27	1.23	0.00	15.65
MUT	12	0.53	0.95	0.27	0.00	3.44
SCE	12	7.50	0.91	0.26	5.80	8.80
PRI	12	1.33	0.21	0.06	1.08	1.75
MN	12	22.83	6.60	1.90	10.00	34.00
IM	12	17.25	7.13	2.06	2.00	28.00
AB.TIPO CROMATÍDICO						
ROT	12	1.16	1.33	0.38	0.00	4.00
RAD	12	0.16	0.38	0.11	0.00	1.00
AB.TIPO CROMOSÓMICO						
ROT	12	1.91	1.37	0.39	0.00	5.00
AN/DIC	12	0.25	0.62	0.17	0.00	2.00
GAPS						
CT	12	1.33	0.98	0.28	0.00	3.00
CS	12	1.16	0.93	0.27	0.00	3.00
TOT	12	2.50	1.24	0.35	1.00	4.00
AB. TOTALES						
-GAPS	12	3.50	1.83	0.52	1.00	7.00
+GAPS	12	6	1.70	0.49	4.00	9.00

Se llevó a cabo el contraste de aquellos individuos con FAR+FHR entre los distintos grupos, obteniéndose los siguientes resultados.

	I vs II	I vs III	II vs III
GSH	t=-2.43*	t=-2.17	t=0.02
TU	Z=-3.08*	Z=-0.87	Z=-1.81
PMUT	Z=-3.03*	Z=-0.15	Z=-2.71*
MUT	Z=-0.79	Z=-0.82	Z=-1.73
SCE	t=-2.08	t=-4.46***	t=-0.82
PRI	Z=-0.90	Z=-2.03	Z=-0.43
MN	t=-3.73**	t=-7.59***	t=-3.58**
IM	Z=-0.30	Z=-1.20	Z=-1.24
AB.CT ROT	Z=-0.62	Z=-0.64	Z=-0.24
AB.CT RAD	Z=-0.06	Z=-0.06	Z=-0.12
AB.CS ROT	Z=-0.72	Z=-3.57*	Z=-3.26*
AB.CS AN	Z=-0.36	Z=-0.67	Z=-1.01
GAPS CT	Z=-1.41	Z=-1.01	Z=-0.49
GAPS CS	Z=-2.06	Z=-2.80*	Z=-2.06
GAPS TOT	Z=-1.70	Z=-2.67*	Z=-0.80
TOT+GAPS	t=-2.11*	t=-5.61***	t=-2.95**
TOT-GAPS	Z=-0.75	Z=-2.70*	Z=-2.21

La significación estadística aparece reflejada en la tabla mediante asteriscos (*), según el siguiente criterio:

- * : p<0.05
- ** : p<0.01
- *** : p<0.001

Al realizar el contraste entre los individuos sanos no fumadores con FAL+FHR e individuos sanos no fumadores con FAR+FHR, se obtuvieron los siguientes resultados:

GSH	t=2.06	p>0.05
TU	Z=-0.50	p>0.05
PMUT	Z=-0.53	p>0.05
MUT	Z=-0.25	p>0.05
SCE	t=1.15	p>0.05
PRI	Z=-1.7	p>0.05
MN	t=0.97	p>0.05
IM	Z=-1.2	p>0.05
AB.CT.ROT.	Z=-0.3	p>0.05
AB.CT.RAD.	Z=-0.50	p>0.05
AB.CS.ROT.	Z=-0.25	p>0.05
AB.CS.AN.	Z=-0.10	p>0.05
GAPS CT.	Z=-0.35	p>0.05
GAPS CS.	Z=-0.80	p>0.05
GAPS TOT.	Z=-0.55	p>0.05
TOTAL-GAPS	Z=-0.10	p>0.05
TOTAL+GAPS	t=0.66	p>0.05

Dentro del grupo I no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos con FAL+FHR frente a los que poseían FAR+FHR.

Al realizar el contraste entre los individuos sanos fumadores con FAL+FHR e individuos sanos fumadores con FAR+FHR, se obtuvieron los siguientes resultados:

GSH	t=0.98	p>0.05
TU	Z=-0.81	p>0.05
PMUT	Z=-1.23	p>0.05
MUT	Z=-0.61	p>0.05
SCE	t=-1.15	p>0.05
PRI	Z=-0.61	p>0.05
MN	t=-2.44	p<0.05
IM	Z=-0.15	p>0.05
AB.CT.ROT.	Z=-0.81	p>0.05
AB.CT.RAD.	Z=-0.72	p>0.05
AB.CS.ROT.	Z=-0.04	p>0.05
AB.CS.AN.	Z=-0.09	p>0.05
GAPS CT.	Z=-0.63	p>0.05
GAPS CS.	Z=-0.86	p>0.05
GAPS TOT.	Z=-0.22	p>0.05
TOTAL-GAPS	Z=-0.09	p>0.05
TOTAL+GAPS	t=-0.28	p>0.05

En el grupo II, encontramos una disminución estadísticamente significativa de los micronúcleos en aquellos individuos con FAL+FHR (8.62 ± 3.02), respecto a los que poseían FAR+FHR (13.91 ± 5.56), con una $t=-2.44$ y $p<0.05$.

Al realizar el contraste entre los individuos fumadores con cáncer de pulmón y FAL+FHR e individuos fumadores con cáncer de pulmón y FAR+FHR, se obtuvieron los siguientes resultados:

GSH	t=-0.25	p>0.05
TU	Z=-0.44	p>0.05
PMUT	Z=-0.15	p>0.05
MUT	Z=-0.67	p>0.05
SCE	t=1.20	p>0.05
PRI	Z=-0.9	p>0.05
MN	t=-0.5	p>0.05
IM	Z=-2.56	p<0.05
AB.CT.ROT.	Z=-0.0	p>0.05
AB.CT.RAD.	Z=-1.0	p>0.05
AB.CS.ROT.	Z=-0.89	p>0.05
AB.CS.AN.	Z=-0.65	p>0.05
GAPS CT.	Z=-0.84	p>0.05
GAPS CS.	Z=-0.54	p>0.05
GAPS TOT.	Z=-0.44	p>0.05
TOTAL-GAPS	Z=-0.91	p>0.05
TOTAL+GAPS	t=1.20	p>0.05

En el grupo III encontramos un aumento estadísticamente significativo del índice mitótico en aquellos individuos con FAL+FHR (24.23 ± 7.66), respecto a los que poseían FAR+FHR (17.25 ± 7.13), con una $Z = -2.56$ y $p < 0.05$.

3.1.7 ESTUDIO DEL TIPO HISTOLÓGICO DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN.

Los datos de este estudio están reflejados en la tabla III.

En el grupo de pacientes con cáncer de pulmón, al hacer el estudio anatomopatológico, se encontraron 20 casos de carcinoma epidermoide, 10 casos de tipo microcítico, 8 casos de adenocarcinoma y 2 carcinomas indiferenciados de un total de 40 individuos, siendo los subtipos epidermoide y microcítico los más estrechamente vinculados con el consumo de tabaco y también los más frecuentes en nuestro estudio.

3.1.8 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO ACETILADOR E HIDROXILADOR EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN, ATENDIENDO AL TIPO HISTOLÓGICO.

TABLA 77. Distribución del fenotipo acetilador según el tipo histológico de cáncer de pulmón.

TIPO HISTOLÓGICO	FAL	FAR	TOTAL
Epidermoide	13	7	20
Microcítico	8	2	10
Adenocarcinoma	5	3	8
Indiferenciado	1	1	2
TOTAL	27	13	40

TABLA 78. Distribución del fenotipo oxidativo según el tipo histológico de cáncer de pulmón.

TIPO HISTOLÓGICO	FHL	FHR	TOTAL	ND
Epidermoide	1	16	17	3
Microcítico	1	8	9	1
Adenocarcinoma	0	7	7	1
Indiferenciado	0	2	2	0
Total	2	33	35	5

En nuestro estudio, al realizar el test de χ^2 , observamos un predominio de **acetiladores lentos** en los tipos histológicos epidermoide, microcítico y adenocarcinoma, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Asimismo, hubo un predominio de **hidroxiladores rápidos** en todos los tipos histológicos de los 35 individuos fenotipados (5 casos fueron eliminados del estudio). Estas diferencias tampoco mostraron significación estadística.

Al realizar un test de χ^2 apreciamos un predominio de individuos con **FAL+FHR** en el grupo III, aunque no podemos concluir que tales individuos tengan mayor riesgo de cáncer de pulmón ($p>0.05$).

Al realizar el mismo estudio en cada tipo histológico por separado, observamos un predominio del **FAL+FHR** en todos ellos respecto al FAR+FHR: epidermoide (10:6), microcítico (6:2), adenocarcinoma (4:3) e indiferenciado (1:1), con una $p>0.05$ en todos los casos; lo que indica que no existe dependencia entre la posesión de **FAL+FHR** y cualquiera de los tipos histológicos.

TABLA 79. Distribución de los pacientes según el tipo de tabaco fumado (Rubio/Negro), en cada tipo histológico.

TIPO HISTOLÓGICO	NEGRO	RUBIO	TOTAL
Epidermoide	17	3	20
Microcítico	8	2	10
Adenocarcinoma	7	1	8
Indiferenciado	0	2	2
Total	32	8	40

En lo que respecta al tipo de tabaco fumado (Rubio/Negro), se ha observado un predominio de fumadores de tabaco negro que alcanzó significación estadística ($p < 0.05$) en los subgrupos epidermoide y microcítico, más relacionados con el consumo de tabaco. Al valorar la influencia del tiempo del hábito con los distintos tipos histológicos, no encontramos resultados concluyentes.

3.1.9 CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS.

TABLA 80. Coeficiente de correlación de Pearson (r) de la variable Edad con los parámetros estudiados, en los distintos grupos.

	I	II	III
GSH	0.23	0.12	0.12
TU	0.29	0.41	0.02
PMUT	-0.39	-0.12	0.15
MUT	-0.28	0.17	-0.31
SCE	0.11	0.10	0.13
PRI	0.47	0.25	0.15
MN	0.31	-0.06	-0.09
IM	0.30	0.09	-0.14
TOT+GAPS	-0.09	0.27	0.12

TABLA 81. Coeficiente de correlación de Spearman (r) de la variable Edad con los parámetros estudiados, en los distintos grupos.

	I	II	III
AB.CT.ROT.	-0.30	0.28	0.19
AB.CT.RAD.	-0.13	0.02	-0.20
AB.CS.ROT.	0.06	0.03	0.14
AB.CS.AN.	-0.15	0.36	0.20
GAPS TOT.	0.13	0.25	-0.11
GAPS CT	-0.07	0.26	-0.04
GAPS CS	0.30	0.13	-0.15
TOT-GAPS	-0.28	-0.32	0.18

Al estudiar la influencia de la edad en los diferentes parámetros, las correlaciones que encontramos fueron

débiles, lo que nos hace pensar que la edad no modifica significativamente los resultados obtenidos en los distintos grupos.

TABLA 82. Coeficiente de correlación de Pearson (r) del fenotipo acetilador con los parámetros estudiados, en los distintos grupos.

	I	II	III
GSH	-0.01	-0.14	0.007
TU	0.01	0.04	0.06
PMUT	0.32	-0.19	0.02
MUT	-0.34	-0.06	-0.01
SCE	-0.09	0.24	-0.20
PRI	0.20	-0.11	0.20
MN	-0.32	0.51	0.02
IM	-0.03	0.10	-0.39
TOT+GAPS	-0.18	0.06	-0.15
EDAD	-0.22	-0.15	-0.04

TABLA 83. Coeficiente de correlación de Spearman (r) del fenotipo acetilador con los parámetros estudiados, en los distintos grupos.

	I	II	III
AB.CT.ROT.	0.03	0.08	0.13
AB.CT.RAD.	-0.16	-0.21	-0.10
AB.CS.ROT.	-0.16	0.16	-0.24
AB.CS.AN.	-0.01	0.04	-0.13
GAPS TOT.	0.01	0.14	-0.04
GAPS CT	0.06	0.18	-0.07
GAPS CS	-0.14	-0.06	-0.04
TOT-GAPS	-0.03	-0.009	-0.12

TABLA 84. Coeficiente de correlación de Pearson (r) del fenotipo hidroxilador con los parámetros estudiados, en los distintos grupos.

	I	II	III
GSH	0.40	0.05	-0.19
TU	-0.37	0.32	-0.17
PMUT	0.01	-0.15	-0.08
MUT	0.02	0.11	-0.17
SCE	-0.18	0.02	-0.28
PRI	0.49	0.26	0.18
MN	-0.16	-0.07	0.46
IM	0.10	0.10	-0.17
TOT+GAPS	-0.28	-0.28	0.002
EDAD	0.009	0.05	0.16

TABLA 85. Coeficiente de correlación de Spearman (r) del fenotipo hidroxilador con los parámetros estudiados, en los distintos grupos.

	I	II	III
AB.CT.ROT.	-0.06	0.07	-0.05
AB.CT.RAD.	0.07	0.12	0.17
AB.CS.ROT.	-0.14	0.16	-0.24
AB.CS.AN.	0.25	0.25	0.15
GAPS TOT.	-0.19	0.06	-0.09
GAPS CT	-0.12	0.02	-0.07
GAPS CS	-0.15	0.05	0.05
TOT-GAPS	-0.02	0.22	-0.008

Al estudiar la influencia de los índices metabólicos, acetilador e hidroxilador, sobre las demás variables estudiadas, las correlaciones obtenidas fueron, en general,

débiles.

Al realizar el estudio de correlaciones en los distintos grupos, no se hallaron relaciones significativas entre las variables estudiadas.

Al realizar el estudio de correlación entre los micronúcleos y las aberraciones totales, incluyendo los gaps, encontramos una correlación positiva en todos los grupos, siendo mayor en el grupo de individuos sanos y no fumadores ($r=0.37$) que en los sanos fumadores ($r=0.27$) y que en individuos con cáncer de pulmón ($r=0.19$). Al excluir los gaps, las correlaciones obtenidas seguían siendo positivas pero mucho más débiles, $r=0.11$ en el grupo I, $r=0.05$ en el grupo II y $r=0.13$ en el grupo III.

Al valorar la asociación entre los micronúcleos y los gaps, también observamos una correlación positiva, que fue superior en el grupo de sanos no fumadores ($r=0.36$) y sanos fumadores ($r=0.35$) que en el grupo de individuos con cáncer de pulmón ($r=0.21$). A la vista de los resultados obtenidos, intuimos que ese aumento en la correlación se debe en mayor medida a los gaps que al resto de las aberraciones.

Al correlacionar los micronúcleos con el índice mitótico, encontramos una asociación débil y negativa en todos los grupos, siendo mayor en el grupo de sanos no fumadores ($r=-0.27$), que en los sanos fumadores ($r=-0.02$) y el de cáncer de pulmón ($r=-0.06$).

Al valorar la asociación entre los SCE y el índice de proliferación celular, observamos una correlación negativa y débil en todos los grupos, con una $r=-0.24$ en el grupo de no fumadores sanos, al igual que en el de cáncer de pulmón y una $r=-0.11$ en el grupo de fumadores sanos.

3.2 TABLAS DE RESULTADOS.

TABLA I. Datos referidos al grupo I en cuanto a la edad de los individuos, el número de cigarrillos fumados cada día, la duración del hábito en años y el tipo de tabaco consumido: rubio o negro (R/N).

CASO	EDAD	CIG/DIA	HABITO	TABACO
1	54	0	0	0
2	64	0	0	0
3	59	0	0	0
4	34	0	0	0
5	50	0	0	0
6	35	0	0	0
7	64	0	0	0
8	58	0	0	0
9	67	0	0	0
10	54	0	0	0
11	70	0	0	0
12	48	0	0	0
13	62	0	0	0
14	67	0	0	0
15	70	0	0	0
16	74	0	0	0
17	70	0	0	0
18	64	0	0	0
19	70	0	0	0
20	74	0	0	0
21	40	0	0	0
22	67	0	0	0
23	39	0	0	0
24	65	0	0	0
25	59	0	0	0
26	57	0	0	0
27	56	0	0	0
28	59	0	0	0
29	61	0	0	0
30	51	0	0	0

TABLA II. Datos referidos al grupo II en cuanto a la edad de los individuos, el número de cigarrillos fumados cada día, la duración del hábito en años y el tipo de tabaco consumido: rubio o negro (R/N).

CASO	EDAD	CIG/DIA	HABITO	TABACO
31	56	>20	30	R
32	57	>20	24	R
33	66	>20	42	R
34	69	>20	50	R
35	69	>20	47	R
36	52	>20	30	R
37	35	>20	20	N
38	42	>20	26	R
39	51	>20	34	R
40	56	>20	40	N
41	41	>20	27	N
42	59	>20	45	N
43	60	>20	41	R
44	56	>20	25	N
45	58	>20	26	N
46	66	>20	50	R
47	55	>20	32	R
48	60	>20	42	R
49	52	>20	36	N
50	49	>20	21	R
51	58	>20	28	R
52	69	>20	50	N
53	64	>20	48	R
54	73	>20	52	N
55	70	>20	44	N
56	70	>20	45	N
57	70	>20	49	N
58	70	>20	40	N
59	52	>20	35	R
60	66	>20	45	N

TABLA III. Datos referidos al grupo III en cuanto a la edad de los individuos, el número de cigarrillos fumados cada día, la duración del hábito en años, el tipo de tabaco consumido rubio o negro (R/N) y el tipo histológico del cáncer de pulmón.

CASO	EDAD	CIG/DIA	HABITO	TABACO	HISTOLOGIA
61	58	>20	40	N	ADENOCARCINOMA
62	59	>20	42	N	EPIDERMOIDE
63	54	>20	38	N	EPIDERMOIDE
64	72	>20	60	N	EPIDERMOIDE
65	68	>20	45	N	EPIDERMOIDE
66	40	>20	25	R	MICROCITICO
67	47	>20	30	R	INDIFERENCIADO
68	69	>20	45	N	EPIDERMOIDE
69	71	>20	52	N	EPIDERMOIDE
70	65	>20	48	R	EPIDERMOIDE
71	67	>20	52	N	EPIDERMOIDE
72	62	>20	46	N	EPIDERMOIDE
73	54	>20	30	R	INDIFERENCIADO
74	52	>20	38	N	MICROCITICO
75	71	>20	48	N	EPIDERMOIDE
76	63	>20	48	N	MICROCITICO
77	65	>20	50	N	MICROCITICO
78	67	>20	49	N	MICROCITICO
79	37	>20	24	N	ADENOCARCINOMA
80	69	>20	43	N	ADENOCARCINOMA
81	68	>20	40	N	MICROCITICO
82	52	>20	35	N	EPIDERMOIDE
83	69	>20	30	N	EPIDERMOIDE
84	55	>20	32	R	EPIDERMOIDE
85	61	>20	45	N	MICROCITICO
86	73	>20	50	N	EPIDERMOIDE
87	67	>20	53	N	ADENOCARCINOMA
88	63	>20	40	N	ADENOCARCINOMA
89	53	>20	32	N	MICROCITICO
90	69	>20	50	N	EPIDERMOIDE
91	58	>20	35	R	MICROCITICO
92	66	>20	42	N	EPIDERMOIDE
93	72	>20	58	R	EPIDERMOIDE
94	53	>20	36	N	MICROCITICO
95	66	>20	52	N	EPIDERMOIDE
96	48	>20	35	N	ADENOCARCINOMA
97	69	>20	55	N	EPIDERMOIDE
98	60	>20	40	N	EPIDERMOIDE
99	46	>20	29	R	ADENOCARCINOMA
100	58	>20	41	N	ADENOCARCINOMA

TABLA IV. Datos referidos al grupo I en cuanto a la concentración de glutatión reducido eritrocitario (GSH), tioéteres urinarios (TU), premutágenos (PMUT) y mutágenos (MUT) en orina.

CASO	GSH	TU	PMUT	MUT
1	4.11	3.00	0.92	0.34
2	4.01	1.71	3.16	4.09
3	3.12	3.56	0.60	1.53
4	2.67	1.16	9.27	0.52
5	3.61	1.33	7.23	0.36
6	2.94	5.75	2.27	6.29
7	5.10	2.57	1.90	1.55
8	5.21	1.50	0.91	0.22
9	6.49	6.10	1.81	0.27
10	5.44	2.50	0.28	0.36
11	7.05	5.87	1.17	1.51
12	6.68	1.33	0.78	0.70
13	4.17	5.00	2.29	0.24
14	3.95	2.16	1.11	0.45
15	4.15	4.00	1.88	0.91
16	4.76	1.33	1.44	0.34
17	5.75	4.37	1.57	0.29
18	4.58	4.72	0.78	0.28
19	3.94	5.75	0.58	0
20	5.50	6.66	2.17	0.20
21	4.80	2.70	0.91	0.26
22	6.75	4.57	0.20	0
23	6.47	2.25	1.73	0.24
24	5.24	4.05	0.28	0.43
25	3.08	5.20	0.82	0
26	4.96	6.63	2.89	2.72
27	4.31	4.00	0.99	0
28	3.79	4.62	1.60	0.75
29	6.01	3.50	0.34	1.23
30	7.67	4.66	3.50	0.61

TABLA V. Datos referidos al grupo II en cuanto a la concentración de glutatión reducido eritrocitario (GSH), tioéteres urinarios (TU), premutágenos (PMUT) y mutágenos (MUT) en orina.

CASO	GSH	TU	PMUT	MUT
31	9.94	10.80	3.45	0.23
32	7.98	7.11	4.60	0.32
33	6.57	11.00	7.50	1.03
34	8.02	6.69	12.35	8.12
35	4.21	5.40	7.87	0.98
36	7.38	4.16	19.00	1.00
37	3.92	3.60	4.90	0.29
38	5.60	3.33	3.87	0.35
39	5.22	8.66	7.15	1.54
40	5.11	7.16	5.73	2.06
41	4.43	2.60	15.79	0.50
42	7.36	11.90	6.29	1.97
43	3.76	11.00	12.46	0
44	7.96	7.20	8.67	0.75
45	4.37	6.88	4.24	1.45
46	11.43	11.30	2.38	0.26
47	4.61	14.90	6.54	0.70
48	4.00	8.09	3.47	0.60
49	5.78	6.63	16.38	0.77
50	8.15	7.75	1.11	0.55
51	5.24	2.63	2.09	0.17
52	5.22	13.87	5.58	1.04
53	4.48	6.87	3.30	0.47
54	5.96	7.80	5.28	0.09
55	2.43	6.33	4.78	0.30
56	5.61	6.00	7.35	0.23
57	6.16	8.83	8.06	1.30
58	5.90	7.72	6.65	0.72
59	4.23	4.16	3.65	0
60	10.00	8.75	4.73	0.57

TABLA VI. Datos referidos al grupo III en cuanto a la concentración de glutatión reducido eritrocitario (GSH), tioéteres urinarios (TU), premutágenos (PMUT) y mutágenos (MUT) en orina.

CASO	GSH	TU	PMUT	MUT
61	4.20	2.40	3.07	0.57
62	7.61	3.26	1.17	0.26
63	5.91	6.00	2.47	0.82
64	5.27	10.00	0.60	0.26
65	4.70	3.46	1.09	0.45
66	4.52	3.58	0.51	0.51
67	4.52	6.33	0.33	0.16
68	4.79	4.12	1.83	0.34
69	7.93	6.00	1.86	0.99
70	6.12	2.16	7.16	0.30
71	6.83	4.12	1.38	0.12
72	10.80	7.80	0	0
73	8.98	4.81	0.62	0.08
74	5.41	3.72	0.08	0.34
75	7.03	3.00	0.18	0.09
76	6.27	1.85	4.91	0.12
77	3.48	2.25	1.25	0.06
78	4.96	1.93	0.41	0.11
79	5.31	2.83	5.50	1.00
80	3.16	1.90	2.68	0.08
81	4.02	3.57	1.61	0.62
82	5.62	10.80	0	0
83	6.31	2.00	8.56	0.38
84	5.71	1.36	5.61	0.43
85	5.98	1.10	4.18	0.09
86	4.57	6.83	15.65	0.15
87	7.62	1.56	3.81	0.25
88	4.21	5.16	4.83	1.83
89	4.34	3.14	0.53	3.44
90	7.10	11.60	0	0
91	5.09	2.84	0.59	0.14
92	8.33	3.75	0.15	0.63
93	5.68	3.33	4.33	0.66
94	4.09	5.66	0	0
95	7.57	4.13	0.06	0.06
96	6.32	10.00	2.37	2.17
97	4.33	6.33	0.50	0.16
98	2.20	3.25	0.06	0.06
99	9.11	15.16	0.16	1.50
100	1.76	2.50	3.50	0.16

TABLA VII. Datos referidos al grupo I en cuanto a la frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas (SCEs), índice de proloferación celular (PRI), micronúcleos/1000 células (MN) e índice mitótico/300 células (IM).

CASO	SCEs	PRI	MN	IM
1	6.10	1.26	10	10
2	7.80	1.16	19	5
3	6.70	1.07	12	7
4	6.60	1.17	9	22
5	6.45	1.47	5	12
6	5.70	1.13	5	8
7	4.90	1.72	2	20
8	5.30	1.39	6	11
9	5.90	1.65	4	7
10	6.37	1.76	3	30
11	5.50	1.07	10	5
12	6.05	1.21	6	3
13	6.25	1.35	9	13
14	5.62	1.64	7	15
15	6.67	1.58	5	18
16	7.25	1.69	11	28
17	6.55	1.60	9	24
18	7.78	1.72	3	50
19	5.30	1.80	15	12
20	6.19	1.41	10	22
21	6.82	1.43	1	16
22	6.60	1.37	2	5
23	5.60	1.58	4	7
24	4.90	1.32	13	8
25	5.80	1.57	6	9
26	5.30	1.55	5	8
27	5.70	1.56	7	21
28	5.50	1.70	7	11
29	6.28	1.80	13	10
30	7.50	1.10	12	5

TABLA VIII. Datos referidos al grupo II en cuanto a la frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas (SCEs), índice de proloferación celular (PRI), micronúcleos/1000 células (MN) e índice mitótico/300 células (IM).

CASO	SCEs	PRI	MN	IM
31	8.71	1.12	17	9
32	7.79	1.10	20	8
33	5.40	1.13	13	7
34	7.40	1.13	12	9
35	9.90	1.14	24	23
36	4.60	1.10	9	5
37	5.50	1.16	19	6
38	7.30	1.07	8	9
39	7.50	1.11	7	10
40	5.80	1.56	11	10
41	6.06	1.69	15	5
42	7.51	1.85	12	29
43	8.45	1.47	18	20
44	6.81	1.48	3	22
45	5.74	1.78	5	68
46	7.89	1.79	7	24
47	7.70	1.45	8	6
48	5.66	1.65	12	8
49	7.56	1.70	7	26
50	5.80	1.40	11	26
51	7.05	1.45	6	12
52	7.61	1.70	13	11
53	8.87	1.60	15	22
54	5.46	1.52	8	6
55	7.01	1.39	13	7
56	4.70	1.63	7	13
57	5.60	1.84	5	11
58	6.80	1.67	8	8
59	6.75	1.56	9	9
60	6.04	1.07	14	11

TABLA IX. Datos referidos al grupo III en cuanto a la frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas (SCEs), índice de proloferación celular (PRI), micronúcleos/1000 células (MN) e índice mitótico/300 células (IM).

CASO	SCEs	PRI	MN	IM
61	6.45	1.75	10	24
62	7.52	1.14	15	31
63	8.20	1.25	25	30
64	8.36	1.04	14	28
65	5.80	1.36	15	19
66	6.00	1.13	11	24
67	8.60	1.34	34	12
68	6.15	1.40	26	19
69	7.85	1.69	23	24
70	8.90	1.12	21	24
71	6.85	1.54	30	12
72	6.70	1.21	23	23
73	7.40	1.16	29	29
74	8.05	1.51	16	28
75	7.90	1.23	27	17
76	7.25	1.20	33	23
77	6.85	1.46	48	18
78	6.40	1.27	14	31
79	7.95	1.09	25	32
80	7.80	1.26	25	34
81	8.30	1.35	19	24
82	8.10	1.20	18	44
83	7.75	1.71	17	29
84	7.85	1.25	16	25
85	8.05	1.26	24	12
86	8.80	1.20	28	28
87	7.20	1.08	20	18
88	8.35	1.32	18	10
89	7.75	1.15	27	2
90	7.58	1.28	18	17
91	6.18	1.36	22	22
92	7.84	1.04	21	6
93	10.20	1.42	17	20
94	8.10	1.13	29	29
95	6.90	1.68	13	12
96	7.23	1.51	34	33
97	9.12	1.09	26	21
98	6.20	1.22	15	19
99	7.80	1.31	31	24
100	8.37	1.15	22	16

TABLA X. Datos referidos al grupo I en cuanto a las aberraciones tipo cromosómico y tipo cromatídico, por 100 células.

CASO	AB.TIPO CROMATIDICO		AB.TIPO CROMOSOMICO	
	ROTURAS (delecciones)	INTERCAMBIOS (radiales)	ROTURAS (delecciones)	INTERCAMBIOS (anillos,..)
1	1	0	0	0
2	1	1	0	1
3	1	0	0	1
4	1	0	0	1
5	0	1	0	0
6	1	2	0	0
7	1	0	0	1
8	1	1	1	0
9	0	0	1	0
10	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND
12	0	0	0	0
13	3	0	0	0
14	0	0	0	1
15	0	0	0	0
16	1	1	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	ND	ND	ND	ND
20	0	0	0	0
21	1	0	0	1
22	ND	ND	ND	ND
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	ND	ND	ND	ND
27	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND
29	ND	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND

TABLA XI. Datos referidos al grupo II en cuanto a las aberraciones tipo cromosómico y tipo cromatídico, por 100 células.

CASO	AB.TIPO CROMATIDICO		AB.TIPO CROMOSOMICO	
	ROTURAS (delecciones)	INTERCAMBIOS (radiales)	ROTURAS (delecciones)	INTERCAMBIOS (anillos,..)
31	0	0	1	0
32	1	0	0	1
33	0	0	0	0
34	2	0	0	1
35	1	1	1	0
36	0	1	1	0
37	1	0	0	0
38	1	1	0	0
39	2	0	0	0
40	0	0	0	0
41	0	0	0	0
42	ND	ND	ND	ND
43	1	0	0	0
44	1	0	0	0
45	ND	ND	ND	ND
46	2	1	0	0
47	2	0	0	0
48	0	1	0	0
49	0	1	0	0
50	1	0	0	0
51	0	0	0	0
52	1	0	0	1
53	1	2	0	1
54	1	0	1	0
55	0	0	0	0
56	1	0	0	0
57	2	0	0	1
58	1	1	0	1
59	0	0	1	1
60	0	0	0	1

TABLA XII. Datos referidos al grupo III en cuanto a las aberraciones tipo cromosómico y tipo cromatídico, por 100 células.

CASO	AB.TIPO CROMATIDICO		AB.TIPO CROMOSOMICO	
	ROTURAS (delecciones)	INTERCAMBIOS (radiales)	ROTURAS (delecciones)	INTERCAMBIOS (anillos,..)
61	1	0	2	0
62	2	0	2	0
63	0	1	1	0
64	0	0	3	0
65	1	1	0	0
66	0	0	1	0
67	0	0	2	0
68	0	0	0	0
69	2	0	1	2
70	0	1	0	1
71	0	1	4	0
72	0	0	5	0
73	2	0	3	1
74	1	2	1	0
75	2	0	6	1
76	1	0	3	0
77	0	1	7	1
78	1	0	5	1
79	1	1	3	1
80	0	0	4	0
81	2	1	2	0
82	0	0	2	0
83	0	1	3	0
84	1	0	1	0
85	0	0	1	0
86	1	0	2	0
87	2	0	2	0
88	1	1	2	0
89	0	0	1	0
90	4	0	2	1
91	1	0	1	0
92	2	0	1	0
93	2	0	2	1
94	0	2	2	0
95	3	0	1	1
96	2	0	3	0
97	1	0	2	0
98	1	0	4	0
99	1	0	1	0
100	3	0	1	0

TABLA XIII. Datos referidos al grupo I en cuanto a ocurrencia de Gaps cromatídicos y cromosómicos y las aberraciones totales (incluyendo y excluyendo Gaps) por cada 100 células.

CASO	GAPS			ABERRACIONES TOTALES	
	Cromatídicos	Cromosómicos	Totales	Incluyendo Gaps	Excluyendo Gaps
1	3	1	4	5	1
2	0	0	0	3	3
3	1	0	1	3	2
4	1	0	1	3	2
5	1	0	1	2	1
6	0	0	0	3	3
7	0	0	0	2	2
8	1	0	1	4	3
9	0	1	1	2	1
10	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND
12	1	0	1	1	0
13	2	0	2	5	3
14	1	0	1	2	1
15	0	0	0	0	0
16	2	0	2	4	2
17	1	0	1	1	0
18	2	0	2	2	0
19	ND	ND	ND	ND	ND
20	0	1	1	1	0
21	0	0	0	2	2
22	ND	ND	ND	ND	ND
23	1	0	1	1	0
24	1	1	2	2	0
25	2	0	2	2	0
26	ND	ND	ND	ND	ND
27	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND	ND
29	ND	ND	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND	ND

TABLA XIV. Datos referidos al grupo II en cuanto a ocurrencia de Gaps cromatídicos y cromosómicos y las aberraciones totales (incluyendo y excluyendo Gaps) por cada 100 células.

CASO	GAPS			ABERRACIONES TOTALES	
	Cromatídicos	Cromosómicos	Totales	Incluyendo Gaps	Excluyendo Gaps
31	2	2	4	5	1
32	0	0	0	2	2
33	1	0	1	1	0
34	1	0	1	4	3
35	3	0	3	6	3
36	1	1	2	4	2
37	4	0	4	5	1
38	0	1	1	3	2
39	1	0	1	3	2
40	0	1	1	1	0
41	0	0	0	0	0
42	ND	ND	ND	ND	ND
43	3	1	4	5	1
44	0	0	0	1	1
45	ND	ND	ND	ND	ND
46	0	0	0	3	3
47	0	0	0	2	2
48	1	0	1	2	1
49	1	0	1	2	1
50	2	0	2	3	1
51	1	0	1	1	0
52	2	1	3	5	2
53	1	1	2	6	4
54	1	1	2	4	2
55	1	0	1	1	0
56	2	0	2	3	1
57	2	1	3	6	3
58	2	0	2	5	3
59	1	0	1	3	2
60	1	1	2	3	1

TABLA XV. Datos referidos al grupo III en cuanto a ocurrencia de Gaps cromatídicos y cromosómicos y las aberraciones totales (incluyendo y excluyendo Gaps) por cada 100 células.

CASO	GAPS			ABERRACIONES TOTALES	
	Cromatídicos	Cromosómicos	Totales	Incluyendo Gaps	Excluyendo Gaps
61	1	0	1	4	3
62	0	1	1	5	4
63	1	1	2	4	2
64	0	1	1	4	3
65	2	2	4	6	2
66	0	1	1	2	1
67	1	1	2	4	2
68	2	1	3	3	0
69	0	1	1	6	5
70	3	2	5	7	2
71	2	0	2	7	5
72	3	1	4	9	5
73	4	3	7	13	6
74	1	1	2	6	4
75	3	0	3	12	9
76	2	1	3	7	4
77	1	0	1	10	9
78	1	0	1	8	7
79	3	0	3	9	6
80	2	2	4	8	4
81	1	1	2	7	5
82	1	0	1	3	2
83	1	1	2	6	4
84	3	1	4	6	2
85	2	2	4	5	1
86	0	2	2	5	3
87	0	1	1	5	4
88	0	3	3	7	4
89	1	3	4	5	1
90	2	0	2	9	7
91	2	1	3	5	2
92	2	0	2	5	3
93	5	0	5	10	5
94	1	1	2	6	4
95	1	1	2	7	5
96	2	1	3	8	5
97	2	0	2	5	3
98	2	0	2	7	5
99	1	0	1	3	2
100	2	1	3	7	4

TABLA XVI. Datos referidos al grupo I en relación a su fenotipo acetilador (FA) e hidroxilador (FH), según su índice metabólico y clasificación en metabolizadores lentos (L) y rápidos (R).

CASO	ACETILADOR	FA	HIDROXILADOR	FH
1	0.63	L	0.20	R
2	0.34	L	0.50	R
3	0.82	R	0.20	R
4	0.95	R	0.40	R
5	0.98	R	1.05	R
6	0.51	L	ND	ND
7	0.85	R	2.18	R
8	0.32	L	0.19	R
9	0.90	R	0.20	R
10	0.67	L	ND	ND
11	0.23	L	0.40	R
12	0.53	L	ND	ND
13	0.96	R	0.10	R
14	0.58	L	0.75	R
15	0.99	R	1.00	R
16	0.98	R	2.40	R
17	0.45	L	ND	ND
18	0.53	L	0.40	R
19	0.99	R	0.10	R
20	0.60	L	0.60	R
21	0.80	R	0.20	R
22	0.50	L	2.95	R
23	0.97	R	2.82	R
24	0.42	L	ND	ND
25	0.73	R	0.14	R
26	0.98	R	ND	ND
27	0.97	R	0.20	R
28	0.85	R	1.21	R
29	0.51	L	ND	ND
30	0.48	L	0.06	R

TABLA XVII. Datos referidos al grupo II en relación a su fenotipo acetilador (FA) e hidroxilador (FH), según su índice metabólico y clasificación en metabolizadores lentos (L) y rápidos (R).

CASO	ACETILADOR	FA	HIDROXILADOR	FH
31	0.88	R	0.80	R
32	0.85	R	1.65	R
33	0.84	R	ND	ND
34	0.73	R	1.42	R
35	0.86	R	2.12	R
36	0.60	L	0.04	R
37	0.73	R	0.21	R
38	0.54	L	ND	ND
39	0.75	R	ND	ND
40	0.59	L	27.70	L
41	0.93	R	0.57	R
42	0.68	L	0.10	R
43	0.56	L	ND	ND
44	0.71	R	ND	ND
45	0.85	R	1.12	R
46	0.65	L	13.20	L
47	0.44	L	ND	ND
48	0.34	L	ND	ND
49	0.43	L	2.20	R
50	0.95	R	1.31	R
51	0.52	L	0.15	R
52	0.97	R	9.00	R
53	0.94	R	0.99	R
54	0.59	L	1.55	R
55	0.84	R	ND	ND
56	0.99	R	0.29	R
57	0.41	L	0.06	R
58	0.47	L	0.67	R
59	0.80	R	0.56	R
60	0.48	L	0.27	R

TABLA XVIII. Datos referidos al grupo III en relación a su fenotipo acetilador (FA) e hidroxilador (FH), según su índice metabólico y clasificación en metabolizadores lentos (L) y rápidos (R).

CASO	ACETILADOR	FA	HIDROXILADOR	FH
61	0.92	R	1.09	R
62	0.63	L	ND	ND
63	0.51	L	5.37	R
64	0.28	L	1.68	R
65	1.00	R	1.20	R
66	0.52	L	0.44	R
67	0.89	R	0.35	R
68	0.61	L	35.87	L
69	0.81	R	1.72	R
70	0.27	L	3.25	R
71	0.88	R	5.87	R
72	0.70	R	1.27	R
73	0.48	L	1.56	R
74	0.62	L	0.92	R
75	0.60	L	0.78	R
76	0.56	L	0.34	R
77	0.48	L	45.90	L
78	0.43	L	0.20	R
79	0.60	L	0.65	R
80	0.39	L	0.19	R
81	0.40	L	4.16	R
82	0.68	L	ND	ND
83	0.41	L	0.29	R
84	0.50	L	0.26	R
85	0.78	R	10.11	R
86	0.88	R	1.18	R
87	0.77	R	6.00	R
88	0.52	L	0.26	R
89	0.73	R	0.64	R
90	0.87	R	0.83	R
91	0.50	L	ND	ND
92	0.58	L	0.22	R
93	0.60	L	1.09	R
94	0.68	L	1.51	R
95	0.55	L	9.23	R
96	0.48	L	0.04	R
97	0.40	L	0.62	R
98	0.84	R	ND	ND
99	0.42	L	ND	ND
100	0.88	R	7.06	R

4. DISCUSSION

DISCUSIÓN

La biomonitorización de la exposición a mutágenos/carcinógenos en humanos es de gran trascendencia, en tanto que permite mejorar la evaluación de la dosis externa, detectar los efectos biológicos reversibles y, por tanto, prevenir los irreversibles, identificar los acontecimientos celulares que ocurren en la génesis de la neoplasia, delimitar grupos de riesgo y ayudar a identificar los mecanismos de las acciones tóxicas.

Los estudios epidemiológicos proporcionan una importante información sobre las respuestas de los individuos expuestos, pero solo detectan amplios incrementos del riesgo relativo. Además, no facilitan pruebas directas de una relación causa-efecto. Por tanto, la biomonitorización es necesaria para complementar los resultados que proporcionan los estudios epidemiológicos, así como los de carcinogénesis experimental.

En nuestro trabajo se ha realizado monitorización biológica de la exposición para la valoración del riesgo en humanos; ésta, como se ha dicho, puede superar muchas de las limitaciones de los estudios epidemiológicos y también de los realizados "in vitro" o "in vivo" sobre animales de experimentación. Respecto a estos últimos, cada vez se tiende más a sustituirlos por test a corto plazo, ya que además de ser largos y costosos hay que sacrificar gran número de animales, y los resultados obtenidos con ellos no siempre son extrapolables al hombre, debido a las grandes diferencias interespecies.

Por otra parte, los test de mutagenicidad realizados sobre bacterias, o sobre distintas líneas celulares de mamíferos, pueden presentar falsos positivos o falsos negativos, disminuyendo su capacidad predictiva. Lo mismo puede ocurrir con los test de carcinogénesis realizados en el animal "in vivo".

Los métodos utilizados en nuestro estudio, para la biomonitorización de la exposición, miden o efectos biológicos precoces o dosis interna, teniendo en cuenta los factores individuales que modulan la magnitud de la exposición.

Los efectos biológicos precoces han sido evaluados mediante tests citogenéticos a corto plazo realizados en cultivos de linfocitos de sangre periférica, como son: el estudio de las aberraciones cromosómicas (AC), los intercambios entre cromátides hermanas (SCE) y los micronúcleos (MN). También determinamos el índice de proliferación celular (PRI) y el índice mitótico (IM).

La dosimetría interna o endodosimetría se llevó a cabo mediante la medida de la concentración de sustancias tóxicas o sus metabolitos en los fluidos corporales o mediante el análisis de mutagenicidad en orina (test de Ames) o midiendo en orina la concentración de los productos de detoxicación (tioéteres urinarios).

Existen otros métodos muy específicos que consisten en la determinación de la dosis biológicamente efectiva, como son la formación de aductos a ADN, ARN y proteínas, que solo son aplicables cuando está implicado un agente único y conocido. Este método no ha sido utilizado por nosotros, ya que en el tabaco existen al menos 40 sustancias carcinógenas y no hubiera sido válido para establecer la imputabilidad de alguna de ellas en la génesis del cáncer de pulmón.

Se acepta unánimemente que la iniciación de la carcinogénesis es un acontecimiento mutacional, de ahí la utilidad de los marcadores genéticos que evalúan el daño al ADN como indicadores de exposición a agentes potencialmente carcinógenos. Una lesión del ADN puede ser reparada o no y, por otra parte, la reparación puede ser libre de error o tendiente al mismo. De esta forma, los indicadores biológicos miden exposición a carcinógenos y no riesgo de

carcinogénesis.

No obstante, los factores ambientales son muy importantes, ya que el 80% de todos los cánceres están relacionados con la exposición a carcinógenos⁴⁵⁴. A esta conclusión se ha llegado a la vista del gran número de agentes químicos que producen tumores en animales de experimentación. Asimismo, hay evidencia inequívoca de exposición a carcinógenos relacionados con la incidencia de tipos específicos de cáncer en el hombre, como por ejemplo la exposición a arilaminas y cáncer de vejiga, exposición a benceno y leucemias, neoplasias secundarias a quimioterapia y, sobre todo, el hábito de fumar y el cáncer de pulmón⁴⁵⁵.

La evidencia más importante del peso del ambiente en la producción de neoplasias derivan del hecho constatado de que cuando las poblaciones migran de un país a otro, adoptan el patrón de incidencia de tipos tumorales del país de adopción.

Todos los organismos han evolucionado en sus complejos sistemas metabólicos para adaptarse a los efectos tóxicos del ambiente. Las diferencias individuales en las vías metabólicas pueden dar lugar a profundas diferencias en la respuesta tóxica. Es cierto por tanto, que las enzimas involucradas juegan un papel de primera importancia en la susceptibilidad individual a los carcinógenos. Algunos de los factores metabólicos que determinan el efecto de un carcinógeno quedan reflejados en la Tabla 86.

Tabla 86. Factores implicados en la sensibilidad a los efectos carcinogénicos de las sustancias químicas.

Vías metabólicas individuales	Determinante	Consecuencias de las diferencias
CARCINÓGENOS QUÍMICOS		
Absorción	Transporte activo vs pasivo	Alteración del nivel de carcinógeno circulante
Distribución	Flujo sanguíneo, unión a proteínas	Alteración del nivel de carcinógeno en célula diana
Acumulación	Captación-excreción activa	Alteración de carcinógeno intracelular
Activación del carcinógeno	Cit P450, EH, O-AT	Alteración de la concentración de carcinógeno final
Detoxicación del carcinógeno	Conjugación con glutatión	Alteración del nivel de formación de aductos al ADN
Activación/detoxicación a distancia	Metabolismo hepático	Alteración de la concentración de carcinógeno circulante
Reparación de aductos o mutaciones	Enzimas reparadoras del ADN	Alteración de la frecuencia de mutación
Respuesta al estrés	Respuesta proteica al estrés	Alteración de la frecuencia de mutación y sensibilidad por exposiciones repetidas al carcinógeno
PROMOTORES TUMORALES		
Absorción/captación	Acumulación	Alteración de la concentración intracelular
Metabolismo	Cit P450, etc	Acción prolongada o reducida
Interacción en célula	Complejo: receptores, señales, etc	Alteración del nivel de estimulación
Sistemas antirradicales de oxígeno	GSH, SOD, GSH-peroxidasa, antirradicales libres	Alteración del efecto promotor
Respuesta estrés	La mayoría de las enzimas citada	Modulación de la estimulación celular

Por otra parte, la variación interindividual en la activación metabólica de carcinógenos químicos, genéticamente determinada, es de gran importancia para explicar la diferente susceptibilidad individual para la carcinogénesis química. En este sentido son de gran interés los estudios que van dirigidos a esclarecer las diferencias genéticas para esa susceptibilidad a desarrollar el cáncer de pulmón, en términos de polimorfismos genéticos (acetilador e hidroxilador), intentando aclarar si la intervención de las diferentes enzimas implicadas pueden influir en la activación del benzo(a)pireno y otros procarcinógenos contenidos en el humo del tabaco⁴⁵⁶.

Los riesgos carcinogénicos de la exposición a sustancias químicas exógenas dependen no solo de las propiedades intrínsecas y dosis de tales sustancias, sino también de las células diana y de la biotransformación y respuesta reparativa del huésped. Estas respuestas están determinadas genéticamente y, con frecuencia, sufren

variaciones significativas, que son relevantes para la caracterización del riesgo en subgrupos de población.

Los polimorfismos de las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, epóxido hidrolasas, glutatión-S-transferasas y N-acetil transferasas ofrecen una importante fuente de variabilidad en la biotransformación de procarcinógenos. Muchas sustancias químicas deben ser activadas enzimáticamente para ser carcinógenas, generalmente por monooxigenasas microsomales (citocromo P-450), a electrofílicos intermedios con carácter genotóxico. Otros sistemas enzimáticos detoxifican carcinógenos químicos mediante hidrólisis de epóxidos, conjugación con GSH o acetilación⁴⁵⁷.

Los potentes carcinógenos vesicales ~~es~~ -naftilamina, benzidina y 4-aminobifenil, requieren acetilación para ser inactivados. Los individuos acetiladores lentos tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de vejiga que los acetiladores rápidos⁴⁵⁸.

Existe en la actualidad una amplia evidencia de que, tanto los factores genéticos como los ambientales, juegan un importante papel en la susceptibilidad a padecer cáncer. La distribución geográfica de las altas exposiciones a carcinógenos químicos, virus y radiaciones, tiene gran repercusión sobre la distribución de algunos tipos de cáncer y, por tanto, son determinantes de la incidencia de la enfermedad neoplásica⁴⁵⁹.

Sin embargo, hay una gran variabilidad interindividual en cuanto a la susceptibilidad de enfermar, lo que fuerza a pensar que los factores genéticos intervienen en gran medida e interactúan con los ambientales.

La importancia de los factores genéticos para el desarrollo de cáncer de pulmón se pone de manifiesto por la existencia de familias con superior predisposición a

padecerlo. Por otra parte los factores ambientales, como el hábito tabáquico son también determinantes, como lo muestran los estudios epidemiológicos, que muestran asociación entre tabaquismo y cáncer de pulmón, de manera que un miembro no fumador de una familia con antecedentes de neoplasia broncopulmonar, presenta un riesgo inferior que el que presentaría en caso de fumar.

Por una parte, la incidencia de cáncer es determinada por el entorno, ya que individuos con susceptibilidad genética pueden no contraer la enfermedad por no estar expuestos a la sustancia desencadenante necesaria y, por otra parte, el cáncer es una enfermedad poligénica y la penetrancia de cualquier gen aislado puede no ser suficiente para producir un efecto observable⁴⁶⁰.

La mayoría de los cánceres surgen de mutaciones genéticas inducidas por sustancias químicas ambientales. El cambio metabólico resultante puede conferir un fenotipo tumoral. Actualmente, se están realizando grandes progresos en el campo de la biología molecular para identificar los genes responsables⁴⁶¹.

Uno de los métodos de biomonitorización utilizados en nuestro trabajo para valorar la exposición a sustancias mutágenas y/o carcinógenas han sido los estudios citogenéticos.

Estas pruebas "in vivo / in vitro", permiten identificar y monitorizar, sobre el hombre en su integridad, los agentes peligrosos para poblaciones de riesgo en su exposición a sustancias genotóxicas⁴⁶².

Para ello hemos utilizado linfocitos de sangre periférica, ya que la obtención de la muestra es fácil y existe la posibilidad de disponer de gran número de células para el estudio. Además, los cambios producidos en estas células tras la exposición a una sustancia potencialmente

cancerígena, pueden ser indicativos del daño producido en otras células del organismo.

La técnica utilizada de microcultivo de linfocitos estimulados con PHA, reúne condiciones que la hacen aconsejable para nuestro trabajo: primero, porque la presencia de hematíes, al hacer de tampón, estabilizan el pH y, en segundo lugar, por la eficacia de la estimulación blastogénica.

Los intercambios entre cromátides hermanas (SCE), representan cruces de material genético entre una cromátide y su homóloga.

El estudio de los SCE ha sido propuesto como test rápido para medir la actividad de recombinación del material genético. Su interés se ha centrado en la posibilidad de la detección de agentes físicos y químicos potencialmente mutágenos.

La formación de SCE requiere síntesis de ADN para manifestarse, por lo que las lesiones han de pasar por una fase S para expresarse citológicamente.

El mecanismo molecular de la formación de SCE no se conoce, se cree que se forman durante la replicación del ADN mediante recombinación genética entre sus dos filamentos⁴⁶³. Este proceso puede estar o no libre de error, pero en cualquier caso la aparición de SCE indica que la exposición a agentes que dañan el ADN ha tenido lugar^{464, 465}.

Este test resulta de gran sensibilidad en el "screening" de mutágenos, con la ventaja de no presentar falsos negativos^{466, 467}.

La concentración de BrdUrd utilizado para diferenciar las cromátides influye en la frecuencia de SCE. Para evitar su influencia, en nuestro trabajo fuimos muy rigurosos al añadir el BrdUrd, y tuvimos especial cuidado de añadir la

misma cantidad en todos los cultivos, los cuales se protegieron de la luz a partir de ese momento con papel de aluminio. La duración de los cultivos fue siempre de 72 horas, y el medio de cultivo utilizado en todas las muestras fue un suero bovino fetal comercializado por Gibco.

Nuestros resultados reflejan un aumento significativo de la frecuencia de SCE en el grupo de individuos con cáncer de pulmón, respecto a los individuos sanos fumadores ($t=-2.82$; $p<0.05$) y a los sanos no fumadores ($t=-7.05$; $p<0.001$), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Dosaka et al.(1987), que encuentran un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia basal de SCE en pacientes con cáncer de pulmón, al compararlos con individuos sanos (fumadores y no fumadores) de alto y bajo riesgo de cáncer, considerando de alto riesgo aquellos individuos con cuatro o más parientes con neoplasias y de bajo riesgo, aquellos sin historia familiar de neoplasias. Tras la exposición "in vitro" a benzopireno, los linfocitos de los individuos con cáncer de pulmón y los de los sanos de alto riesgo, exhibían un aumento significativo de SCE respecto a los de bajo riesgo, pero no hubo diferencias entre los de cáncer de pulmón y los de alto riesgo, por lo que los linfocitos de los individuos de alto riesgo parecen ser más susceptibles al daño inducido al ADN por benzopireno que los de aquellas personas de bajo riesgo⁴⁶⁸.

Aunque el cáncer de pulmón se considera que es causado principalmente por factores ambientales como el humo de tabaco⁴⁶⁹, se ha observado un aumento del riesgo de cáncer de pulmón en individuos con historia familiar de primer grado⁴⁷⁰. Semejante, aunque no idéntico, riesgo familiar se ha encontrado para otros tipos de cáncer, lo cual sugiere un importante papel de los factores genéticos en la carcinogénesis⁴⁷¹.

La inestabilidad genética, expresada como fragilidad cromosómica innata, y predisposición al desarrollo de cáncer

son hechos compartidos por pacientes con algunos desórdenes hereditarios raros denominados en conjunto "síndromes de fragilidad cromosómica"⁴⁷². Las células de esos pacientes exhiben una sensibilidad cromosómica aumentada a agentes físicos y químicos que dañan el ADN, que puede detectarse mediante lesiones cromosómicas o SCEs.

Esta hipersensibilidad cromosómica se ha observado también en células de pacientes con enfermedades congénitas con predisposición a padecer neoplasias, como el síndrome de Down^{473,474}, o en células de varios pacientes con cáncer^{475,476}. Estas observaciones citogenéticas implican que la susceptibilidad a genotoxinas puede estar relacionada con el riesgo de cáncer o con un estado preneoplásico.

Hopkin y Evans (1980) observaron frecuencias más elevadas de SCEs en linfocitos de fumadores con cáncer de pulmón que en fumadores sanos o con otros tipos de cáncer. Las frecuencias de SCE de dos ex-fumadores con cáncer de pulmón fueron similares a las de los sanos no fumadores, lo que sugiere que este aumento no es secundario al desarrollo del cáncer⁴⁷⁷. Estos autores también encuentran un aumento de SCE en fumadores con cáncer de pulmón al compararlos con fumadores con otros tipos de cáncer.

Algunos estudios realizados en ex-fumadores han mostrado una disminución de los SCE al cabo de un tiempo de abandonar el hábito. Sarto et al (1987) encontraron que esta disminución comenzaba a ser evidente a los 18 días de dejar de fumar, llegando a ser significativa después de 78 días; el descenso fue más lento hasta llegar al octavo mes⁴⁷⁸.

Tucker et al.(1987) también encontraron esta disminución de los SCE, aunque no fue evidente hasta pasados 12 meses⁴⁷⁹.

También se ha observado una disminución de SCE en células CHO (ovario de hamster chino), al retirar la

exposición de las mismas a derivados de HAP, posiblemente por reparación del ADN⁴⁸⁰.

Por otra parte, Carrano (1982) no encontró una disminución estadísticamente significativa de las frecuencias de SCE en un grupo de tres individuos tras 6-10 meses de dejar de fumar⁴⁸¹.

En nuestro trabajo, los individuos con cáncer de pulmón podrían ser considerados como ex-fumadores por el hecho de llevar varios días sin fumar (107.15 ± 92.96), sin embargo no hemos evidenciado una disminución de los SCE en este grupo, al compararlo con los otros, debido a que los individuos con cáncer de pulmón quizá no llevaran el tiempo suficiente sin fumar como para que aparezca reflejado en los resultados. Por otro lado no han sido ex-fumadores estrictos, ya que muchos de ellos fumaban esporádicamente, aunque con menor intensidad, en los días anteriores a la toma de la muestra.

De cualquier modo, desconocemos si ha existido una disminución real de las frecuencias de SCE dentro del mismo grupo, ya que carecemos de datos previos a este análisis.

No se ha establecido en qué momento, después de empezar a fumar, se produce un aumento detectable de SCE y por cuánto tiempo permanece tras un período sin fumar. Diferencias en el metabolismo de los agentes inductores de SCE así como la reparación de los SCE producidos por el daño al ADN, pueden ser una causa más de las variaciones individuales en los niveles de SCE.

Por otra parte, los SCE reflejan una exposición reciente, ya que ocurren al tiempo de la síntesis de ADN. Por tanto, las lesiones que dan lugar a los SCE, probablemente son reparadas "in vivo" y solo aquellas lesiones inducidas poco antes de la toma de la muestra de sangre pueden ser vistas.

En nuestro estudio, los fumadores sanos presentaron una mayor frecuencia de SCEs que los no fumadores, sin llegar a alcanzar significación estadística ($t=-2.43$; $p>0.05$), significación que sí fue encontrada en otros trabajos llevados a cabo por nuestro grupo^{482,483} y en otros trabajos revisados^{484,485,486,487}, aunque otros autores no han encontrado tal efecto^{488,489}.

En el presente trabajo, la edad no parece haber influido en los resultados, aunque algunos trabajos sugieren un aumento de los SCE en los individuos de mayor edad^{490,491}. El tiempo del hábito no ha influido sobre la frecuencia de los SCE, y en relación al tipo de tabaco fumado, solo encontramos un aumento significativo en el grupo de fumadores sanos que consumían tabaco rubio.

La cinética de proliferación celular (PRI), constituye un dato importante en la evaluación del daño inducido sobre el ADN por los diferentes agentes. Refleja el porcentaje de células que han sufrido una, dos o más replications en presencia del inductor, al compararla con las obtenidas en condiciones basales.

La identificación de las sucesivas replications sobre células en metafase, es posible mediante técnicas de marcaje con BrdUrd, ya que las células ofrecen diferentes muestras de tinción según hayan atravesado, en su presencia, uno, dos o más ciclos celulares. Los exámenes deben realizarse a concentraciones de las bases análogas que no inhiban la replicación celular, pero suficientes para determinar el marcaje de todas las células.

La mínima cantidad de BrdUrd necesaria para el análisis de la cinética celular es de 5 $\mu\text{g/ml}$.

Nuestros resultados reflejaron una disminución estadísticamente significativa del índice de proliferación

celular en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón al compararlos con los individuos sanos fumadores ($Z=-2.05$; $p<0.05$), y con los sanos que no fumaban ($Z=-2.92$; $p<0.01$), no encontrando diferencias entre los individuos sanos fumadores y no fumadores ($Z=-0.25$; $p>0.05$).

Nuestro trabajo está de acuerdo con los resultados de Lamberti et al. (1983), que, además de una disminución del PRI en individuos fumadores, observaron una correlación negativa entre los valores de PRI y las frecuencias de SCEs, indicando que, cultivos que se dividen lentamente, presentan altas frecuencias de SCEs⁴⁹². Lazutka y Dedonyté (1989) obtuvieron similares resultados en linfocitos humanos de varones⁴⁹³.

Ya que un menor PRI puede dar lugar a una mayor frecuencia de SCE, pudiera pensarse que los resultados obtenidos por nosotros en cuanto a la frecuencia de intercambios dependieran de esa menor cinética. Sin embargo, aunque la correlación entre ambos parámetros presenta un signo negativo, no ha alcanzado significación estadística, por lo que cabe pensar que el daño al ADN, detectado por los SCE, en nuestro estudio es independiente de cualquier efecto sobre la proliferación celular o síntesis de ADN.

Un aumento del daño al ADN da lugar a una menor síntesis de ADN que se traduce en un menor crecimiento celular en los cultivos⁴⁹⁴.

Sabemos que el índice de proliferación celular (PRI) es un indicador de la cinética celular en células cultivadas. La determinación del PRI en cultivos de linfocitos humanos puede ser útil como test de genotoxicidad, ya que la inhibición de la síntesis de ADN da lugar a una disminución de dicho índice⁴⁹⁵.

En nuestro estudio, el valor del PRI fue recogido en una sola ocasión, por lo cual no fue posible distinguir

entre un retraso en la respuesta al mitógeno y/o una afectación sobre la duración del ciclo celular.

En cuanto a la influencia de la edad sobre el PRI, no encontramos una clara influencia.

El tipo de tabaco fumado solo tuvo influencia en el grupo de fumadores sanos, en el cual encontramos un aumento de PRI en los consumidores de tabaco negro ($Z=-2.57$; $p<0.01$), de acuerdo con el hecho constatado de que el condensado de humo de tabaco negro contiene más aminas aromáticas carcinógenas que el humo de tabaco rubio⁴⁹⁶.

El tiempo de duración del hábito presentó una correlación moderada en el grupo de fumadores sanos ($r=0.35$), siendo ésta casi inexistente en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón.

El análisis de **las aberraciones cromosómicas** es el método más empleado para valorar los efectos precoces de las exposiciones a agentes genotóxicos. Esta determinación es un medio directo para medir cambios groseros en el ADN. Las aberraciones estructurales de los cromosomas resultan de la rotura y posterior reordenación de los cromosomas en formas anormales. Estos cambios son inducidos por sustancias que rompen el esqueleto del ADN o distorsionan su hélice.

Las aberraciones de tipo cromosómico derivan de la ausencia de reparación de lesiones en fase G0 (linfocitos circulantes) o G1 (durante el cultivo, en presencia del mitógeno), cuando los cromosomas no han replicado.

Al realizar el estudio estadístico de las aberraciones cromosómicas, tras clasificarlas en sus diferentes tipos (según la ISNC), nos encontramos con que las frecuencias eran muy bajas. Intentamos varias transformaciones de las variables sin llegar a normalizarlas. También intentamos aplicar el test exacto de Fisher; al no tener constancia de

como agrupar las variables para realizar una tabla de contingencia de 2x2, ensayamos diferentes puntos de corte, sin obtener resultados diferentes a los obtenidos mediante un test no paramétrico, por lo cual recurrimos a la utilización de éste último, dada su eficacia.

Al estudiar la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales, sin incluir los gaps, encontramos un aumento estadísticamente significativo en el grupo de individuos con cáncer de pulmón con respecto a los sanos, independientemente del consumo de tabaco, con una $p < 0.001$. Esta gran significación se produjo a expensas de las roturas cromosómicas, que también mostraron un aumento estadísticamente significativo en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón respecto a los individuos sanos fumadores y no fumadores con una $p < 0.0001$ en ambos casos. Al incluir los gaps, la significación estadística fue la misma que en el caso anterior, con una $p < 0.001$ en ambos contrastes.

Son muchos los trabajos que muestran mayor número de aberraciones cromosómicas en linfocitos de fumadores, respecto a los no fumadores: Obe y Herha (1978) encontraron un número elevado de aberraciones cromosómicas, tipo intercambios (anillos, dicéntricos), así como un aumento de intercambios cromatídicos en grandes fumadores, frente a no fumadores⁴⁹⁷. Otros autores también encontraron este incremento^{486, 491, 498, 499}.

En el presente trabajo no se ha constatado tal aumento, lo que concuerda con otros hallazgos encontrados por Bender et al. (1988, 1989)^{490, 500}.

En el trabajo de Johansson y Örndal (1989) no se detectaron diferencias entre las aberraciones presentadas por los fumadores con cáncer de pulmón y los controles fumadores⁵⁰¹. Aunque estos resultados no indican una disminución constitucional de la estabilidad cromosómica en pacientes con cáncer de pulmón, los autores no descartan tal

fragilidad, la cual puede no estar presente en todos los tipos celulares de un individuo, como han señalado Heim et al.(1985)⁵⁰².

La relación entre la tendencia constitucional a las roturas cromosómicas y la predisposición a padecer cáncer es incierta. Los síndromes de inestabilidad cromosómica, los cuales están asociados con un aumento de la incidencia de malignidad⁵⁰³, indican que la propia fragilidad cromosómica es importante en el riesgo de cáncer. Es razonable asumir que las diferencias en la estabilidad cromosómica constitucional deben ser la razón por la cual los individuos reaccionan de forma diferente ante la exposición a carcinógenos. Knudson (1985) ha sugerido que una elevada sensibilidad al carcinógeno, genéticamente determinada, debe ser la causa principal de la mayoría de los cánceres que en la actualidad se presume están inducidos por factores ambientales⁵⁰⁴.

De acuerdo con esto, los fumadores con cáncer de pulmón deberían mostrar frecuencias más elevadas de roturas cromosómicas que los fumadores sanos, lo cual coincide con el presente trabajo.

Basado en la premisa de que una elevada frecuencia de AC puede aumentar la probabilidad de recombinaciones que contribuyen a una transformación neoplásica⁵⁰⁵, un grupo Nórdico ha realizado un estudio prospectivo sobre un grupo de 2969 individuos, investigando si el aumento de AC, SCE o MN, en linfocitos periféricos, indican un aumento de riesgo para padecer cáncer⁵⁰⁶. Han encontrado que los sujetos con alta frecuencia de AC han desarrollado cáncer con el doble de frecuencia que los otros, sin llegar a ser significativo. Será necesario un seguimiento posterior, superior a 5 años, para demostrar un aumento real del riesgo, según indican los autores.

Al estudiar los gaps por separado, también encontramos

un aumento significativo de su frecuencia en el grupo de individuos con cáncer de pulmón al compararlo con el grupo de fumadores sanos ($p < 0.01$) y el de no fumadores ($p < 0.001$). Esta significación se produjo a expensas de los gaps cromosómicos.

La significación de los gaps no está clara⁵⁰⁷, ya que la relación entre gaps y roturas no se ha clarificado, se ha recomendado que los gaps sean contados y considerados separadamente de otros tipos de aberraciones.

Por otra parte, existe evidencia de que SCE y aberraciones cromosómicas estructurales son producidas por mecanismos totalmente diferentes⁵⁰⁸ y, por tanto, los resultados de ambos estudios no deben ser vistos como contradictorios, sino como complementarios.

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar los individuos que fumaban tabaco negro o rubio, en ninguno de los tipos de AC estudiadas y en ninguno de los grupos, a pesar de que el tabaco negro contiene más aminas aromáticas. Aunque existe evidencia de un mayor daño citogenético conforme avanza la edad, diversos autores han encontrado resultados contradictorios. En nuestro caso, tampoco constatamos una influencia significativa de la edad.

Respecto al tiempo del hábito, las correlaciones más elevadas las obtuvimos con las aberraciones totales, excluidos los gaps, tanto en el grupo de fumadores sanos ($r = 0.40$) como en el de cáncer de pulmón ($r = 0.30$). Al incluir los gaps, solo en el grupo de fumadores sanos se encontró una correlación moderada ($r = 0.35$). Las aberraciones cromosómicas del tipo anillos y dicéntricos, también mostraron una correlación positiva y moderada en ambos grupos de sanos y enfermos fumadores con una $r = 0.32$ y $r = 0.31$ respectivamente.

El test de **micronúcleos** refleja el daño causado al ADN,

ya que el porcentaje de MN refleja indirectamente las roturas cromosómicas (pérdidas de material genético) que han ocurrido durante la división celular. Su frecuencia es directamente proporcional al poder clastógeno del agente causal⁵⁰⁹. Los MN pueden formarse a partir de fragmentos acéntricos que fallan al incorporarse al núcleo hijo durante la división celular⁵¹⁰ o bien, por cromosomas enteros que sufren un retraso en su incorporación al núcleo principal durante la mitosis, debido al fallo del huso mitótico⁵¹¹.

En nuestro estudio, encontramos que los micronúcleos aumentaron significativamente en el grupo de cáncer de pulmón respecto a los individuos sanos, fumadores ($t=-7.45$; $p<0.001$) o no fumadores ($t=-10.31$; $p<0.001$). También el grupo de fumadores presentó valores significativamente más altos que el de no fumadores ($t=-2.95$; $p<0.05$).

Nuestro grupo ha constatado un aumento significativo de MN en individuos fumadores en relación a los no fumadores, así como otros autores^{491,108,512}, utilizando el método descrito por Fenech y Morley (1985). En otros estudios realizados con el método tradicional, también se ha obtenido el mismo resultado^{513,514} en individuos fumadores.

La ventaja del método del bloqueo de la citoquinesis con citocalasina-B frente al tradicional, se basa en el fácil y rápido reconocimiento de los MN, mayor precisión y sensibilidad de la prueba y la ausencia de inducción de los mismos por la citocalasina B⁵¹⁵. Sin embargo tiene el inconveniente de que la existencia de MN solo se expresa si las células se dividen, y los linfocitos de cada individuo responden de forma diferente al estímulo blastogénico de la PHA, e incluso existen variaciones en un mismo individuo, en dependencia de las condiciones en que se realiza el cultivo y del tiempo en que éste finaliza.

A pesar de todo, la técnica de los micronúcleos es

simple y rápida, y puede ser utilizada como *escrining* de poblaciones y para cuantificar los MN tras la exposición "in vitro" de los linfocitos a agentes genotóxicos. Se ha propuesto su análisis y se está viendo la posibilidad de utilizarlos en sustitución del estudio de aberraciones cromosómicas. Nuestro trabajo está en esta línea dado que no son buenos indicadores de AC.

La formación de MN depende en gran medida de la proliferación celular. La aparición de MN ocurre al final de la primera división mitótica, sin embargo, no todas las pérdidas de fragmentos se producen en este momento, ya que su frecuencia puede aumentar en sucesivas divisiones de las células. Esto puede traducirse en una disminución de la frecuencia de MN ya que las células micronucleadas quedan más diluidas en la población celular⁵¹⁶.

Hay autores como Yager et al. (1988) que refieren un aumento significativo de los MN al aumentar la edad⁵¹⁷. En nuestro estudio no encontramos tal relación ya que los grupos de edad eran muy homogéneos. Tampoco hubo relación con el tiempo del hábito.

El índice mitótico está representado por el cociente entre: número de células en mitosis / cantidad total de células. Este cociente se altera por el efecto de agentes genotóxicos, dado que éstos pueden alterar la cantidad de células en fase metafásica.

La valoración del IM nos permite evaluar un posible efecto de la sustancia genotóxica sobre la formación del huso, puesto que el valor del IM aparecerá disminuido.

En nuestro estudio se ha puesto siempre la misma cantidad de colchicina a cada cultivo para evitar una posible variación del IM, debida a la cantidad de colchicina presente en el medio.

Respecto al índice mitótico, en nuestro trabajo hemos

observado un aumento estadísticamente significativo en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón respecto al de individuos sanos fumadores y no fumadores, con una $p < 0.001$ en ambos casos y una $Z = -3.93$ y $Z = -3.98$ respectivamente.

Entre fumadores y no fumadores sanos no existieron diferencias significativas ($Z = -0.33$; $p > 0.05$). Estos resultados difieren de los observados por Klieschu et al. (1982), que observan una disminución del IM en células de ratas expuestas a benzopireno⁵¹⁸. Nosotros hemos observado una proporción de metafases prácticamente igual en ambos grupos, lo que nos hace pensar que el tabaco no modifica el índice mitótico.

Hemos valorado el IM como parámetro auxiliar, dado que puede influir en el proceso mitótico. Al no encontrar correlación significativa entre la frecuencia de MN y el índice mitótico, se puede concluir que el aumento de MN sea independiente de cualquier efecto sobre el aparato mitótico.

En el organismo existen sistemas de bioactivación, entre los que destaca el sistema oxidativo, que es capaz de convertir sustancias premutagénicas en derivados electrofílicos capaces de reaccionar con las macromoléculas celulares.

Por otra parte el organismo dispone de mecanismos que son capaces de neutralizar ese potencial tóxico de los compuestos electrofílicos, como el sistema de la glutatión-S-transferasa (GST), enzima que cataliza la unión de los electrofílicos y el grupo SH de la cisteína del glutatión. El compuesto resultante es eliminado por orina. La dotación genética y la inducibilidad del sistema GST, son decisivas a la hora de determinar el riesgo de contraer determinadas neoplasias en individuos fumadores. Por eso, en nuestro trabajo, hemos tenido en cuenta otro indicador, el glutatión, el cual es responsable de una amplia variedad de funciones celulares, en general protectoras.

Del equilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes protectores, dependerá la mayor o menor susceptibilidad de algunos individuos a padecer trastornos clínicos.

La determinación del **glutati3n reducido eritrocitario**, nos sirve para detectar la posible agresión sufrida por el organismo ante la exposici3n a determinadas sustancias t3xicas oxidantes.

Hemos realizado este estudio en eritrocitos debido a su f3cil acceso.

Previamente al estudio determinamos la hemoglobina de cada individuo, ya que sus variaciones pueden ser determinantes de la concentraci3n total de GSH en sangre, lo que constituiría un sesgo en nuestro estudio.

En el presente trabajo, encontramos un aumento del GSH en los grupos de fumadores sanos y enfermos, que solo fue significativo al comparar a los sanos fumadores con los sanos no fumadores ($t=-2.57$; $p<0.05$).

Nuestros resultados coinciden con los de Toth et al. (1986)⁵¹⁹ que encuentran un aumento del GSH eritrocitario en fumadores, respecto a los no fumadores, sin encontrar relaci3n entre la cantidad de tabaco consumido y dicho aumento. El mismo resultado fue obtenido en otro trabajo llevado a cabo por nuestro grupo⁵²⁰.

La causa de este aumento de GSH eritrocitario no queda clara, dada la complejidad de su metabolismo. Podría deberse a una mayor respuesta producida al aumentar la exposici3n a los agentes oxidantes contenidos en el tabaco, que pudieran inducir la s3ntesis de glutati3n-sintetasa y/o glutati3n-reductasa, y con ella el aumento de glutati3n reducido, o a una disminuci3n de su degradaci3n (glutati3n-peroxidasa), si

bien nosotros no hemos medido glutati3n oxidado y por tanto, nuestros resultados no aclaran este punto.

En los pacientes con c3ncer de pulm3n este aumento no es tan llamativo, ya sea porque existe una menor inducci3n o porque existe un mayor consumo de este factor.

Otros autores, sin embargo, no encuentran diferencias de la actividad enzim3tica o del contenido de GSH en tejido pulmonar de individuos con c3ncer de pulm3n o con otras lesiones no neopl3sicas, o entre fumadores y no fumadores. Sin embargo, cuando estos fumadores dejan de hacerlo encuentran una disminuci3n de la actividad GST al compararlos con los no fumadores. En los pacientes con c3ncer de pulm3n que hab3an fumado hasta el d3a anterior a la cirug3a, su actividad GST se hab3a reducido en un tercio, con respecto a los no fumadores. Estos valores volv3an a los niveles basales al cabo de unos 40 d3as.

El aumento de GSH obtenido refuerza observaciones previas que muestran un incremento de GSH en pulm3n, tras exposiciones a concentraciones subletales de agentes oxidantes^{521, 522, 523, 524}.

Tambi3n se ha encontrado un aumento de GSH en ratas expuestas a hiperoxia durante 48 horas⁵²⁵.

Esta elevaci3n de GSH en eritrocitos, podr3a reflejar aumentos paralelos de GSH en tejido pulmonar y otros tejidos en individuos fumadores, por lo cual podr3a ser un eficaz indicador de estr3s oxidativo.

Adem3s, las variaciones en las concentraciones de glutati3n en eritrocitos y pulm3n producidas por un agente oxidante como el tabaco, pueden servir como predicci3n de la susceptibilidad individual a alteraciones por estr3s oxidativo⁵²⁶.

Respecto al incremento de GSH en fumadores, 3ste podr3a

suponer una protección frente a la anemia hemolítica, causada por agentes oxidantes, ya que el GSH actuaría como protector de la membrana del hematíe, al menos en aquellos individuos predispuestos genéticamente a la hemólisis por ser deficitarios en G6PDH.

La GST juega un importante papel en la detoxicación de carcinógenos. Su elevación puede aumentar la capacidad del organismo para resistir al efecto carcinógeno de algunas sustancias químicas. La disponibilidad de glutatión resulta fundamental para que la enzima ejerza esas y otras funciones.

El GSH administrado a ratas, tras inducción de un hepatocarcinoma con aflatoxina B1, produce regresión del crecimiento tumoral, lo que alarga la supervivencia de los animales⁵²⁷. Este protector natural podría ser, en potencia, un agente antitumoral en humanos.

Por otra parte, tras administrar agentes depleccionadores de GSH, se produce una disminución de GSH que alcanza valores críticos, dando lugar a peroxidación lipídica y necrosis hepática con muerte celular. Esto se debe a que los agentes electrofílicos reaccionan rápidamente con los nucleófilos celulares, y en primer lugar con el GSH; al alcanzar cierto umbral, se desencadena la peroxidación lipídica de forma masiva, ocasionando muerte celular. No se conoce el mecanismo íntimo de este hecho pero podría ser debido a la pérdida de los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo, lo cual sería incompatible con la vida celular.

En cuanto al tiempo del hábito, en nuestro trabajo no hemos encontrado relación con la concentración de GSH.

La determinación de **tioéteres urinarios**, es un método que permite la detección de la exposición a sustancias electrofílicas, modulado a la vez por una serie de factores

endógenos y exógenos.

El método de extracción utilizado en nuestro trabajo, es el más recomendado, debido a que permite trabajar con muestras relativamente pequeñas y evita las variaciones interindividuales debidas a la existencia de cisteína endógena en orina, además de ser sencillo y económico. Este método arroja valores basales altos ya que valora la presencia de otros grupos SH endógenos, de la dieta y de otros xenobióticos⁵²⁸. En nuestro estudio, estos valores influyen relativamente poco ya que la dieta de estos individuos fue homogénea (mediterránea), sin estar sometido ninguno de ellos a dietas especiales, y tampoco estaban expuestos a otros xenobióticos, de forma ocupacional o ambiental, más que al tabaco, de tal forma que los valores de TU encontrados se deberán a las sustancias potencialmente mutagénicas ingresadas en el organismo del individuo, directamente a partir del tabaco o tras la activación de premutágenos presentes en el humo del tabaco por la AHH.

Para evitar las interferencias que pudieran causar las variaciones de la concentración de la orina, expresamos los TU en función de la concentración de creatinina urinaria.

En nuestro estudio encontramos un aumento significativo de los tioéteres urinarios en los individuos fumadores sanos al compararlo con el grupo de no fumadores ($Z=-4.99$; $p<0.0001$) así como con el de cáncer de pulmón ($Z=-4.14$; $p<0.0001$).

Estos estudios confirman las observaciones previas de otros autores^{529,530} y de nuestro grupo sobre el aumento de TU o sus conjugados en fumadores. También existen indicios de un aumento de los TU en fumadores, de forma paralela al aumento del consumo de tabaco^{531,532}. Además, ante un consumo constante de tabaco no se observan grandes oscilaciones en los niveles de TU en un mismo individuo.

El grupo de individuos con cáncer de pulmón mostró

menores niveles de TU que los fumadores sanos, alcanzando significación estadística. Esto puede ser debido, probablemente, al menor consumo de tabaco realizado por este grupo en los días previos a la toma de la muestra, más que a una menor capacidad de detoxicación.

Mallol et al.(1987) también encontraron valores bajos de TU en el grupo de cáncer de pulmón, al compararlo con los controles, si bien el grupo estudiado era muy pequeño.

La GST cataliza la conjugación del GSH con sustancias electrofílicas. Este sistema enzimático puede prevenir del enlace covalente de los electrofílicos a las macromoléculas celulares^{49,533}. Por tanto, es importante considerar que los TU no son sólo indicadores de contaminación interna, sino también marcadores de la capacidad detoxicadora del individuo.

Por tanto, valores bajos de TU en individuos pertenecientes a un grupo de alta exposición, pueden indicar un mayor riesgo de toxicidad o para desarrollar cáncer. De hecho, los individuos con valores bajos de GST, son más susceptibles de padecer cáncer.

Se ha demostrado que existe una variación polimórfica en la actividad glutatión transferasa de los linfocitos usando óxido trans-estilbeno como sustrato debido a influencia genética. La actividad GST-tSBO se hereda de forma autosómica dominante⁵³⁴ y se ha encontrado en los linfocitos de un 59% de la población sana fumadora y solo en un 34% de los individuos con cáncer de pulmón.

Los individuos con fenotipo deficiente frente a esta enzima constituyen un grupo de alto riesgo frente al cáncer de pulmón y, en consecuencia, la menor actividad de esta enzima puede ser considerada como un marcador de riesgo o de mayor sensibilidad para el cáncer de pulmón, sobre todo en los fumadores.

La capacidad de la GST para detoxicar agentes electrofílicos resulta de gran importancia en la carcinogénesis, ya que es capaz de inhibir la iniciación y promoción tumoral; por otra parte, puede aumentar durante el período preneoplásico, dando a estas células preneoplásicas una ventaja sobre las células vecinas sanas. Si aumenta durante la progresión maligna pueden desarrollarse líneas celulares resistentes a fármacos anticancerosos.

En un estudio realizado sobre tres líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas, en ratón nude, se ha observado que la GST π , o las isoenzimas de naturaleza inmunológica similar, no pueden ser usadas como marcadores generales de estados neoplásicos⁵³⁵.

Teniendo en cuenta la importancia de la AHH para generar mutágenos de los premutágenos contenidos en el humo del tabaco, parece ser que el balance AHH/GST puede jugar un importante papel para establecer grupos de riesgo de cáncer.

Al valorar el tiempo de exposición al tabaco, encontramos una moderada y positiva correlación en el grupo de fumadores sanos ($r=0.377$), siendo ésta muy débil en el grupo de pacientes ($r=0.167$). Esto podría deberse a que los TU tienen una eliminación relativamente rápida, que raramente excede de las 48 horas y, por tanto, una capacidad de acumulación muy limitada.

En relación al tipo de tabaco fumado no encontramos diferencias, a pesar del hecho de que el tabaco negro contiene más sustancias cancerígenas que el rubio.

Tampoco se ha encontrado asociación entre el fenotipo acetilador y los TU en fumadores, a pesar de que una N-acetiltransferasa está involucrada en el paso final que da lugar a la formación de TU⁵³⁶.

Podemos decir que, ante un consumo de tabaco similar, cuantos más TU aparezcan en la orina del individuo, mayor será la capacidad detoxicadora de ese individuo. Por el contrario, valores bajos en un individuo perteneciente a un colectivo expuesto y con niveles de TU altos, constituirán un marcador de riesgo de padecer cáncer de pulmón, ya que indicaría una capacidad de detoxicación deficiente y un mayor daño producido. De aquí se deduce que no podemos valorar un dato aislado de TU, sino que lo haremos en relación al colectivo que pertenezca.

En resumen, los TU constituyen un buen indicador de exposición interna y de riesgo colectivo, ya que nos dan una idea del grado de contaminación interna del individuo y de su capacidad de detoxicación.

La cuantificación de **mutágenos y premutágenos** en orina se llevó a cabo mediante el test de Ames, basado en la capacidad que tienen ciertas sustancias tóxicas, como el humo del tabaco, de provocar mutaciones en las bacterias.

Algunos agentes físicos y químicos del medio ambiente son capaces de impactar en el ADN y provocar su lesión, desencadenando un proceso que puede dar lugar al inicio de la carcinogénesis. El test de Ames es sencillo, eficaz y económico, por lo que ha sido ampliamente utilizado en ensayos de mutagenicidad urinaria. Este test detecta la exposición a agentes tóxicos en humanos y, por tanto, el riesgo potencial de desarrollo neoplásico.

En el presente trabajo hemos utilizado la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, que ha demostrado gran sensibilidad en orina de fumadores y condensado de humo de tabaco.

Al igual que en otros trabajos^{537, 538, 539, 540, 541}, en nuestro estudio solo encontramos un aumento significativo de mutagenicidad urinaria en presencia de activación microsomal (S9-mix) en fumadores sanos al compararlos con los no

fumadores ($Z=5.59$; $p<0.0001$). También encontramos este aumento al compararlos con los individuos con cáncer de pulmón con activación mutagénica ($Z=5.07$; $p<0.0001$) y sin activación ($Z=-2.70$; $p<0.01$). Mallo1 et al.(1987), también encuentran un claro predominio de valores bajos y nulos de mutágenos en enfermos con cáncer de pulmón.

Parece ser que la orina de fumadores apenas presenta productos mutágenos, pero al añadir la fracción microsomal se pone de manifiesto la presencia de premutágenos que se convierten en mutágenos. Una posible explicación sería que, dada la alta reactividad de los electrofílicos y mutágenos con las macromoléculas celulares, los mutágenos que incidan en el epitelio pulmonar procedentes del tabaco, tenderán a fijarse en ellas, y las moléculas que puedan ser detoxicadas "in situ" por la GST serán eliminadas sin causar daño celular. En cambio, los premutágenos urinarios sí serán buenos indicadores del grado de exposición al tabaco, e indirectamente del grado de actividad de la AHH.

Así, a igualdad de exposición, una actividad AHH elevada puede convertir gran parte de los premutágenos del tabaco en mutágenos, que tienden a fijarse en los tejidos pulmonares y, por tanto, pueden encontrar cifras de premutágenos bajas. En cambio, si la actividad de la AHH es pequeña, es posible que haya muchos premutágenos en la orina, como índice de la intensidad del tabaquismo. Según esto, en los individuos de alto riesgo expuestos a un tabaquismo intenso, se pueden encontrar menos premutágenos que en los individuos de bajo riesgo.

Los valores más bajos de mutágenos y premutágenos encontrados en los individuos con cáncer de pulmón puede ser debida a la disminución del consumo de cigarrillos de este grupo en los días previos a la toma de la muestra, ya que se ha demostrado que al dejar de fumar o disminuir el consumo, se produce una rápida disminución de la mutagenicidad urinaria, mientras que la excreción de TU responde más

lentamente a estos cambios⁵⁴².

Podemos considerar que el test de mutagenicidad y el de TU son complementarios, ya que los valores de estos últimos dependen principalmente de una detoxicación efectiva mediante conjugación de los metabolitos reactivos con los grupos SH, y que ambos son buenos indicadores biológicos de exposición a mutágenos/carcinógenos.

Algunos autores han observado que la orina de fumadores de tabaco negro contiene más mutágenos que la de los fumadores de tabaco rubio^{543,496}. También se ha demostrado que el condensado de tabaco negro contiene más arilaminas que el del rubio⁵⁴⁴. Aunque en nuestro trabajo no se encontraron diferencias a este respecto en el grupo control, si que fueron constatadas en otro trabajo de nuestro grupo.

En nuestro trabajo, nos llamó la atención la ausencia de relación entre el tipo de tabaco fumado y la cantidad de premutágenos, tanto en el grupo de fumadores sanos como en los pacientes con cáncer de pulmón. Esto podría explicarse porque algunas aminas aromáticas inducen oxidasas hepáticas, por tanto alteran su bioactivación a mutágenos^{544,545}. Por otra parte, la fracción S9-mix puede dar lugar a una inhibición de la actividad mutagénica de algunas arilaminas, porque la posibilidad de metabolismo puede ser dirigida hacia la formación de productos no mutagénicos.

Tampoco encontramos relación del fenotipo acetilador con la mutagenicidad urinaria, lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores⁵⁴⁶.

Además, cada vez existe más certeza de que los individuos con una capacidad oxidativa elevada (hidroxiladores rápidos de debrisoquina) tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo respecto a los mutágenos urinarios lo confirmarían, ya que se eliminan en menor proporción, lo que

indica una mayor actividad del sistema AHH.

Así pues, valores de mutágenos bajos y TU bajos serían compatibles con un grupo de alto riesgo. En cambio, ante una misma exposición, valores de premutágenos elevados y TU elevados no nos asegurarían la ausencia de riesgo.

Para el estudio del **fenotipo acetilador** hemos utilizado isoniazida como sustancia test para clasificar a los individuos en acetiladores rápidos y lentos, dado que su principal vía de metabolización es la acetilación.

En el presente trabajo, hemos encontrado 56 individuos con FAL (56% del total) y 44 individuos con FAR (44%), valores que se encuentran dentro de los límites comunicados por otros autores para la población española y europea en general⁵⁴⁷, con un ligero predominio de acetiladores lentos.

Con el estudio de los polimorfismos genéticos, hemos pretendido establecer la posible relación entre los indicadores biológicos de exposición interna a mutágenos/carcinógenos y el estatus acetilador e hidroxilador, tanto en los pacientes con cáncer de pulmón como en los sanos.

No hemos encontrado ningún trabajo que haga referencia a la posible influencia del fenotipo acetilador sobre los distintos parámetros citogenéticos estudiados. Nuestros resultados no presentan diferencias significativas, salvo en el IM, que fue significativamente más alto en los individuos acetiladores lentos del grupo de pacientes, quienes mostraron, independientemente de los fenotipos, índices más elevados que los individuos sanos.

En nuestro estudio hemos encontrado un aumento significativo de los niveles de GSH en los individuos acetiladores lentos del grupo de no fumadores ($F=5.35$; $p<0.05$), posiblemente por a una menor utilización del glutatión debido a una menor tasa de acetilación.

Pudiera pensarse que esta menor capacidad acetiladora determinara un mayor estrés oxidativo sobre los eritrocitos, induciendo una mayor síntesis de GSH. Sin embargo, el hecho de que esta relación se invierta en los fumadores descarta esta hipótesis, permitiendo afirmar que al no ser significativas las diferencias en el caso de los fumadores, el fenotipo acetilador no presenta influencia apreciable sobre la concentración de glutatión eritrocitario.

En la formación de tioéteres, tiene lugar una acetilación, lo que puede inducir a pensar que al poseer los acetiladores lentos una menor actividad NAT, pudieran presentar menores concentraciones de TU. Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas entre acetiladores lentos y rápidos en ninguno de los grupos, por lo que cabe pensar que se trate de un isoenzima distinto al que sufre polimorfismo. Tampoco encontramos diferencias achacables al fenotipo acetilador en relación a los mutágenos y premutágenos urinarios.

La distribución polimórfica de la actividad NAT, parece ser la responsable del mayor riesgo de cáncer de vejiga en fumadores que son acetiladores lentos^{543, 548, 549}, así como para la mayor formación de aductos de hemoglobina-4-aminobifenil en los mismos individuos⁵⁵⁰.

Se ha encontrado asociación entre acetiladores lentos y cáncer de vejiga en individuos expuestos ocupacionalmente a aminas aromáticas (aunque no se ha detectado tal asociación en ausencia de exposición), cáncer gástrico, enfermedad de Gilbert, y otras enfermedades (ya mencionado con anterioridad). Esto se debe a que las aminas aromáticas causantes del cáncer, sufren acetilación polimórfica en el hígado. Por el contrario, el estatus acetilador rápido se ha encontrado en mayor proporción en el cáncer colorrectal y el de mama. Para entender estos hechos puramente estadísticos será necesario determinar cuál es el substrato natural para

esta enzima polimórfica.

Por el contrario son varios los trabajos que no encuentran evidencia de la asociación del cáncer de pulmón y el fenotipo acetilador^{347,348,407}.

En nuestro trabajo no hemos detectado diferencias significativas en la distribución del polimorfismo acetilador entre los pacientes con cáncer de pulmón y los individuos sanos. Estos valores se mantienen incluso en los subtipos histológicos estrechamente ligados al consumo de tabaco (microcítico y epidermoide). Estos resultados coinciden con Ladero et al.(1991), quienes sugieren que el polimorfismo acetilador no es un factor genético que guarde relación con el riesgo de padecer carcinoma pulmonar⁵⁵¹.

La distribución del **fenotipo oxidativo** de debrisoquina no presentó diferencias entre el grupo de pacientes afectos de cáncer de pulmón y los individuos sanos. Del total de individuos estudiados, solo 4 fueron hidroxiladores lentos, lo que representa un 5% del total. Estos resultados coinciden con los encontrados por Benítez et al. (1986) en la población española (5.4% de hidroxiladores lentos)⁵⁵². Estos autores encuentran en un trabajo posterior un porcentaje ligeramente superior de hidroxiladores lentos al aumentar la muestra (6.6%).

Se han aplicado gran variedad de técnicas matemáticas en el problema de la separación de las distribuciones de frecuencias de distribuciones solapadas generadas por la distribución de frecuencias de los indicadores metabólicos de una población. Esto permite mejorar la designación de la antimoda y reducir aunque no eliminar el error en la asignación del fenotipo^{553,554,555}.

El cálculo de la antimoda para el índice metabólico de debrisoquina se estimó en 4.48 para una población española, valor distinto al propuesto por Evans et al. (1980) de 12.6.

Esta desigualdad puede reflejar diferencias ambientales o constitucionales entre las poblaciones estudiadas, ser un artefacto de la relativamente pequeña muestra estudiada (n=127), o ser el resultado de las distintas formas en que fue determinada la antimoda.

Nosotros optamos por la utilización de la antimoda propuesta por Evans, ya que nuestra muestra tampoco resultaba suficientemente grande (n=80) y, por otra parte, el porcentaje de metabolizadores lentos tampoco resultaba muy diferente al utilizar el método tradicional.

Algunos autores constatan un mayor número de hidroxiladores rápidos en individuos con cáncer de pulmón que en controles^{359,556}, aunque en otros estudios no llega a alcanzar significación estadística^{407,411,557}. En el presente trabajo, a pesar de encontrar mayor proporción de hidroxiladores rápidos en los individuos con cáncer de pulmón, las diferencias no fueron significativas.

Horsmans et al.(1991) al no encontrar diferencias significativas entre los individuos con cáncer de pulmón y controles, refiere una ausencia de relación entre el cáncer de pulmón y el fenotipo hidroxilador, sugiriendo la necesidad de estudios prospectivos genotipando un gran número de individuos para aclarar este punto⁵⁵⁸.

Por otra parte, Speirs et al.(1990) concluyen que el fenotipo metabólico de debrisoquina no es un buen predictor de cáncer de pulmón en la población general⁵⁵⁹. Esto pudiera deberse a que el estudio carece de grupo control y presenta diferencias metodológicas con trabajos previos.

Referente a la influencia conjunta de ambos determinismos genéticos, solo encontramos un aumento significativo del IM en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón que eran acetiladores lentos e hidroxiladores rápidos y una menor frecuencia de MN en el grupo de fumadores sanos

acetiladores lentos e hidroxiladores rápidos, al compararlos ambos con los individuos acetiladores e hidroxiladores rápidos.

La hidroxilación está relacionada con la bioactivación de arilaminas hacia metabolitos mutágenos. La bioactivación de las aminas aromáticas contenidas en el tabaco mediante la N-hidroxilación compite con la vía de detoxicación catalizada por la N-acetiltransferasa.

Por este motivo, los individuos con FAL + FHR serían los que tienen una mayor capacidad oxidativa y una menor capacidad de eliminación de algunos compuestos oxidantes que siguen en su degradación la vía de la acetilación, lo que, al menos en teoría, iría emparejado con un mayor riesgo carcinogénico, especialmente en personas expuestas a agentes tóxicos.

En nuestro trabajo hemos encontrado un predominio de FAL+FHR en todos los tipos histológicos, con una $p > 0.05$ en todos los casos, siendo más marcado en los tipos epidermoide y microcítico, lo que hace que estos grupos posean, potencialmente, un riesgo más elevado.

También se ha encontrado que esta combinación de FAL+FHR se asocia con la formación de mayores niveles de aductos de hemoglobina-ABP.

En lo que a ambos polimorfismos enzimáticos se refiere, no hemos encontrado correlación alguna, como era de esperar, ya que ambos metabolismos son independientes. Este hallazgo concuerda con el expresado previamente por Harmer et al. (1986)⁵⁶⁰.

En nuestro estudio, el tipo histológico más frecuentemente observado fue el carcinoma epidermoide (50%), seguido del microcítico (25%), el adenocarcinoma (20%) y el indiferenciado (5%). Estos valores coinciden con los observados por otros autores⁵⁶¹, que además encontraron una

frecuencia dos veces superior de historia familiar de cáncer de pulmón en pacientes con la variedad microcítica.

Al igual que otros autores, los tipos histológicos epidermoide y microcítico fueron las variedades más frecuentes observadas en nuestro estudio y las más frecuentes en fumadores⁵⁶².

El tabaco rubio y el negro tienen diferente potencial carcinogénico. En estudios caso-control en poblaciones expuestas principalmente a tabaco negro, se observó un mayor riesgo relativo, comparado con el observado en poblaciones expuestas predominantemente a tabaco rubio⁵⁶³, para padecer cáncer de pulmón^{564,565}, laringe⁵⁶⁶ y vejiga.

En nuestro trabajo hemos encontrado un predominio de fumadores de tabaco negro en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón, que alcanzó significación estadística en los subgrupos microcítico y epidermoide, lo que confirmaría el mayor riesgo de los mismos.

La posesión de un fenotipo hidroxilador rápido no proporciona necesariamente predisposición a padecer cáncer de pulmón, son necesarios otros factores adicionales, por ejemplo el tabaquismo, que también pueden favorecer su aparición, actuando dicho fenotipo como un factor más de riesgo.

La oxidación rápida de debrisoquina es un factor de riesgo genéticamente determinado para el desarrollo de cáncer broncogénico, aunque no conozcamos por el momento ningún carcinógeno de los presentes en el humo del tabaco que siga esta vía metabólica para su oxidación y presunta activación. De esta forma, no existiría ninguna base bioquímica teórica para la asociación del fenotipo hidroxilador rápido y el cáncer del pulmón.

Sin embargo, siempre hay que tener en cuenta que la

posibilidad de que la asociación entre el fenotipo oxidativo rápido de debrisoquina y determinadas neoplasias pueda no ser causal, sino vinculada a otros factores que sí están vinculados causalmente en la carcinogénesis pulmonar. Podría existir así una asociación con genes reguladores o estructurales del citocromo P-450, o pudiera ligarse a genes (no relacionados con la carcinogénesis química), como oncogenes celulares, que sí posean un papel causal en la génesis del tumor.

A veces puede ser difícil establecer si el fenotipo oxidativo es una causa o un efecto del tumor, ya que éste podría aumentar la capacidad oxidativa y favorecer el cambio hacia un fenotipo rápido. Este fenómeno puede tener lugar en el subtipo histológico microcítico. La producción de polipéptidos con actividad endocrina por este tumor interfiere en la regulación del citocromo P450, al menos en algunas especies de ratas⁵⁶⁷.

Al investigar la asociación entre la AHH y la Debrisoquina-hidroxilasa con el cáncer de pulmón, se han encontrado resultados contradictorios, a favor y en contra de dicha relación. Su conocimiento sería decisivo para comprender los mecanismos de la carcinogénesis.

Jara (1990)⁵⁶⁸, ha argumentado en contra de la hipótesis de carcinogénesis a través de la oxidación que:

- No se conoce un carcinógeno pulmonar que siga la vía metabólica de la enzima P450 db1.
- Los carcinógenos identificados hasta la fecha siguen otras vías metabólicas.
- No todas las isoenzimas tienen polimorfismo genético ni es igual su grado de inducibilidad.
- Es muy probable que la búsqueda de una relación carcinógeno-tumor pueda resultar excesivamente simplista, porque existe frecuentemente un solapamiento de sustratos y de enzimas, de forma que un solo carcinógeno puede ser

metabolizado por diversas enzimas (y viceversa). Esto hace complicada y dificultosa la simple identificación de una vía única de carcinogénesis en un tumor concreto.

Por otro lado, una gran parte de la población fumadora tiene FHR para debrisoquina, y solo unos pocos individuos fumadores llegan a presentar carcinoma bronquial. Es decir, el fenotipo oxidativo de debrisoquina puede ser un factor de riesgo más dentro del conjunto de factores que potencialmente intervienen en la génesis de esta neoplasia y no un factor causal de primera magnitud. Es cierto que cuantos más factores conozcamos, mayores serán las posibilidades de predecir el desarrollo de un tumor, aunque la trascendencia de cada uno de ellos por separado sea pequeña.

La valoración global del riesgo al que se ve sometido un individuo por estar expuesto al tabaco se podrá realizar de forma más adecuada si estudiamos conjuntamente los factores genéticos y ambientales que concurren en su génesis, ya que una predisposición genéticamente determinada no es suficiente para desarrollar una neoplasia, si no va acompañada de una exposición ambiental al agente causal.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas, como manifestación citológica del daño al ADN, es más elevada en los pacientes de cáncer de pulmón que en los individuos sanos, independientemente del hábito tabáquico. La mayor frecuencia de intercambios entre cromátides hermanas no depende de una menor proliferación celular.

2. Las aberraciones cromosómicas, que evalúan los efectos precoces de la exposición a agentes genotóxicos, son más elevadas en los pacientes de cáncer de pulmón que en los individuos sanos fumadores y no fumadores. El aumento se produce a expensas de las roturas de tipo cromosómico.

3. Los micronúcleos, que reflejan genotoxicidad, son más frecuentes en los pacientes de cáncer de pulmón que en los individuos sanos, independientemente de que estos últimos fumen o no. También los fumadores sanos presentan mayor frecuencia de micronúcleos que los no fumadores sanos. El incremento de micronúcleos obedece a un efecto clastógeno en tanto que no se ve influenciado por las alteraciones del proceso mitótico, evaluadas por el índice mitótico.

4. Los individuos fumadores presentan una mayor concentración de glutatión reducido eritrocitario que los no fumadores y los pacientes de cáncer de pulmón.

5. La dosis interna de electrofílicos evaluada por la concentración de tioéteres urinarios fue superior en los individuos fumadores sanos que en los pacientes de cáncer de pulmón y los sujetos no fumadores.

6. La excreción urinaria de premutágenos es más elevada

en los individuos fumadores sanos que en los pacientes de cáncer de pulmón y los individuos no fumadores.

7. El índice mutagénico no es indicador válido de la exposición al tabaco ni de la exposición interna a mutágenos en pacientes de cáncer pulmonar.

8. El tipo de tabaco fumado, rubio o negro, no influye significativamente en los parámetros estudiados.

9. Existe predominio de fumadores de tabaco negro entre los pacientes, fundamentalmente en los subgrupos histológicos microcítico y epidermoide.

10. El fenotipo acetilador no influye en los indicadores biológicos estudiados, ya sean citogenéticos o de exposición. Tampoco ha mostrado relación con el cáncer de pulmón.

11. El estatus hidroxilador de debrisoquina, no imprime diferencias en los diferentes biomarcadores estudiados. La posesión de un fenotipo hidroxilador rápido no ha mostrado relación con el carcinoma broncopulmonar.

12. Los individuos con fenotipo acetilador lento e hidroxilador rápido, no presentan indicios de mayor exposición a mutágenos/carcinógenos que aquellos con fenotipo acetilador rápido e hidroxilador rápido.

13. En los pacientes con cáncer broncopulmonar, la asociación de fenotipo acetilador lento e hidroxilador rápido es más frecuente que en los que no padecen la enfermedad.

6. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. LA VECCHIA C, LEVI F et GUTZWILER F: Fumée et santé: une épidémie évitable. *Med.Hyg.*, 1987; 45: 3453-3462.
2. Manual de prevencio i control del tabaquisme. *Secretaria Tècnica del Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya*. Barcelona, 1982.
3. SALLERAS L: Estrategias actuales de la lucha antitabáquica. *Rev.San.Hig.Publ.*, 1985; 60: 863-906.
4. BENHAMOU E, BENHAMOU S, AUQUIER A and FLAMANT R: Changes in patterns of cigarette smoking and lung cancer risk: results of a case-control study. *Br.J.Cancer*, 1989; 60: 601-604.
5. Editorial: Tabaco y profesionales sanitarios. *Revista informativa del Ilustre Colegio Oficial de Médicos de La Rioja*. 1988; 9: 3-4.
6. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. SECRETARÍA GENERAL PARA EL CONSUMO Y LA SALUD PÚBLICA: Plan de Salud, Objetivos Estratégicos de Salud Pública (Borrador). Diciembre, 1991.
7. SARAZZI R and RIBOLI E: Passive smoking and lung cancer: current evidence and ongoing studies at the International Agency for Research on Cancer. *Mutat.Res.*, 1988; 222: 117-127.
8. WALD NJ, NANCHAHAN K, THOMPSON SG and CUCKLE HW: Does breathing other people's tobacco smoke cause lung cancer? *Br.Med.J.*, 1986; 293: 1217-1222.
9. BURCHFIEL CM, HIGGINS MW, KELLER JB, HOWATT WF, BUTLER WJ and HIGGINS ITT: Passive smoking in childhood. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1986; 133: 966-973.
10. HIGGINS IT and WINDER EL: Reduction risk of lung cancer among ex-smokers with particular reference to histologic type. *Cancer*, 1988; 62: 2397-2401.

-
11. FIELDING JE: Smoking health effects and control. *N.Engl.Med.*, 1985; 491-498.
 12. PÉREZ GERADA: Informe: el tabaco, drogodependencia física, psicológica y social. *Profesión médica*. Abril 1987: 26-27.
 13. DEL VILLAR JA: Interacciones del tabaco con los medicamentos. *Medicine*, 1987; 40: 197-203.
 14. DOLL R and HILL AB: Smoking and carcinoma of the lung. *Br.Med.J.*, 1950; 2: 739-748.
 15. ESTAPE JL, AGUSTI A, FONT A et al: Tabaco y Cáncer. *Med. Clin.*, 1987; 89: 30-37.
 16. SCHOENBERG JB, WILCOX HB, MASON TJ et al: Variation in smoking-related lung cancer risk among New Jersey women. *Am. J.Epidemiol.*, 1989; 130: 688-695.
 17. BOLUMAR F, VIOQUE J and CAYUELA A: Changing mortality patterns for major cancers in Spain, 1951-1985. *Int.J.Epidemiol.*, 1991; 20(1): 20-25.
 18. PARDELL H y CASTILLO A: Tabaquismo: Consecuencias y tratamiento. *Información terapéutica de la Seguridad Social*, 1987; 11(8): 141-145.
 19. PARDELL H: El tabaquismo: epidemia de nuestro tiempo. *Med. Clin.*, 1985; 85: 539-541.
 20. SHOPLAND DR, EYRE HJ and PECHACEK TF: Smoking-attributable cancer mortality in 1991: Is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the United States? *J.Natl.Cancer Inst.*, 1991; 83: 1142-1148.
 21. Comité de Expertos de la OMS en Lucha Antitabáquica: Consecuencias del tabaco para la salud, serie de informes técnicos nº 568, OMS, Genève 1974.

-
22. PELAEZ C, PINEDO A, GARCÍA A y FERNÁNDEZ-CREHUET J: Tabaco y cáncer pulmonar. Estudio caso-control. *Rev.Clin.Esp.*, 1989; 185: 298-302.
23. PETO R and DOLL R: Keynote address: The control of lung cancer. In: Mizcle M, Correa P (eds.). *Lung cancer: causes and prevention*. Verlag Chemie International, 1984; 1-19.
24. IARC. Tobacco smoking; IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. *IARC*. Lyon, 1986; vol.38.
25. DOLL R and PETO R: The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1981; 6: 1191-1308.
26. Royal College of Physicians: Smoking and Health now. *Pitman*, London, 1971.
27. WYNDER EL and STELLMAN SD: The impact of long-term filter cigarette usage on lung and larynx cancer: A case control study. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1979; 62: 471-477.
28. HAMOND EC, GRAFINKEL L and SEIDMAN H: Some recent findings concerning cigarette smoking. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA (eds.). *Origins of Human Cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1977; Vol. A., 101-112.
- 29²⁹. MARTÍNEZ LLAMAS A: Tabaco. Composición. In: *Patología del consumo del tabaco*. Ed. Glosa. Barcelona, 1989; cap.IV: 49-75.
30. AKEHURST BC: El tabaco. In: *Agricultura tropical*. Ed. Labor. Barcelona, 1973; 604-607.
31. ASHTON H et al: Smoking: Psychology and pharmacology. *Tavistock Pubbl.* London, 1982.
32. ZARAGOZA JR y LLANOS M: *Tabaco y salud*. Editorial AC, Madrid, 1980.

-
33. ROSENBERG J et al: Disposition kinetics and effects of intravenous nicotine. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1980; 28: 517-522.
34. BENOWITZ NL, JACOB P, JONES RJ and ROSENBERG J: Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1982; 221: 368-372.
35. TAYLOR P: Agentes estimulantes y de bloqueo de los ganglios. In: Goodman A, Goodman LS, Rall TW and Murad F (eds.). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. Panamericana (7ª Ed.), Madrid, 1986; 218-224.
36. NEAL L, BENOWITZ, NL, REESE T, JONES RT and JACOB P: Additive cardiovascular effects of nicotine and ethanol. *Clin.Pharmacol. Ther.*, 1986; 40: 420-424.
37. HALEY NJ, SEPKOVIC PD, HOFMAN PHD and WYNDER MD: Cigarette smoking as a risk for cardiovascular disease Part VI. Compensation with nicotine availability as a single variable. *Clin. Pharmacol.Ther.*, 1985; 38: 164-170.
38. HARTIOLA JJ, MAPP CK, MITCHELL A and GOLD WM: Nicotine-induced respiratory effects of cigarette smoke in dogs. *Am. Physiol.Soc.*, 1985: 64-71.
39. GENERALITAT DE CATALUNYA: El tabaquisme a Catalunya. *Departament de Sanitat y Seguretat Social*, 1983.
40. BAZELL RS, STIFF AC and HENDERSON GM: Plasma nicotine and cotinine in tobacco smoke exposed beagle dog. *Toxicol.Appl. Pharmacol.*, 1984; 73(1): 152-158.
41. EDIS: El consumo de drogas en Aragón. Epidemiología, motivaciones y factores de riesgo. Colección Aragón de bienestar social, 2. Zaragoza. *Departamento de Sanidad, Bienestar Social y Trabajo. Diputación General de Aragón*, 1986; 52-64.
42. ERNSTER VL: Trends in smoking, cancer risk and cigarette promotion. Current priorities for reducing tobacco

exposure. *Cancer*, 1988; 62: 1702-1712.

43. American Cancer Society: 1987 Cancer facts and figures. *American Cancer Society*. New York, 1987.

44. BAST RC: AHH guinea pig peritoneal macrophages. Benzoanthracene induced increase of enzyme activity in vivo and in cell culture. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1979; 51: 675-678.

45. McLEMORE T and RUSSELL M: Pulmonary carcinogenesis. Aryl- hydrocarbon hydroxylase. In: *Cancer Treatment and Research. Lung Cancer*. Livingston Ed., 1981; cap.I.

46. NAKACHI K, IMAI K, HAYASHI S, WATANABE J and KAWAJIRI K: Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.*, 1991; 51: 5177-5180.

47. MARTÍNEZ LLAMAS A: Carcinogénesis y tabaco. In: *Patología del consumo del tabaco*. 1988; 11: 81-88.

48. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating. *IARC Monographs* volumes 1 to 42. Supplement 7. Lyon: 1987.

49. VAN DOORN R, LEIJDEKKERS CM, BOS RP, BROUNS RME and HENDERSON PT: Detection of human exposure to electrophilic compounds by assay of thioether detoxication products in urine. *Ann.Occup. Hyg.*, 1981; 24(1): 77-92.

50. KAUFMAN DW, HELMRICH ASP and ROSENBERG J: Nicotine and carbon monoxide content of cigarette smoke and the risk of myocardial infarction in young men. *Br.J.Med.*, 1983; 287: 324-326.

51. DAWSON GW and VESTAL RE: Smoking and drug metabolism. *Pharmacol.Ther.*, 1982; 15: 207-211.

52. FRIEDMAN FK, WEST D, SUGIMURA T et al: Flavone

modulators of rat hepatic arylhydrocarbon hydroxylase. *Pharmacology*, 1985; 31: 203-207.

53. ROBINSON RC, CHENG KCH, PARK SS et al: Structural comparison of monoclonal antibody immunopurified pulmonary and hepatic cytochrome P-450 from 3-methylcholantrene-treated rats. *Biochem. Pharmacol.*, 1986; 35: 3827-3830.

54. JERINA DM and JERINA JW: Arene oxides: a new perspective of drug metabolism. *Science*, 1978; 185: 573-582.

55. SUGIMURA M, YAMAZAE Y, KAMATAKI T and KATO R: Reduction of epoxy derivatives of benzo(a) pyrene by microsomal cytochrome P-450. *Cancer Res.*, 1980; 40: 2910-2914.

56. MORGENSTERN R, DEPIERRE JW, LIND C, GUTHENBERG C, MANNERVICK B and ERNTER L: Benzo(a)pyrene quinones can be generated by lipid peroxidation and are conjugated with glutathione S-transferase B from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981; 99: 682-690.

57. US INTERAGENCY GROUP STAFF ON CARCINOGENS: Chemical carcinogens: A review of the science and its associated principles. *Environ. Health Perspectives*, 1986; 67: 201-282.

58. CASTONGUAY A, FOILES PG, TRSHIN N and HECHTS S: Study of ADN methylation by tobacco specific N-nitrosamines. *Environ. Health*, 1985; 62: 197-202.

59. PEGG AE: Alkylation and subsequent repair of DNA after exposure to dimethylnitrosamine and related carcinogens. *Rev. Biochem. Toxicol.*, 1983; 5: 83-133.

60. SINGER B and GRUNBERGER D: Molecular biology of mutagens and carcinogens. *Plenum Publishing Corp.*, New York, 1983; 45-96.

61. SINGER B and GRUNBERGER D: Molecular biology of mutagens and carcinogens. *Plenum Publishing Corp.*, New York, 1983; 221-253.

-
62. STOLLAR BD: The antigenic potential and specificity of nucleic acids, nucleoproteins and their derivatives. *Arthritis Rheum.*, 1981; 24: 1010-1018.
63. EVANS DAP, EZE LA and WHITEY EJ: The association of the slow acetylator phenotype with bladder cancer. *J.Med.Genet.*, 1983; 20: 330-333.
64. WEBER WW and HEIN DW: N-acetylation pharmacogenetics. *Pharm.Rev.*, 1985; 37: 25-79.
65. HINSON SA, FREEMAN JP, POTTER DW et al: Mechanism of microsomal metabolism of benzene to phenol. *Mol.Pharmacol.*, 1985; 27(5): 574-577.
66. BREWER GJ: Human ecology and expanding role for the human geneticist. *Am.J.Hum.Genet.*, 1971; 23: 92.
67. LEVINE EG, KING RA and BLOOMFIELD C: The role of heredity in cancer. *J.Clin.Oncol.*, 1989; 7: 527-540.
68. COHEN BH: Is pulmonary disfunction the common denominator for the multiple effects of cigarette smoking? *Lancet*, 1978; 2: 1024-1026.
69. SAMET JM, HUMBLE CG and PATHAK DR: Personal and family history of respiratory disease and lung cancer risk. *Am.Rev. Respir.Dis.*, 1986; 134: 466-470.
70. LIJINSKY W: The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutat.Res.*, 1991; 259: 251-261.
71. ZIEGLER RG: A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J.Nutr.*, 1989; 119: 116-122.
72. GUPTA MP, KHANDUJA KL, KOUL IB and SHARMA RR: Effect of cigarette smoke inhalation of benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in vitamine A deficiency in the rat. *Cancer Lett.*, 1990; 55: 83-88.

-
73. WEISBURGER JH: Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants and carotenoids. *Am.J.Clin. Nutr.*, 1991; 53: 226S-237S.
74. TAIOLI E, NICOLOSI A and WYNDER EL: Possible role of diet as a host factor in the aetiology of tobacco-induced lung cancer: an ecological study in Southern and Northern Italy. *Int.J. Epidemiol.*, 1991; 20(3): 611-614.
75. ROE FJC, PATH FRC: Occupational cancer. Where now and where next. *Scand.J.Work Environ.Health* , 1985; 11: 181-187.
76. HEIM S, JOHANSSON B and MERTENS F: Constitutional chromosome instability and cancer risk. *Mutat. Res.*, 1989; 221: 39-51.
77. MILLER JA. Carcinogenesis by chemicals: an overview. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 1970; 30: 861-865.
78. SHANK RC: Toxicity-induced aberrant methylation of DNA and its repair. *Pharmacol.Rev.*, 1984; 36: 19-24.
79. SCHAAPER RM, GLICKMAN BW and LOEB LA: Role of depurination in mutagenesis by chemical carcinogens. *Cancer Res.*, 1982; 42: 3480-3485.
80. MARGISON GP: Effect of pretreatment of rats with n-methyl-nitrosourea on the repair of 6-methylguanine in liver DNA. *Carcinogenesis*, 1981; 2: 431-434.
81. BLANCO M, HERRERA G, ALEIXANDRE V y URLLOS A: Mutagénesis inducida por lesiones en el DNA. *Rev.Toxicol.*, 1988; 5: 15-18.
82. SINUÉS B, BERNAL ML, SÁENZ MA, LANUZA J and BARTOLOMÉ M: Biological Indicators of environmental cancer risk. In: *Recent developments in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology*. Irving Sunshine Ed., Marcel Decker

Inc., Palo Alto, California, 1992; part VII(101): 703-711.

83. VAINIO H: Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens. *Scand.J.Work Environ.Health*, 1985; 11: 1-6.

84. CARRANO AV and NATARAJAN AT: Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ICPEMC (International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens) Publ.n°14. *Mutat.Res.*, 1988; 204: 379-406.

85. SORSA M: Monitoring of sister chromatid exchanges and micronuclei as biological endpoints. In: A.Berlin, M.Draper, K.Hemminki, H.Vainio,(eds). *Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents*. I.A.R.C. Scientific Publications. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1984; 59: 339-349.

86. THE INTERNATIONAL SYSTEM OF CYTOGENETIC NOMENCLATURE (ISCN). Harnden and Klingler eds. Published in collaboration with *Cytogenet.Cell.Genet.*, Karger Basel, 1985; pp 66-73.

87. BUCKTON KE, HAMILTON GE, PATON L and LANGLANDS AO: Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients. In: HJ Evans and DC Lloyd (eds.). *Mutagen-induced chromosome damage in man*. Edinburgh University Press, Edinburgh 1978. Pag.142-150.

88. CARRANO AV: Chromosome aberrations and radiation-induced cell death. II. Predicted and observed cell survival. *Mutat.Res.*, 1973; 17: 355-366.

89. ZAKHAROV AF and EGOLINA NA: Differential spirilization along mammalian mitotic chromosomes. I BudR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 1972; 70; 3395-3399.

90. CARRANO AV and MOORE DH: The rationale and methodologic for quantifying system chromatid exchange in humans. In: *Mutagenicity, new horizons in genetic toxicology*. Heddle JA, Academy Press, New York, 1982; pp 267-304

-
- ⁹¹. YAKOVENKO A: Spontaneous level of SCE and their distribution in human cells. *Genetika*, 1979; 15: 1115-1123.
- ⁹². DUTRILLAUX B et al.: Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. *Chromosome*, 1974; 57: 219-225.
- ⁹³. KATO H: Spontaneous SCE detected by a BrdU labelling method. *Nature*, (London), 1974; 251: 70-72.
- ⁹⁴. IKUSHIMA T and WOLFF S: Sister chromatid exchange induced by light flashes to 5-BrdU and 5-IdV substituted chinese hamster chromosomes. *Exp.Cell.Res.*, 1974; 87: 15-19.
- ⁹⁵. CARRANO AV and THOMPSON LH: Sister chromatid exchange and gene mutation. *Cytogenet.Cell Genet.*, 1982; 33: 57-61.
- ⁹⁶. WOLFF S and PERRY P: Insights on chromosome structure from sister chromatid exchanges and the lack of both isolabelling and heterolabelling as determined by the FPG technique. *Exp.Cell Res.*, 1975; 93: 23-30.
- ⁹⁷. SHAFER DA: Alternate replication bypass mechanisms for sister chromatid exchanges formation. *Prog.Topics Cytogenet.*, 1982; 2: 67-98.
- ⁹⁸. PERRY P and EVANS HJ: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchanges. *Nature (London)*, 1975; 258: 121-125.
- ⁹⁹. LAMBERT B, LINDBLAD A, HOLMBERG I and FRANCESCONI D: The use of sister chromatid exchange to monitor human population for exposure to toxicologically harmful agents. In: *Sister Chromatid Exchange*. Wiley, New York, 1982. Pag.149-182.
- ¹⁰⁰. LAMBERT B, HANSSON K, LINDSTEN J, STEN M and WERELIUS B: Bromodeoxyuridine induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hereditas*, 1976; 83: 163-174.

-
- ¹⁰¹. TICE R, SCHNEIDER EL and RARY JM: The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Exp.Cell.Res.*, 1976; 102: 232-236.
- ¹⁰². MORIMOTO K: Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene. *Cancer Res.*, 1983; 43: 1330-1344.
- ¹⁰³. PRESTON RJ, SAN SEBASTIAN JR and McFEE AF: The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat.Res.*, 1987; 189: 175-183.
- ¹⁰⁴. ALMASSY Z, KREPINSKY A, BIANCO C and KÖTELES GJ: The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl.Radiat.Isot.*, 1987; 38(4): 241-49.
- ¹⁰⁵. SINUÉS B, SANZ A, BERNAL ML, TRES A, LANUZA J, CEBALLOS C and SÁENZ MA. Sister chromatid exchanges, proliferating rate index and micronuclei in biomonitoring of internal exposure to vinyl chloride monomer in plastic industry workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991; 108: 37-45.
- ¹⁰⁶. FENECH M and MORLEY AA: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat.Res.*, 1985; 147: 29-36.
- ¹⁰⁷. VALADAUD-BARRIEU D: Un test d'induction de micronoyau su allium sativum; diferentiation de substances clastogènes et mitoclasigues. *Mutat.Res.*, 1983; 119: 55.
- ¹⁰⁸. TOMANIN R, BALLARIN C, NARDINI B, MASTRANGELO G and SARTO F: Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis*, 1991; 6(2): 123-126.
- ¹⁰⁹. RANDEATH E, MILLER RH et al: Covalent DNA damage in tissues of cigarette smokers as determined by ³²P-postlabeling assay. *J. Natl.Cancer Inst.*, 1989; 81(5): 341-347.
- ¹¹⁰. PHILLIPS DA, HEWER A, MARTIN CN, GARNER RC and KING MM: Correlation of DNA adduct levels in human lung with

cigarette smoking. *Nature*, 1988; 336: 790-792.

¹¹¹. NOWAK D, MEYER A et al.: Formation of benzo(a)pyrene-DNA adducts in blood monocytes from lung cancer patients with a familial history of lung cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 1992; 118: 67-71.

¹¹². WESTON A, CAPORASO NE et al: Measurement of 4-aminobiphenyl-hemoglobin adducts in lung cancer cases and controls. *Cancer Res.*, 1991; 51: 5219-5223.

¹¹³. LARSON A, ORRENIUS S, HOLMGREN A and MANNERVIK B: Functions of glutathione. Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical aspects. *Raven Press*, New York. 1983.

¹¹⁴. JOCELYN PC: Biochemistry of the SH-group. *Academic Press*. London, New York 1972; 10.

¹¹⁵. WAHLLANDER A, SOBOLL S, SIES H, LINKE I and MULLER M: Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-Transferases. *Febs.Lett.* 1978; 97: 107-111.

¹¹⁶. MEISTER A and ANDERSON ME: Glutathione. *Ann.Rev.Biochem.*, 1983; 52: 711-760.

¹¹⁷. ANDERSON ME and MEISTER A: Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J.Biol.Chem.*, 1980; 255: 9530-9533.

¹¹⁸. MEISTER A: New developments in glutathione metabolism and their potential application in therapy. *Hepatology.*, 1984; 4(4): 739-742.

¹¹⁹. ORLOWSKY M and KARKOWSKY A: Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system. *Int. Rev.Neurobiol.*, 1976; 19: 75.

¹²⁰. KOSSOWER NS, NECHEMA S and KOSSOWER EM: The glutathione status of cells. *Int.Rev.Citol.* (Academic Press Inc.), 1978; 54: 109-160.

-
121. VIÑA J, VIÑA JR and SAEZ GT: Glutathione: Metabolism and physiological functions. *Life Chemistry Reports*, 1986; 4: 1-35.
122. ORRENIUS S, ORMSTAD K, THOR H and JEWELL SA: Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cell. *Fed.Proc.*, 1983; 42: 3177-3188.
123. ARRICK BA and NATHAN CF: Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: A review. *Cancer Res.*, 1984; 44(10): 4224-4232.
124. SURESH S, TATES S and MEISTER A: Stimulation of the hydrolytic and decrease of the transpeptidase activity of gamma-glutamyl transpeptidase by maleate, identity of a rat kidney maleate-stimulated glutaminase and gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 1974; 71: 3329-3333.
125. REED DJ and FARISS MW: Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol.Rev.*, 1984; 36: 25S.
126. MEISTER A: Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 1983; 220: 472-477.
127. FLOHE L and GUNZLER WA: Glutathione-dependent oxidation-reduction reactions. In: Glutathione: metabolism and function. Arias IM and Jakoby WB (eds). Raven press, New York, 1976.
128. HATHCOCK JN: Metabolic mechanism of drug nutrient interactions. *Fed.Proc.*, 1985; 44: 124.
129. ORRENIUS S and SIES H: Compartmentation of detoxication reactions. In: SIES H. Metabolic compartmentation. *Academic Press*, 1982: 485.
130. MASON RP and FISCHER V: Free radicals of acetaminophen: their subsequent reactions and toxicological significance. *Fed. Proc.*, 1986; 45: 2493.

-
- ¹³¹. RUSSO A and MITCHELL JB: Potentiation and protection of Adriamycin cytotoxicity by cellular glutathione modulation. *Cancer Treat.Rep.*, 1985; 69: 1293-1296.
- ¹³². RUSSO A, DE GRAFF W, FRIEDMAN N and MITCHELL JB: Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs. *Cancer Res.*, 1986; 46: 2845-2848.
- ¹³³. SIGRUN H et al: Inhibition of binding of benzo(a)pyrene metabolites to nuclear DNA by glutathione and glutathione-S-transferase B. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1980; 94(2): 612-617.
- ¹³⁴. BAUMAN PF, SMITH TK and BRAY TM: Effect of dietary protein deficiency and L-2-oxothiazolidine-4-carboxilate on the diurnal rhythm of hepatic glutathione in the rat. *J.Nutr.*, 1988; 118(8): 1049-1054.
- ¹³⁵. OBERLEY LW and OBERLEY TD: Free radicals, cancer and aging. In: Johson Jr JE, Walford R, Harman D and Miquel J (eds.). *Free radicals, aging and degenerative diseases*. ALAN R. Liss. Inc., New York. 1986; 325.
- ¹³⁶. KONDO T, DELE GL and BEUTLER E: Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc.Natl.-Acad. Sci.USA*, 1980; 77: 6359.
- ¹³⁷. CORTES MP, FERNÁNDEZ E y CÁRDENAS AM: Antioxidantes y especies activas del oxígeno: importancia biológica y clínica. *Farmacoterapia*. 1990; 7(5): 246-253.
- ¹³⁸. HARMAN D: The again process. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 1981; 78: 7124-7128.
- ¹³⁹. MACHLIN LJ and BENDICH A: Free radicals tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb.*, 1987; 1: 441-445.
- ¹⁴⁰. KETTERER B and MEYER DJ: Glutathione tranferases: a possible role in the detoxication and repair of DNA and lipid hydroperoxides. *Mutat.Res.*, 1989; 214: 33-40.

-
- ¹⁴¹. LAM LKT, SPARNINS VL and WATTEMBERG LW: Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferase activity in the mouse. *Cancer Res.*, 1982; 42(4): 1193-1198.
- ¹⁴². SPARNINS VL, CHUAN J and WATTEMBERG LW: Enhancement of glutathione S-transferase activity of the esophagus by phenols, lactones and benzyl isothiocyanate. *Cancer Res.*, 1982; 42(4): 1205-1207.
- ¹⁴³. BIAGLOW JE, VARNES ME, EPP ER, CLARK EP, TUTTLE SW and HELD KD: Role of glutathione and other tiols in cellular response to radiation and drugs. *Drug Metabolism Reviews.*, 1989; 20(1): 1-12.
- ¹⁴⁴. COMPORTI M, MAELLARO E, DEL BELLO B and CASINI AF: Glutathione depletion: its effects on other antioxidant systems and hepatocellular damage. *Xenobiotica*, 1991; 21(8): 1067-1076.
- ¹⁴⁵. HERRERA E: Bioquímica de las células sanguíneas. In: *Bioquímica*. Ed. Interamericana, 1986; 1047-1048.
- ¹⁴⁶. WILLIAMS J et al: El eritrocito. In: *Hematología*, tomo I. 1984; 141-142.
- ¹⁴⁷. HINSON JA and KADLUBAR FF: *Glutathione conjugation: Mechanisms and biological significance*. Sies H and Ketterer B (eds.). Academic press, London, 1988; pp.235-280.
- ¹⁴⁸. MULDER GJ and TE KOPPELE JM: *Glutathione conjugation: Mechanisms and biological significance*. Sies H and Ketterer B (eds.). Academic Press, London, 1988; pp. 357-389.
- ¹⁴⁹. KETTERER B, MEYER DJ and CLARK AG: *Glutathione conjugation: Mechanisms and biological significance*. Sies H and Ketterer B (eds.). Academic Press, London, 1988; pp.73-135.

-
150. BHAGAVAN NV: Metabolismo de los aminoácidos. In: *Bioquímica*, 2ª ed. Ed.Interamericana, México. 1983.
151. LESTAS AN and RODECK CH: Normal glutathione content and some related enzyme activities in the fetal erythrocytes. *Br.J.Haematol.*, 1984; 57: 695-702.
152. BREWER GJ: Red cell metabolism and function. *Ed.Brewer*, 3ª ed. Plenum Press. New York. 1984.
153. STRYER L: Obtención y almacenamiento de energía metabólica. In: *Bioquímica*, 2ª ed. Ed.Reverté S.A., 1982; 316-318.
154. VIVES CORRONS JL: Hemólisis y anemias hemolíticas. Anemias hemolíticas debidas a membranopatías y trastornos congénitos del metabolismo. *Medicine*. 5ª Ed., 1988;16:701-715.
155. AL-TURK WA, STOHS SJ, EL-RASHIDY FH and OTHMAN S: Changes in glutathione and its metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes with age. *J.Pharm. Pharmacol.*, 1987; 39(1):13-16.
156. IMANISHI H, NAKAI T, ABE T and TAKINO T: Glutathione metabolism in red cell aging. *Mech. Ageing Dev.*, 1985; 32(1): 57-62.
157. KOSOWER NS and KOSOWER EM: Glutathione and cell membrane thiol status. In: LARSON A et al.(eds.). *Functions of glutathione: Biochemical, toxicological and clinical aspects*. Eds. Raven Press, New York. 1983: 307.
158. VLADIMIROV YA: Free radical lipid peroxidation in biomembranes: mechanism, regulation and biological consequences. In: Johnson JE Jr et al (eds.). *Free radicals aging and degenerative diseases*. Ed.Alan R.Liss, Inc., New York. 1986; 141.
159. FAZI A, MANCINI U, PIATTI E, ACCORSI A and MAGNANI M: Human red blood cells as bioreactors for the inactivation of harmful xenobiotics. *Biotechnol.Appl.Biochem.*, 1991; 14:

60-68.

- ¹⁶⁰. KONDO T, TANIGUCHI N and KAWAKAMI Y: Significance of glutathione S-conjugated for glutathione metabolism in human erythrocytes. *Eur.J.Biochem.*,1984; 145(1): 131-136.
- ¹⁶¹. HENNIGHAUSEN G: On the toxicological significance of the interaction of foreign compounds with glutathione and glutathione-S-transferases. *Z.Gesamte Hyg.Ihre.Grenzgeb.*, 1984; 30(11): 603-606.
- ¹⁶². HETU C, YELLE L and JOLY JG: Influence of ethanol on hepatic glutathione content and on the activity of glutathione-S-transferases and epoxide hydrase in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 1982; 10(3): 246-250.
- ¹⁶³. CHASSEUD LT: The role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.*, 1979; 29: 175-274.
- ¹⁶⁴. HARADA S, ABEI M, TANAKA N, AGARWAL DP and GOEDDE HW: Liver glutathione-S-transferase polymorphism in Japanese and its pharmacogenetic importance. *Human Genetics.*, 1987; 75: 322-325.
- ¹⁶⁵. BOYER TD: The glutathione -S-transferases: an update. *Hepatology*, 1989; 9(3): 486-496.
- ¹⁶⁶. MORGENSTERN R, De PIERRE JW and JORNVALL H: Microsomal glutathione transferase: primary structure. *J.Biol.Chem.*, 1985; 260: 13976-13983.
- ¹⁶⁷. PETRUZELLI S, BERNARD P, PAOLETTI P, RANE A, GIUNTINI C and PACIFICI GM: Presence of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in human pulmonary alveolar macrophages. *Eur.J. Clin.Pharmacol.*, 1988; 34(4): 419-421.
- ¹⁶⁸. PETRUZELLI S, CAMUS AM, CARROZZI L, GHELARDUCCI L, et al: Long-lasting effects of tobacco smoking on pulmonary drug-metabolizing enzymes: a case control study on lung cancer patients. *Cancer Res.*, 1988; 48(16): 4695-4700.

-
169. VAN DER JAGT DL, HUNSAKER LA, GARCIA KB, et al: Isolation and characterization of the multiple glutathione S-transferases from human liver. *J.Biol.Chem.*, 1985; 260: 11603-11610.
170. SUZUKI T, COGGAN M, SHAW DC, et al: Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isozymes. *Ann.Hum.Genet.*, 1987; 51: 95-106.
171. BOCCIO G, Di ILIO C, JORNVALL H, et al: Identification of a novel glutathione transferase in human skin homologous with class alpha glutathione transferase 2-2 in the rat. *Biochem.J.*, 1987; 244: 21-25.
172. THEODORE C, SINGH SV, HONG TD, et al: Glutathione S-transferases of human brain. *Biochem.J.*, 1985; 225: 375-382.
173. SEIDEGARD J, PERO RW, MILLER DG and BEATTIE EJ: A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, 1986; 7(5): 751-753.
174. YOSHIZAKI Y, FUJII S and KANEKO T: Immunological cross-reactivity of human glutathione S-transferases from blood cells. *Acta Haematol.*, 1987; 78(1): 48-50.
175. BOARD PG: Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am.J.Human Genet.*, 1981; 33: 36-43.
176. STRANGE RG, FAULDER CG, DAVIS BA, HUME R, BROWN JA, COTTON W and HOPKINSON DA: The human glutathione S-transferases, studies on the tissue distribution and genetic variation of the GST1, GST2 and GST3 isozymes. *Ann.Human Genet.*, 1984; 18: 11-20.
177. KETTERER B, MEYER D, TAYLOR J and BURCHEL B: Glutathione transferases and their role in xenobiotic metabolism. *TIPS*, 1984; 5(8): 319-320.

-
178. DE WAZIERS I, CUGNENC PH, YANG CS, LEROUX JP and BEAUNE PH: Cytochrome P-450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extra-hepatic tissues. *J.Pharmacol.Exper.Ther.*, 1990; 253(1): 387-394.
179. LAISNEY V, VAN CONG N, GROSS MS and FREZAL J: Human genes for glutathione S-transferases. *Human Genet.*, 1984; 68: 221-227.
180. VAN CONG N, LAISNEY V, GROSS MS and FREZAL J: Glutathione S-transferases. Tissues distribution. Number of loci. Polymorphism chromosome localizations. *Birth Defects Conference (7th International Workshop on Human Gene Mapping)*. Los Angeles, 1983; 20: 554.
181. MARCUS CJ, HABIG WH and JAKOBY WB: Glutathione transferase from human erythrocytes. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1978; 188(2): 287-293.
182. BOYER TD and KENNEY WC: Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA (eds.). *Biochemical pharmacology and toxicology*, Vol.1, New York: John Wiley and Sons., 1985; 297-363.
183. DIXIT R, DAS M, SETH PK and MUKHTAR H: Interaction of acrylamide with glutathione in rat erythrocytes. *Toxicol. Letters*, 1984; 23: 291-298.
184. PACIFICI GM, FRANCHI M, COLIZZI C, GIULIANI L and RARE A: Glutathione S-transferase in human: development and tissue distribution. *Arch.Toxicol.*, 1988; 61(4): 265-269.
185. SINGHI S, SRIVASTAVA S and AWASTHI Y: Binding of benzo(a)pyrene to rat lung glutathione S-transferase in vivo. *FEBS*, 1985; 179(1): 2094.
186. GROVEN PL: Glutathione S-transferases in the detoxification. *Biochem.Soc.Trans.*, 1982; 10(2): 80-82.
187. ANDERS MW: Bioactivation of halogenated hydrocarbons. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.*, 1982/83; 19(6-7): 699-706.

-
188. SENJO M, ISHIBASHI T and IMAI Y: Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome b₆ from mitochondria. *J.Biol. Chem.*, 1985; 260: 9191-9196.
189. WONG M and WELLS PG: Effects of the N-acetylcysteine on fetal development and on phenytoin teratogenicity in mice. *Teratogenesis Carcinog.Mutagen.*, 1988; 8(2): 65-79.
190. SANETO RP, AWASTHI YC and SRIVASTAVA SK: Mercapturic acid pathway in bovine ocular lens, cornea, retina and retinal pigmented epithelium. *Exp.Eye Res.*, 1982; 35(2): 107-111.
191. BRODEUR J: Urinary thioethers as biological monitors of environmental exposure to chemicals. In: Plaa GL, Du Souich P, Erill S (eds.). *Interactions between drugs and chemicals in industrial societies*. 1987; 151-159.
192. KETTERER B, COLES B and MEYER DJ: The role of glutathione in detoxication. *Environmental Health Perspectives*, 1983; 49: 59-69.
193. BAKKE J and GUSTAFSSON JA: Mercapturic acid pathway metabolites of xenobiotics: generation of potentially toxic metabolites during enterohepatic circulation. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)*, 1984; 5(12): 517-521.
194. BOLT HM, FILSER JG, LAIB RJ and OTTENWÄLDER H: Binding kinetics of vinyl bromide at very low doses. *Arch.Toxicol.*, 1980; 3: 129-142.
195. LASH LH and ANDERS MW: Mechanism of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine and S-(1,2-dichlorovinyl)-L-homocysteine-induced renal mitochondrial toxicity. *Mol.Pharmacol.*, 1987; 32(4): 549-556.
196. PICKETT CB and LU AYH: Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation and biological function. *Ann.Rev. Biochem.*, 1989; 58: 743-764.

-
197. FARBER E: Extrahepatic drug metabolism and chemical carcinogenesis meeting, 1983. Stockholm, Sweden, Abstract n° L2, 16.
198. AHLBORG G, BERGSTROM B, HOGSTEDT C, EINISTO P and SORSA M: Urinary screening for potentially genotoxic exposures in a chemical industry. *Br.J.Industrial Med.*, 1985; 42: 691-699.
199. ONG T, STOCKHAUSEN A, ADANSO D and WHONG W: The urine mutagenicity assay system. *Scand.J.Work Environ.Health*, 1985; 11: 45-50.
200. JIMÉNEZ-SÁNCHEZ A y GUERRERO R: Detección de sustancias mutagénicas. Test de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* (método de Ames). In: *Genética molecular bacteriana*. Ed.Reverte, Barcelona. 1982: 345-366.
201. MARON D and AMES B: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat.Res.*, 1983; 113: 173-215.
202. QUILLARDET PH, DE BELLECOMBE C and HOFNUNG M: The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat.Res.*, 1985; 147: 79-95.
203. QUILLARDET PH and HOFNUNG M: The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat.Res.*, 1985; 147: 65-78.
204. McLEMORE TL, RUSSELL MR, WRAY NP, CANTRELL ET and BUSBEE DL: Reassessment of the relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and lung cancer. *Cancer*, 1981; 48: 1438-1443.
205. GREEN T, NASH JA, ODUM J and HOWARD EG. In: Extrahepatic drug metabolism and chemical carcinogenesis meeting. 1983. Stockholm, Sweden, Abstract n° B23, 126.
206. LAFUENTE A, COBOS A and MALLOL J: A pilot study of

urinary thioethers as biological indicators of the urban contamination. *Public Health*, 1987; 101: 267-276.

207. VERMOKEN AJM: Studies on human hair follicles in the field of biochemical, pharmacology and toxicology. *Asean J.Clin. Sci.*, 1980; 1(4): 276-286.

208. ZIELHUIS RL: Biological monitoring. *Scand.J.Work Environ. Health*, 1978; 4: 1-18.

209. BARTSCH H: Screening test in chemical carcinogenesis. *IARC Scientific Publication*, 1980; n°812: 467-486.

210. HOGUE CJR and BREWSTER MA: The potential of exposure biomarkers in epidemiologic studies of reproductive health. *Environ.Health Perspect.*, 1991; 90: 261-269.

211. DEVORET R: Test bacterianos de substancias potencialmente cancerígenas. In: Santos E, Rodríguez J. *El Cáncer*. Ed. GRAFESA, Barcelona, 1987, 46-56.

212. SIMMON VF: Applications of the Salmonella/ microsome assay. In: Stich HF and San RHC (eds). *Short-term tests for chemical carcinogens*. Springer, New York, 1981: 120-126.

213. KIER LD: Use of the Ames test in toxicology. *Regulat.Toxicol. Pharmacol.*, 1985; 5: 59-64.

214. DE LA PEÑA P y DE LA PEÑA E: Carcinogenicidad de los productos químicos. *Rev.San.Hig.Pub.*, 1980; 54: 273-280.

215. SHANABRUCH WG and WALKER GC: Localization of the plasmid (pKM 101) gene(s) involved in rec A⁺ lex A⁺-dependent mutagenesis. *Mol.Gen.Genet.*, 1980; 179: 289-297.

216. BARNES W, TULLEY E and EISENSTAD E: Base-sequence analysis of His⁺ revertans of the his G46 missence mutations in *Salmonella typhimurium*. *Environ.Mutagen.*, 1982; 4: 297 (abtr.Aa-1).

-
217. KADO NY, LANGLEY D and EISENSTADT E: A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat.Res.*, 1983; 121: 25-32.
218. MORTELMANS KE: Use of in vitro short-term mutagenesis tests for the toxicological evaluation of environmental chemicals. *J.Ind.Microbiol.*, 1987-Suppl.2: 163-170.
219. KRIEBEL D, COMMONER B, BOLLINGER D, BRONSDEN A, GOLD J and HENRY J: Detection of occupational exposure to genotoxic agents with a urinary mutagen assay. *Mutat.Res.*, 1983; 108: 67-79.
220. SWENBERG JA, RICHARDSON FC, BOUCHETON JA and DYROFF MC: Relationships between DNA adduct formation and carcinogenesis. *Environ.Health Perspec.*, 1985; 66: 177-183.
221. HENDERSON PT, VAN DOORN R, LEIJDEKERS CM and BOS RP: Excretion of thioethers in urine after exposure to electrophilic chemicals. *IARC Sci.Publ.*, 1984; 59: 173-187.
222. WARING MJ: DNA modification and cancer. *Ann.Rev.Biochem.*, 1981; 50: 159-192.
223. PITOT HC and SIRICA AE: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem.Biophys.*, 1980; Acta 605: 191-225.
224. LA VOIE EJ, SASSON IM, HOFFMANN D, MARSHALL MV and ROGERS W: Mutagens in the urine of cigarette smokers. *Banbury Rep.*, 1986; 23: 121-136.
225. SASSON IM, COLOMAN DT, LA VOIE EJ, HOFFMAN D and WYNDER EL: Mutagens in human urine: Effects of cigarette smoking and diet. *Mutat.Res.*, 1985; 158(3): 149-157.
226. ROE FJC: Drugs and chemicals. Carcinogens, procarcinogens and promoters. In: Plaa GL, Du Souich P and Erill S (eds.). *Interaction between drugs and chemicals in industrial societies*. Elsevier Science Publishers B.V. (Biochemical Division), 1987: 101-119.

-
227. AMES B: Dietary carcinogens and anti-carcinogens. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.*, 1984; 22(3): 291-301.
228. SUGIMURA T: Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutat.Res.*, 1985; 150(1-2): 33-41.
229. CERNA M and ANGELIS KJ: Mutagenicity in the Salmonella/microsome assay of tobacco condensates formed during pipe smoke. *Mutat.Res.*, 1985; 143: 161-164.
230. YAMASAKI E and AMES BN: The concentration of mutagens from urine by XAD-2 adsorption: cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)*, 1977; 74: 3555.
231. FALCK K, SORSA M, VAINIO H and KILPIKARII: Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. *Mutat.Res.*, 1980; 79: 45.
232. LAIRES A, BORGA H, RUEFF J, GOMES MI and HALPERM M: Urinary mutagenicity in occupational exposure to mineral oils and iron particles. *Carcinogenesis*, 1982; 3: 1077-1079.
233. BEEK B, ARANDA I and THOMSON E: Induction of sister chromatid exchanges, cell-cycle delay and chromosomal aberrations by human urine concentrates. *Mutat.Res.*, 1982; 92: 333.
234. McKOY E and ROSENKRANZ HS: Cigarette smoking may yield nitroarenes. *Cancer Lett.*, 1982; 15: 9.
235. FLORIN I, RUTBERG L, CURVALL M and ENZELL CR: Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames'test. *Toxicology*, 1980; 18: 219-232.
236. IZARD C, VALAUD-BARRIEU D, FAYEULLE JP and TESTA A: Influence des parametres de famage sur l'activité genotoxique de la phase gazeuse de fumée de cigarette, mesurée sur le lymphocyte human et la levure. *Mutat.Res.*,

1980; 77: 341.

237. MALLOL J, LAFUENTE A, FESTY B, SANCHO-GARNIER H, HENDERSON PT y BOSS RT: Tioéteres y mutágenos en orina: posibles predictores de riesgo en el cáncer de pulmón. *Med.Clin.*, 1987; 89 (supl.1): 10-15.

238. CLAXTON LD, MORIN RS, HUGHES TJ and LEWTAS J: A genotoxic assessment of environmental tobacco smoke using bacterial bioassays. *Mutat.Res.*, 1988; 222: 81-99.

239. CURVALL M, ROMERT L, NORLEN E and ENZELL CR: Mutagen levels in urine from snuff users, cigarette smokers and non tobacco users. A comparison. *Mutat.Res.*, 1987; 188: 105-110.

240. LENNARD MS, TUCKER GT and WOODS HF: The Polymorphic oxidation of β -Adrenoceptor antagonist. Clinical Pharmacokinetic considerations. *Clinical Pharmacokinetics*, 1986; 11: 1-17.

241. JACQZ E, HALL SD and BRANCH RA: Genetically determined polymorphisms in drug oxidation. *Hepatology*, 1986; 6(5): 1020-1032.

242. HUGHES HB, BIEHL JP, JONES AP et al.: Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral isoniazid neuritis. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1954; 70: 266-274.

243. EVANS DAP, MANLEY KA and McKUISCK VA: Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br.Med.J.*, 1960; 2: 485-491.

244. MAHGOUB A, IDLE JR, DRING LG, LANCASTER R and SMITH RL: Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*, 1977; 2: 584-586.

245. SJÖQVIST F, BORGÄ O y L'E ORME M: Principios de farmacología clínica. In: *Farmacología clínica y terapéutica. Principios y práctica*. (Graeme S. Avery) Ed. Salvat, Barcelona, 1983; Cap 1: 1-58.

-
246. GOTH A. Farmacogenética: respuesta individual a los fármacos. In: *Farmacología médica*. Ed. DOYMA. Barcelona 1986; 48-59.
247. CLARK DWJ: Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications. *Drugs*, 1985; 29: 342-375.
248. NAKAMURA K, GOTO F, RAY W A, McALLISTER C B, JACQZ E, WILKINSON G R and BRANCH R A: Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1985; 38(4): 402-408.
249. LA DU BN and ECKERSON HW: The polymorphic paraxonase/arylesterase isozyme in human serum. *Fed. Proc.*, 1984; 43: 2338-2341.
250. ROWAT AK: Genetic aspects of ethanol disposition and dependence. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 1983; 5: 198-199.
251. YOSHIDA A: Molecular basis of difference in alcohol metabolism between Orientals and Caucasians. *Jpn. J. Hum. Genet.* 1982; 27: 55-70.
252. WEBER WW: Acetylation of drugs. In: Fishman WH (ed.). *Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis*. Academic Press, New York, 1973; Vol 3: 249-296.
253. EICHELBAUM M: Defective oxidation of drugs; Pharmacokinetic and therapeutic implication. *Clin. Pharmacokinet.*, 1982; 7: 1-22.
254. FLOREZ J, ARMIJO JA y MEDIAVILLA A: Procesos de metabolización de fármacos. In: *Farmacología Humana*, tomo I. Ed. Eunsa, Pamplona 1987: 67-76.
255. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *IARC*, Lyon (France). 1987; suppl. 7.

-
256. HEIN DW, HIRATA M, GLOWINSKI IB and WEBER WW: Biochemical evidence for the coexistence of monomorphic and polymorphic N-acetyltransferase activities on a common protein in rabbit liver. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1982; 220(1): 1-7.
257. BERNSTEIN RE: Letter to editor. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1981; 123: 568-569.
258. RYAN DE, RAMANATHAN L, IIDA S, THOMAS PE, HANIU MH, SHIVELY JE, LIEBER ChS and LEVING W: Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985; 260(10): 6385-6393.
259. INABA T and ARIAS TD: On phenotyping with isoniazid: The use of urinary acetylation ratio and the uniqueness of antidotes. Study of two Amerindian populations. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1987; 42: 493-497.
260. ISELIUS L and EVANS DAP: Formal genetics of isoniazid metabolism in man. *Clinical Pharmacokinetics*, 1983; 8: 541-544.
261. LADERO JM y ARROJO A: Envejecimiento y fenotipo acetilador hepático. *Rev.Iberam.Invest.Clin.*, 1983; 2(1): 21-26.
262. PUCHE E y MOTA C: Causas productoras de fallo del tratamiento medicamentoso. *Med.Clin.(Barc.)*, 1985; 84: 72-73.
263. SAUCEDO R, MAYOR B y PUCHE E: Estudio del fenotipo acetilador en Andalucía. *Rev.Clin.Esp.*, 1985; 177: 75-77.
264. EVANS DAP and WHITE TH: Human acetylation polymorphism. *J.Lab.Clin.Med.*, 1964; 63: 394-403.
265. LA DU BN: Isoniazid and pseudocholinesterase polymorphism. *Fed.Procl.*, 1972; 31: 1276-1285.
266. ELLARD GA: Variations between individuals and popula-

tions in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of the pulmonary tuberculosis. *Clin.Pharmacol.Ther*, 1976; 19: 610-625.

267. BUCHANAN N, STRICKWOLD B, SHUENYANE E: Isoniazid inactivation in black patients with tuberculosis. *S.Afr. Med.J.*, 1976; 50: 463-465.

268. LADERO JM, ARROJO A y GILSANZ V: Acetilación hepática en la población española. *Gastroenterol.Hepatol.*, 1979; 2: 236-240.

269. AHUMADA J, SERRANO J, DURAN J y SANTANA ML: Fenotipo acetilador en una muestra de la población andaluza. *Actas 2ª Reunión Luso-Española de Farmacología*, Coimbra, 1983.

270. KALOW W: Ethnic differences in drug metabolism. *Clin. Pharmacokinet.*, 1982; 7: 337-340.

271. McQUEEN CA, WEBER WW: Characterization of human lymphocyte N-acetyltransferase and its relationship to the isoniazid acetylase polymorphism. *Biochem.Gen.*, 1980; 18: 889-903.

272. GLOWINSKI IB, RADTKE HE, WEBER WW: Genetic variation in N-acetylation of carcinogenic arylamines by human and rabbit liver. *Mol.Pharmacol.*, 1978; 14: 940-949.

273. JENNE JW: Partial purification and biochemical properties of the isoniazid transacetylase in human liver. Its relationship to the acetylation on p-aminosalicylic acid. *Int.Invest.*, 1965; 44: 1992-2002.

274. PATTERSON E, RADTKE HE, WEBER WW: Immunochemical studies of rabbit N-acetyltransferases. *Mol.Pharmacol.*, 1980; 17: 367-373.

275. LADERO JM: Acetilación hepática polimórfica. *N.Arch. Fac.Med.*, 1984; 42(5): 263-270.

276. GRANT DM, LOTTSPEICH F and MEYER UA: Evidence for two

closely related isozymes of arylamine N-acetyltransferase in human liver. *FEBS Letter*, 1989; 244: 203-207.

277. OSAKO S and DEGUCHI T: Cloning and expression of cDNA's for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferase from human liver. *J.Biol.Chem.*, 1990; 265: 4630-4634.

278. GRANT DM, MÖRIKE K, EICHELBAUM M and MEYER UA: Acetylation pharmacogenetics: the slow acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J.Clin.Invest.*, 1990; 85: 968-972.

279. LADERO JM, ARROJO A, SANCHEZ DE PAZ F y GILSANZ V: Efecto de la rifampicina sobre la acetilación hepática polimórfica. *Gastroenterol. Hepatol.*, 1981; 4: 15-17.

280. PRALONG E, GASCON MP et DAYER P: Conséquences cliniques du polymorphisme génétique de la N-acétylation. *Méd. et Hyg.* 1986; 44: 1162-1170.

281. KERGUERIS MF, BOURIN M and LAROUSSE C: Pharmacokinetics of isoniazid: Influence of age. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1986; 30(3): 335-340.

282. MILLER ME and COSGRIFF JM: No effect of smoking on sulfamethazine acetylation. *Drug Intell.Clin.Pharm.(USA)*, 1984; 18(7-8): 620-622.

283. FARAH F, TAYLOR W, RAELINS MD and JAMES O: Hepatic drug acetylation and oxidation: effects of ageing in man. *Brit.Med.J.*, 1977; 2: 155.

284. LEVI AJ, SHERLOCK S and WALKER D: Phenylbutazone and isoniazid metabolism in patients with liver disease in relation to previous drug therapy. *Lancet*, 1968; 1: 1275.

285. JESSAMINE AG, HODGKING MM and EIDUS L: Urine test for phenotyping slow and fast acetylators. *Can.J.Public Health*, 1974; 65: 119-123.

-
286. GRANT DM, TANG BK and KALOW W: A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1984; 17: 459-464.
287. TANG BK, KADAR D and KALOW W: An alternative test for acetylator phenotyping with caffeine. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1987; 42(5): 509-513.
288. TIMBRELL JA, MITCHELL JR, SNODGRASS WR and NELSON SD: Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism in vivo. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1980; 213: 364-369.
289. LAUTERBURG BH, SMITH ChV, TODD EL and MITCHELL JR: Oxidation of hydrazine metabolites formed from isoniazid. *Clin.Pharmacol. Ther.*, 1985; 38: 566-571.
290. PATTISAPU RJ and GANGADHARAM D: Isoniazid, Rifampin and hepatotoxicity. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1986; 133: 963-965.
291. MITCHELL JR, THORGEIRSSON VP, BLACK M, TIMBRELL JA, SNODGRASS WR, POTTER WZ, JOLLOW DJ and KAISER HR: Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydrazine metabolites. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1975; 18: 70-79
292. MITCHELL JR: Isoniazid liver injury: Clinical spectrum, pathology and probable pathogenesis. *Ann.Intern.Med.*, 1976; 84: 181.
293. ELLARD GA, MITCHINSON DA, GIRLING DJ et al: The hepatic toxicity of isoniazid among rapid and slow acetylators of the drug. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1978; 118:628-629.
294. LAUTERBURG BH, SMITH CV, TODD EL and MITCHELL JR: Pharmacokinetics of the toxic hydrazino metabolites formed from isoniazid in humans. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 1985; 235: 566-570.
295. ALARCÓN-SEGOVIA D, FISHBEIN E, ALCOLA H: Isoniazid acetylation rate and development of antinuclear antibodies upon isoniazid treatment. *ARTHRITIS RHEUM.*, 1971; 14: 748-

752.

296. SCHRÖDER P, KLITGAARD NA and SIMONSEN E: Significance of the acetylation phenotype and the therapeutic effect of procainamide. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1979; 15: 63-68.
297. RODEN DM, REELE SB, HIGGINS SB, WILKINSON GR, SMITH RF, OATES JA and WOOSLEY RL: Antiarythmic efficacy, pharmacokinetics and safety of N-acetylprocainamide in human subjects: comparison with procainamide. *Am.J.Cardiol.*, 1980; 46: 463-468.
298. CAMPBELL W et al: Acetylator phenotype and the clinical pharmacology of slow-release procainamide. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1976; 3: 1023-1026.
299. ROBINSON CJG and BALAZS T: Drug-induced antinuclear antibodies in the guinea pig. *Life Sci.*, 1982; 30: 199.
300. EDWARDS RL et al: Studies on circulating anticoagulant in procainamide-induced lupus erythematosus. *Arch.Intern.Med.*, 1981; 141: 1688.
301. ALLOZA JL: Significado e implicaciones clínicas del estado acetilador. *Jano*, 1983; 571: 94-97.
302. DAVIES DM, BEEDIE MA and RAWLINS MD: Antinuclear antibodies during procainamide treatment and drug acetylation. *Br.Med.J.*, 1975; 3: 682-683.
303. RAMSAY LE, SILAS JH, OLLERENSHAW JD, TUCKER GT, PHILLIPS FC and FREESTONE S: Should the acetylator phenotype be determined when prescribing hydralazine for hypertension? *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1984; 26(1): 39-42.
304. VANDENBERG MJ, WRIGHT P, HOLMES J, ROGERS HJ and AHMAD RA: The hypotensive response to hydralazine, in triple therapy, is not related to acetylator phenotype. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1982; 13: 747-750.
305. STRANDBERG I, BOMAN G, HASSLER L and SJÖQVIST F:

Acetylator phenotype in patients with hydralazine-induced lupoid syndrome. *Acta Med.Scand.*, 1976; 200: 362-371.

³⁰⁶. BATCHELOR JR, WELSH KI, MANSILLA-TINOCO R, DOLLERY CT, HUGHES GFV, BERNSTEIN R, RYAN P, NAISH PF, ABLER GM, BING RF and RUSSELL GI: Hydralazine induced systemic lupus erythematosus: influence of HLA-DR and sex on susceptibility. *Lancet*, 1980; 1: 1107-1109.

³⁰⁷. BATES TR, BLUMENTHAL HP and PIENIASZEK HJ Jr: Salivary excretion and pharmacokinetics of sulfapyridine after sulfasalazine. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1977; 22(6): 917-927.

³⁰⁸. LADERO JM, FERNANDEZ MJ Y PALMEIRO R: Acetilación hepática polimórfica en la mastopatía fibroquística. *Rev.Clin.Esp.*, 1987; 181: 24-25.

³⁰⁹. MATTILA MJ and TIITINEN H: The rate of isoniazid inactivation in Finnish diabetic and non-diabetic patients. *Ann.Acad.Sci. Fenn(Med)*, 1967; 45: 423-427.

³¹⁰. SHENFIELD GM, McCANN VJ and TJOKRESETTO R: Acetylator status and diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 1982; 22: 441-444.

³¹¹. BODANSKY HJ, DRURY PL, CUDWORTH AG and EVANS DAP: Acetylator phenotypes and type I (insulin-dependent) diabetics with microvascular disease. *Diabetes*, 1981; 30: 907-910.

³¹². EVANS DAP, PATERSON S, FRANCISCO P and ALVAREZ G: The acetylator phenotypes of Saudi Arabian diabetics. *J.Med.Genet.*, 1985; 22: 479-483.

³¹³. HADASOVA E, BRYSOVA V and KADLCAKOVA E: N-acetylation in healthy and diseased children. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1990; 39: 43-47.

³¹⁴. REIDENBERG MM and MARTIN JH: The acetylator phenotype of patients with systemic lupus erythematosus. *Drug Metabolism and Disposition*, 1974; 2: 71-73.

-
- ³¹⁵. REIDENBERG MM, LEVY M, DRAYER DE, ZYLBER-KATZ E and ROBBINS WC: Acetylator phenotype in idiopathic systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 1980; 23: 569-573.
- ³¹⁶. FISHBEIN E and ALARCON-SEGOVIA D: Slow acetylation phenotype in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 1979; 22: 95-96.
- ³¹⁷. ISHIZAKI T, HORAI Y, KOYA G, MATSUYAMA K and IGUCHI S: Acetylator phenotype and metabolic disposition of isoniazid in Japanese patients with lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 1981; 24: 1245-1254.
- ³¹⁸. HORAI Y, ISHIZAKI T, SASAKY T, KOYA G, MATSUYAMA K and IGUCHI S: Isoniazid disposition, comparison of isoniazid phenotyping methods in an acetylator distribution of Japanese patients with idiopathic systemic lupus erythematosus and control subjects. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1982; 13: 361-374.
- ³¹⁹. LADERO JM, JIMENEZ LC, FERNANDEZ MJ and ROBLEDO A: Acetylator polymorphism in discoid lupus erythematosus. *Eur.J.Clin. Oncol.*, 1988; 34: 307-308.
- ³²⁰. PLATZER R, KUPFER A, BIRCHER J and PREISIG RC: Polymorphic acetylation and aminopyrine demethylation in Gilbert's syndrome. *Eur.J.Clin.Invest.*, 1978; 8: 219-223.
- ³²¹. SIEGMUND W, FENGLER JD, FRANKE G, ZSCHIESCHE M, EIKE O, EIKE E, MEISEL P and WULKOW R: N-acetylation and debrisoquine hydroxylation polymorphisms in patients with Gilbert's syndrome. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1991; 32: 467-472.
- ³²². LADERO JM y CANO F: Fenotipo acetilador en la enfermedad de Basedow. *N.Arch.Fac.Med.*, 1983; 41: 79-81.
- ³²³. LEDEN I, HANSON A, MELIANDER A, STURFELT G, SVENSSON B and WAHLIN-BOLL E: Varying distribution of acetylation phenotypes in R.A. patients with and without Sjögren's syndrome. *Scand. J.Rheum.*, 1981; 10: 253-255.

-
324. LADERO JM, JIMENEZ FJ, BENITEZ J, FERNANDEZ-GUNDIN MJ, MARTINEZ C, LLERENA A, COBALEDA J and MUÑOZ JJ: Acetylator polymorphism in Parkinson's disease. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1989; 37: 391-393.
325. EVANS DAP: N-acetyltransferase. *Pharmac.Ther.*, 1989; 42: 157-234.
326. BRYAN GT: Pathogenesis of human urinary bladder cancer. *Environ.Health Perspect.*, 1983; 49: 201-207.
327. LOWER GM: Chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer*, 1982; 49: 1056-1066.
328. KADLUBAR FF: Metabolism and DNA binding of carcinogenic aromatic amines. *ISI Atlas Sci.*, 1987; 1: 129-132.
329. BAYRAKTAR N, KAJBAF M, JATOE SD and GORROD JW: The oxidation of isomeric amino and acetamidobiphenyls by rat hepatic microsomal preparations. *Arch.Toxicol.*, 1987; 60(1-3): 91-92.
330. KAISARY A, SMITH P, JACQZ E, McALLISTER CB, WILKINSON GR, RAY WA and BRANCH RA: Genetic predisposition to bladder cancer: ability to hydroxylate debrisoquine and mephenytoin as risk factors. *Cancer.Res.*, 1987; 47: 5488-5493.
331. WEBER WW: Acetylation pharmacogenetics: experimental models for human toxicity. *Fed.Proc.*, 1984; 43(8): 2332-2337.
332. BELAND FA and KADLUBAR FF: Factors involved in the induction of bladder cancer by aromatic amines. *Banbury Rep.* 1986; 23: 315-326.
333. MILLER ME and COSGRIFF JM: Acetylator phenotype in human bladder cancer. *The Journal of Urology*, 1983; 130: 65-66.
334. WOODHOUSE KW, ADAMS PC, CLOTHIER A, MUCKLOW JC and RAWLIM MD: N-acetylation phenotype in bladder cancer.

Human.Toxicol., 1982; 1: 443-445.

335. CARTWRIGHT RA, ROGERS HJ, BARHAM-HALL D et al: Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*, 1982; 16: 2(8303): 842-846.

336. MOMMSEN S, SELL A and BARFOD N: N-acetyltransferase phenotype of bladder cancer patients in a low risk population. *Lancet*, 1982; 2: 1228.

337. WOLF H, LOWER GM and DRYAN GT: Role of N-acetyltransferase phenotype in human susceptibility to bladder carcinogenic arylamines. *Scan.J.Urol.Nephrol.*, 1980; 14: 161-165.

338. HEIN DW: Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim.Biophys.Acta*, 1988; 948: 37-66.

339. BULOWSKAYA LN, KRUPKIN RG, BOCHINA TA, SHIPKOVA AA and PAVLOVA MV: Acetylator phenotype in patients with breast cancer. *Oncology*, 1978; 35: 185-188.

340. LADERO JM, FERNANDEZ MJ, PALMEIRO R, MUÑOZ JJ, JARA C, LAZARO C and PEREZ-MANGA G: Hepatic acetylator polymorphism in breast cancer patients. *Oncology*, 1987; 44: 341-344.

341. PHILIP PA, ROGERS HJ, MILLIS RR, RUBENS RD and CARTWRIGHT RA: Acetylator status and its relationship to breast cancer and other diseases of the breast. *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*, 1987; 11: 1701-1706.

342. ROOTS I, SCHÜTZE S, KORGE M, DRAKOULIS N, HEINEMEYER G, KAMF D, LOCH H and KARAVIAS T: Genetic host factors possibly predisposing to gastric cancer: Hydroxylator and acetylator status and ABO blood groups. *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 1986; 59(Suppl.V): 220.

343. LANG NP, CHU DZJ, HUNTER CF, KENDALL DC, FLAMMANG TJ and KADLUBAR FF: Role of aromatic amine acetyltransferase in human colorectal cancer. *Arch.Surg.*, 1986; 121: 1259-1261.

-
344. ILETT KF, DAVID BM, D'ETCHON P, CASTLEDEN WM and KWA R: Acetylator status in patients with colorectal carcinoma. *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 1986; 59(Suppl.V): 220.
345. LADERO JM, GONZALEZ FJ, BENITEZ J, VARGAS E, FERNANDEZ MJ, BAKI W and DIAZ-RUBIO M: Acetylator polymorphism in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.*, 1991; 51: 2098-2100.
346. KUNE S, KUNE G and WATSON L: Case-control study of dietary etiological factors: the Melbourne colorectal cancer study. *Nutr.Cancer*, 1987; 1: 21-42.
347. BURGESS EJ and TRAFFORD AP: Acetylator phenotype in patients with lung carcinoma: a negative report. *Eur.J.Respir.Dis.*, 1985; 67: 17-19.
348. PHILIP PA, FITZGERALD DL, CARTWRIGHT RA, PEAKE MD and ROGERS HJ: Polymorphic N-acetylation capacity in lung cancer. *Carcinogenesis*, 1988; 9(3): 491-493.
349. ROOTS I, HEINEMEYER G, DRAKOULIS N and KAMPF D: The role of pharmacogenetics in drug epidemiology. In: Kewitz H, Roots I and Voigt K: *Epidemiological concepts in clinical pharmacology*. SPRINGER-VERLAG, Berlin, Heidelberg 1987; pp 105-118.
350. GORDON GIBSON G and SKETT P: *Introduction to drug metabolism*. Chapman and Hall ed., Cambridge, 1^a Ed. 1986.
351. WOOLF TF and JORDAN RA: Basic concepts in drug metabolism: Part I. *J.Clin.Pharmacol.*, 1987; 27: 15-17.
352. BENET LZ y SHEINER LB: Farmacocinética: dinámica de la absorción de las drogas. In: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. Panamericana, Madrid, 1986; 19-48.
353. EICHELBAUM M: Polymorphic drug oxidation in humans. *Fed. Proc.*, 1984; 43: 2298-2302.

-
354. GUENGERICH FP, UMBENHAUER DR, CHURCHILL PF et al.: Polymorphism of human cytochrome P450. *Xenobiotica*, 1987; 17(3): 311-316.
355. KAPLOWITZ N, AW TY, SIMON FR and STOLZ A: Drug induced hepatotoxicity. (UCLA Conference) *Ann.Intern.Med.*, 1986; 104(6): 826-839.
356. GONZALEZ FJ: The molecular biology of cytochrome P-450s. *Pharmacological Reviews*, 1989; 40(4): 243-288.
357. GONZALEZ FJ, SKODA R, KIMURA S, UMENO M, ZANGER UM, NEVERT DW, GELBOIN HV, HARDWICK JP and MEYER UA: Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 1988; 331: 442-446.
358. GONZALEZ FJ, VILBOIS F, HARDWICK JP, McBRIDE OW, NEVERT DW, HELBOIN HV and MEYER UA: Human debrisoquine 4-hydroxylase (P-450IID1): cDNA and deduced aminoacid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics*, 1988; 2: 174-179.
359. AYESH R, IDLE JR, RITCHIE JC, CROTHERS MJ and HETZEL MR: Metabolic oxidation phenotypes or markers for susceptibility to lung cancer. *Nature*, 1984; 311: 169-170.
360. NEBERT DW and GONZÁLEZ FJ: P-450 genes and evolutionary genetics. *Hosp. Pract.(OFF)*, 1987; 22: 63-74.
361. KIMURA S, UMENO M, SKODA RC, MEYER UA and GONZALEZ FJ: The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and a pseudogene. *Am.J.Hum.Genet.*, 1989; 45: 889-904.
362. EICHELBAUM M, BAUR MP, DEUGLER HJ, OSIKOWSKA-EVERS BO, TIEVES G, ZEKORN C and RITTNER C: Chromosomal assignment of human cytochrome P450 (debrisoquine/ sparteine type) to chromosome 22. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1987; 23: 455-458.
363. LARREY D, DISTLERATH LM, DANNAN GA, WILKINSON GR and

GUENGERICH FP: Purification and characterization of the rat liver microsomal cytochrome P-450 involved in the 4-hydroxylation of debrisoquine, a prototype for genetic variation in oxidative drug metabolism. *Biochemistry*, 1984; 23: 2787-2795.

³⁶⁴. DISTLERATH LM, REILLY PEB, MARTIN MV, DAVIS GG, WILKINSON GR and GUENGERICH FP: Purification and characterization of the human liver cytochrome P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J.Biol.Chem.*, 1985; 260: 9057-9067.

³⁶⁵. GONZALEZ FJ: Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmac.Ther.*, 1990; 45: 1-38.

³⁶⁶. STEINER E, ISELIUS L, ALVAN G, LINDSTEN J and SJÖQVIST F: A family study of genetic and environmental factors determining polymorphic hydroxylation of debrisoquine. *Clin. Pharmacol.Ther.*, 1985; 38: 394-401.

³⁶⁷. SCHELLENS JHM, VAN DER WART JHF, BRUGMAN M and BREIMER DD: Influence of enzyme induction and inhibition on the oxidation of nifedipine, sparteine, mephenytoin and antipyrine in humans as assessed by a "cocktail" study design. *J.Pharmacol.Exper.Ther.*, 1989; 249: 638-645.

³⁶⁸. PHILIP PA, JAMES CA and ROGERS HJ: The influence of cimetidine on debrisoquine 4-hydroxylation in extensive metabolizers. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1989; 36: 319-321.

³⁶⁹. WILLIAMS MT and SIMONET LC: Effects of growth hormone on cytochrome P-450j. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1988; 155: 392-397

³⁷⁰. CONNEY AH, DAVISON C, GASTEL R and BURNS JJ: Adaptive increases in drug metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J.Pharmacol.Exp.Therap.*, 1960; 130: 1-8.

³⁷¹. CONNEY AH, GILLETE JR, INSCOE JK, TRAMS EJ and POSNER HS: 3,4-Benzopyrene-induced synthesis of liver microsomal

enzymes which metabolize foreign compounds. *Science (N.Y.)*, 1959; 130: 1478-1479.

³⁷². MOLOWA DT, SCHUETZ EG, WRIGHTON SA et al: Complete cDNA sequence of a cytochrome P-450 inducible by glucocorticoids in human liver. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 1986; 83: 5311-5315.

³⁷³. HARDWICK JP, SONG BJ, HUBERMAN E and GONZALEZ FJ: Isolation complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic acid ω -hydroxylase (cytochrome P-450 LA ω): identification of a new cytochrome P-450 gene family. *J.Biol. Chem.*, 1987; 262: 801-810.

³⁷⁴. D'ARCY PF: Tobacco smoking and drugs: A clinically important interaction?. *Drug.Intell.Clin.Pharm.*, 1984; 18: 302-307.

³⁷⁵. PARK BK and KITTERINGHAM NR: Assessment of enzyme induction and enzyme inhibition in humans. Toxicological implications. *Xenobiotica*, 1990; 20: 1771-1785.

³⁷⁶. McLEMORE TL, MARTIN RR, WRAY NP, CANTRELL ET and BUSBEE DL: Reassessment of the relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and lung cancer. *Cancer*, 1981; 48: 1438-1443.

³⁷⁷. STEINER E, BERTILSSON L, SAWE J, BERTLING I and SJÖQVIST F: Polymorphic debrisoquine hydroxylation in 757 Swedish subjects. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1988; 44: 431-435.

³⁷⁸. IYUN AO, LENNARD MS, TUCKER GT and WOODS HF: Metoprolol and debrisoquin metabolism in Nigerians: lack of evidence for polymorphic oxidation. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1986; 40: 387-394.

³⁷⁹. LENNARD MS, SILAS JH, FREESTONE S, RAMSAY LE, TUCKER GT and WOODS HF: Oxidation phenotype: A major determinant of metoprolol metabolism and response. *The New England Journal of Medicine*, 1982; 307(25): 1558-1560.

³⁸⁰. BENÍTEZ J, LLERENA A and COBALEDA J: Debrisoquin oxidation polymorphism in a Spanish population.

Clin.Pharmacol.Ther., 1988; 44(1): 74-77.

381. OSIKOWSKA-EVERS B, DAYER P, MEYER UA, ROBERTZ GM and EICHELBAUM M: Evidence for altered catalytic properties of the cytochrome P450 involved in sparteine oxidation in poor metabolizers. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1987; 41: 320-325.

382. DISTLERATH LM and GUENGERICH FP: Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquin and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 1984; 81: 7348-7352.

383. SKODA RC, GONZALEZ FJ, DEMIERRE A and MEYER UA: Two mutant alleles of the human cytochrome P-450 db1 gene (P-450 C2 D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*, 1988; 85: 5240-5243.

384. LADERO JM: Polimorfismos enzimáticos y enfermedad. *Rev. Farmacol.Clin.Exp.*, 1989; 6(3): 177-185.

385. KALOW W: Genetic variation in the human hepatic cytochrome P-450 system. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1987; 31: 633-641.

386. EVANS DAP, MAHGOUB A, SLOAN TP, IDLE JR and SMITH RL: A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. *J.Med. Genet.*, 1980; 17: 102-105.

387. WOODHOUSE NM, EICHELBAUM M, OATES NS, IDLE JR and SMITH RL: Dissociation of co-regulatory control of debrisoquine/phenformin and sparteine oxidation in Ghanaians. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1985; 37: 512-521.

388. INABA T, VINKS A, OTTON SV and KALOW W: Comparative pharmacogenetics of sparteine and debrisoquine. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1983; 33(3): 394-399.

389. RAGHURAM TC, KOSHAKJI RP, WILKINSON GR and WOOD AJJ: Polymorphic ability to metabolize propranolol alters 4

hydroxypropranolol levels but not beta blockade. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1984; 36(1): 51-56.

³⁹⁰. SPINA E, STEINER E, ERICSSON ö and SJÖQVIST F: Hydroxylation of desmethyylimipramine: dependence on the debrisoquine hydroxylation phenotype. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1987; 41: 314-319.

³⁹¹. CRUT J, GASSER R, DAYER P, KRONBACH T, CATIN T and MEYER VA: Debrisoquine type polymorphism of drug oxidation: purification from human liver of a cytochrome P450 isozyme with high activity for bufuralol hydroxylation. *Febs-1680*, 1984; 173(2) : 287-290.

³⁹². LENNARD MS, RAMSAY LE, SILAS JH, TUCKER GT and WOODS HF. *Pharma.Int.Engl.* 1983; 4: 61-65.

³⁹³. SLOAN TP, IDLE JR and SMITH RL: Influence of D^H/D^L alleles regulating debrisoquine oxidation on phenytoin hydroxylation. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1981; 29(4): 493-497.

³⁹⁴. EVANS WE, ZANGER UM and METER UA: Debrisoquine hydroxylase (P-450 db1) activity in human livers heterozygous for a mutant P-450 db1 allele. *Clin.Parmacol.Ther.*, 1989; 45: 181.

³⁹⁵. ALVAN G, VON BAHR C, SEIDEMAN P and SJÖQVIST F: High plasma concentration of β -receptor blocking drugs and deficient debrisoquine hydroxylation. *Lancet*, 1982; 1: 333.

³⁹⁶. MCGOURTY JC, SILAS JH, LENNARD MS, TUCKER GT and WOODS HF: Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism population and family studies. *Br.J.Clin.Pharmac.*, 1985; 20: 555-566.

³⁹⁷. SHAH RR, OATES NS, IDLE JR and SMITH RL: Beta-blockers and drug oxidation status. *Lancet*, 1982; 1: 508-509.

³⁹⁸. LENNARD MS, JACKSON PR, FREESTONE S, TUCKER GT, RAMSAY LE and WOODS HF: The relationship between debrisoquine oxidation phenotype and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol. *Br.J.Clin.Pharmacol.*,

1984; 17: 679-685.

³⁹⁹. WARD SA, WALLE T, WALLE UK, WILKINSON GR and BRANCH RA: Propranolol's metabolism is determined by both mephenytoin and debrisoquin hydroxylase activities. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1989; 45: 72-79.

⁴⁰⁰. MCGOURTY JC, SILAS JH, FLEMING JJ, MCBURNEY A and WARD JW: Pharmacokinetics and beta-blocking effects of timolol in poor and extensive metabolizers of debrisoquin. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1985; 38(4): 409-413.

⁴⁰¹. DAYER P, LEEMANN T, KÜPFER A, KRONBACH T and MEYER UA: Stereo- and regioselectivity of hepatic oxidation in man - effect of the debrisoquine/sparteine phenotype on bufuralol hydroxylation. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1986; 31: 313-318.

⁴⁰². STEINER E, ALVAN G, GARLA M, MAQUIRE JH, LIND M, NILSON SO, THOMSON T, McCLANAHAN JS and SJÖQVIST F: The debrisoquin hydroxylation phenotype does not predict the metabolism of phenytoin. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1987; 42: 326-333.

⁴⁰³. SPINA E and GÖRANSSON M: Effect of antiepileptic drugs on the 2-hydroxylation of desmethylimipramine in human liver microsomes. *IRCS Med.Sci.*, 1984; 12: 1123-1124.

⁴⁰⁴. SPINA E, BIGERSSON C, VON BAHR CH, ERICSSON O, MELLSTRÖM B, STEINER E and SJÖQVIST F: Phenotypic consistency in hydroxylation of desmethylimipramine and debrisoquine in healthy subjects and in human liver microsomes. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 1984; 36(5): 677-682.

⁴⁰⁵. OTTON SV, INABA T and KALOW W: Inhibition of sparteine oxidation in human liver by tricyclic antidepressants and other drugs. *Life Sciences*, 1983; 32: 795-800.

⁴⁰⁶. BALANT-GROGIA AE, SCHULZ P, DAYER P, BALANT L, KUBLI A, GERTSCH C and GARRONE G: Role of oxidation polymorphism on blood and urine concentrations of amitriptyline and its metabolites in man. *Arch.Psych.Neurol.Sci.*, 1982; 232: 215-222.

-
- ⁴⁰⁷. ROOTS I, DRAKOULIS N, PLOCH M, HEINEMEYER G, LODDENKEMPER R, MINKS T, NITZ M, OTTE F and KOCH M: Debrisoquine hydroxylation phenotype, acetylation phenotype and ABO blood groups as genetic host factors of lung cancer risk. *Klin.Wochenschr*, 1988; 66(Suppl.XI): 87-97.
- ⁴⁰⁸. KORSGAARD R, TRELL E, SIMONSON BG et al.: Genetically conditioned susceptibility to lung cancer in smokers. *PRAX.KLIN.PNEUMOL.*, 1983; 37/SPEC-1: 679-681.
- ⁴⁰⁹. TRELL E, TRELL L, JAUZON L et al.: Improved motivation for giving up smoking in persons with genetically determined risk of cancer of the respiratory tract. *PRAX.KLIN. PNEUMOL.*, 1983; 37/SPEC-1: 687-690.
- ⁴¹⁰. CAPORASO N, HAYES RB, DOSEMECI M, HOOVER R, AYESH R, HETZEL M and IDLE J: Lung cancer risk, occupational exposure, and the debrisoquine metabolic phenotype. *Cancer Res.*, 1989; 49: 3675-3679.
- ⁴¹¹. BENÍTEZ J, LADERO JM, JARA C, CARRILLO JA, COBALEDA J, LLERENA A, VARGAS E and MUÑOZ JJ: Polymorphic oxidation of debrisoquine in lung cancer patients. *Eur.J.Cancer*, 1991; 27(2): 158-161.
- ⁴¹². KOURI RE, MCKINNEY CE, SLOMIANY DJ, SNODGRASS DR, WRAY NP and McLEMORE TL: Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res.*, 1982; 42: 5030-5037.
- ⁴¹³. RÜDIGER W, NOWAK D, HARTMANN K et al: Enhanced formation of benzo(a)pyrene: DNA adducts in monocytes of patients with presumed predisposition to lung cancer. *Cancer Res.*, 1985; 45: 5890-5894.
- ⁴¹⁴. BOEHM TLJ: Oncogenes and the genetic dissection of human cancer: implications for basic research and clinical medicine. *Program.Clin.Biochem.Med.*, 1985; 2: 1-48.
- ⁴¹⁵. IANNUZZI MC and MILLER YE: Genetic predisposition to lung cancer. *Sem.Res.Med.*, 1986; 7: 327-332.

-
- ⁴¹⁶. MARKMAN M, BRAINE HG, BIAS WB et al: Association between HLA BW44 and small cell carcinoma of the lung. *New Eng.J.Med.*, 1982; 307: 1087.
- ⁴¹⁷. DELLON AL, ROAGENTINE GN and CHRETIEN PB: Prolonged survival in brochogenic carcinoma associated with HLA-A antigens W-19 and HLA-A5: a preliminary report. *JNCI*, 1975; 54: 1283-1286.
- ⁴¹⁸. CONNEY AH: Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, 1982; 42: 4875-4917.
- ⁴¹⁹. IDLE JR, MAHGOUB A, SLOAN TP, SMITH RL, MBANEFO CO and BABABUNMI EA: Some observations on the oxidation phenotype status of Nigerian patients presenting with cancer. *Cancer.Lett.*, 1981; 11: 331-338.
- ⁴²⁰. PLUMMER S, BOOBIS AR and DAVIES DS: Is the activation of aflatoxin B1 catalyzed by the same form of cytochrome P450 as that 4-hydroxylating debrisoquine in rat and/or man? *Arch. Toxicol.*, 1986; 58(3): 165-170.
- ⁴²¹. McMANUS ME: Metabolic characterization of human liver microsomal cytochromes P-450 involved in the oxidation of debrisoquine, bufuralol and the carcinogen 2-acetylaminofluorene. *Pharmac.Ther.*, 1987; 33:47-53.
- ⁴²². LADERO JM, BENÍTEZ J, GONZÁLEZ FJ, VARGAS E and DÍAZ-RUBIO M: Oxidative polymorphism of debrisoquine is not related to human colo-rectal cancer. *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 1991; 40: 525-527.
- ⁴²³. CARTWRIGHT RA, PHILIP PA, ROGERS HJ and GLASHAN RW: Genetically determined debrisoquine oxidation capacity in bladder cancer. *Carcinogenesis*, 1984; 5: 1191-1192.
- ⁴²⁴. BENÍTEZ J, LADERO JM, FERNÁNDEZ-GUNDIN MJ et al: Polymorphic oxidation of debrisoquine in the bladder cancer. *Ann.Med.*, 1990; 22: 157-160.
- ⁴²⁵. RITTER J, SOMASUNDARAM R, HEINEMEYER G and ROOTS I: The

debrisoquin hydroxylation phenotype and the acetylator phenotype as genetics risk factors for the occurrence of larynx and pharynx carcinoma. *Acta Pharmacol.Toxicol. (COPENH).*, 1986; Suppl.V: 221.

⁴²⁶. PHILIP PA, ROGERS HJ and HARPER PG: Acetylation and oxidation phenotypes in malignant lymphoma. *Cancer.-Chemother.Pharmacol.*, 1987; 20: 235-238.

⁴²⁷. PONTIN JE, HAMED H, FENTIMAN IS and IDLE JR: Cytochrome P-450db1 phenotypes in malignant breast disease. *Eur.J. Cancer*, 1990; 26: 790-792.

⁴²⁸. LADERO JM, BENÍTEZ J, JARA C et al: Polymorphic oxidation of debrisoquine in breast cancer patients. *Oncology*, 1991; 48: 107-110.

⁴²⁹. FONNE-PFISTER R, BARGETZI M and MEYER UA: MPTP, the neurotoxin inducing Parkinson's disease, is a potent competitive inhibitor of human and rat cytochrome P-450 isozymes (P-450 buf1, P-450 db1), catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation. *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 1987; 148: 1144-1150.

⁴³⁰. JIMÉNEZ FJ y LADERO JM: Modelo experimental de parkinsonismo por una neurotoxina: implicaciones en la clínica y en la etiología de la enfermedad de Parkinson. *Med.Clin.*, 1990; 94(15): 585-595.

⁴³¹. JIMÉNEZ FJ, TABERNERO C, MENA MA et al: Acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in a model of rat designated a poor metabolizer of debrisoquine. *J.Neurochem.*, 1991; 57(1): 81-87.

⁴³². BARBEAU A, CLOUTIER T, ROY M, PLASSE M, PARIS S and POIRIER J: Ecogenetics of Parkinson's disease: 4-hydroxylation of debrisoquine. *Lancet*, 1985; 2: 1213-1216.

⁴³³. BENÍTEZ J, LADERO JM, JIMÉNEZ FJ et al: Oxidative polymorphism of debrisoquine in Parkinson's disease. *J.Neurol.Neurosurg. Psych.*, 1990; 53: 289-292.

-
- ⁴³⁴. POIRIER J, ROY M, CAMPANELLA G, CLOUTIER T and PARIS S: Debrisoquine metabolism in parkinsonian patients treated with antihistamine drugs. *Lancet*, 1987; 2: 386.
- ⁴³⁵. GUDJONSSON O, SANZ E, ALVAN G, AQUILONIUS SM and REVIRIEGO J: The slower hydroxylation phenotypes of debrisoquine and S-mephenytoin are not over-represented in patients with Parkinson's disease. *Br.J.Clin. Pharmacol.*, 1990; 30: 301-302.
- ⁴³⁶. BAER AN, McALLISTER CB, WILKINSON GR, WOOSLEY RL and PINCUS T: Altered distribution of debrisoquine oxidation phenotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1986; 29: 843-850.
- ⁴³⁷. SEIDEMAN P and ALVAN G: Debrisoquine hydroxylation phenotype in SLE patients. *Scand.J.Rheumatol.*, 1989; 18: 63-64.
- ⁴³⁸. WOLFF S and PERRY P: Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma*, 1974; 48: 341-353.
- ⁴³⁹. HIRSCH B, McGUE M, and CERVENKA J: Characterization of the distribution of sister chromatid exchange frequencies :implications for research design. *Hum.Genet.*, 1984; 65: 280-286.
- ⁴⁴⁰. LAMBERTI L, BIGATTI P and AEDITO G: Cell kinetics and sister chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat.Res.*, 1983; 120: 193-199.
- ⁴⁴¹. COUNTRYMAN H: The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat.Res.*, 1976; 41: 321-332.
- ⁴⁴². TOTH KM, BERGER EM, BEEHLER CJ and REPINE JE: Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1986; 134: 281-284.

-
- ⁴⁴³. KAMPEN EJ y ZIJLSTRA WG: Técnica de la hemoglobina. *Advances Clin. Chem.*, 1965; 8: 141.
- ⁴⁴⁴. ELLMAN GL: Tissue sulphhydryl groups. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1959; 82:70-77.
- ⁴⁴⁵. VAN DOORN R, BORN PJA, LEIJDEKKERS CM, HENDERSON PT, REUVERS J and VAN BERGEN TL: Detection and identification of s-methylcysteine in urine of workers exposed to methylchloride. *Int.Arch. Occup.Environ.Health.*, 1980; 46: 99-109
- ⁴⁴⁶. AMES B, McCANN J and YAMASAKI E: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat.Res.*, 1975; 31: 347-364.
- ⁴⁴⁷. YUAN PM, RYAN DE, LEWIN W and SHIVELY JE: Identification and localization of amino acid substitution between two phenobarbital inducible rat hepatic microsomal cytochromes P-450 by microsequence analysis. *P.N.A.S.*, 1983; 80: 1169-1173.
- ⁴⁴⁸. LANGER PJ, SHANABRUCH WG and WALKER GC: Functional organization of plasmid pKM 101. *J.Bacteriol.*, 1981; 145: 1310-1316.
- ⁴⁴⁹. RAINIERI R, POILEY JA, ANDREWS AW, PIANTA RJ and LIPINSKY W: Greater effectiveness of hepatocyte and liver S9 preparations from hamster than rat preparations in activating N-nitroso compounds to metabolites mutagenic to Salmonella. *J.Natl.Cancer Instit.*, 1981; 67: 1117-1122.
- ⁴⁵⁰. NEISS JM, VAN GEMERT PJJ, ROELOFS HMJ, BOS RP and HENDERSON PTH: Mutagenicity of Benzidine and 4-amino biphenyl after metabolic activation with isolated hepatocytes and liver 9000 g. supernatant from rat, hamster and guinea pig. *Mutat.Res.*, 1984; 129: 13-18.
- ⁴⁵¹. NEISS JM, YAP SH, VAN GEMERT PJJ, ROELOFS HMJ, BOS RP and HENDERSON PTH: Activation of mutagens by hepatocytes and liver 9000 g. supernatant from human origin in the Salmonella Thyphimurium mutagenicity assay. Comparison with rat liver preparations. *Mutat.Res.*, 1986; 164: 41-51.

-
- ⁴⁵². LENNARD MS, SILAS JH, SMITH AJ and TUCKER GT: Determination of debrisoquine and its 4-hydroxy metabolite in biological fluids by gas chromatography with flame ionization and nitrogen-selective detection. *Journal of Chromatography*, 1977; 133: 161-166.
- ⁴⁵³. CARRASCO DE LA PEÑA JL: *El método estadístico en la investigación médica*. Ed. Karpos, Madrid, 1982.
- ⁴⁵⁴. DOLL R and PETO R: Causes of cancer. *Oxford University Press*, Oxford, 1981.
- ⁴⁵⁵. SCHMAHL D and KALDOR JM: Carcinogenicity of alkylating cytostatic drugs. *IARC Publications*, Lyon, 1986.
- ⁴⁵⁶. REIF AE: Heredity as a determining factor in which smokers die of lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1991; 83(1): 64.
- ⁴⁵⁷. OMENN GS: Future research directions in cancer ecogenetics. *Mutat.Res.*, 1991; 247: 283-291.
- ⁴⁵⁸. HEIN DW: Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim.Biophys.Acta*, 1988; 948: 37-66.
- ⁴⁵⁹. HANSEN MF and CAVENEE WK: Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res.*, 1987; 45: 5518-5527.
- ⁴⁶⁰. FORRESTER LM and WOLF CR: Genetic susceptibility to environmental insults. In: *The metabolic and molecular basis of acquired disease*. RD Cohen, B Lewis, MM Alberti and AM Denman (eds), Balliere Tindall, London, 1990; vol I, pp.3-18.
- ⁴⁶¹. WOLF CR: Metabolic factors in cáncer susceptibility. *Cancer Surveys*, 1990; 9(3): 437-474.
- ⁴⁶². SINUÉS B and SINUÉS E: Fármacos y mutagénesis. *Medicine*, 1987; 84: 491-500.

-
- ⁴⁶³. PAINTER RB: A replication model for sister chromatid exchange. *Mutat.Res.*, 1980; 70: 337-341.
- ⁴⁶⁴. TICE RR: Summary or general discussion. In: Tice RR and Hollaender A (eds.). *Sister chromatid exchanges*. Plenum Press. New York, 1984; pp 991-1000.
- ⁴⁶⁵. WULFF HC: Monitoring of genotoxic exposure of humans by the sister chromatid exchange test: Methodology and confounding factors. *Danish Med.Bull.*, 1990; 37(2): 132-143.
- ⁴⁶⁶. LAMBERT B and LINDBLAD A: Sister chromatid exchange and chromosome aberrations in lymphocytes of laboratory personnel. *J.Toxicol.EnvIRON.Health*, 1980; 6: 1237-1243.
- ⁴⁶⁷. STOLLEY PD, SOPER KA, GALLOWAY SM, et al.: Sister chromatid exchanges in association with occupational exposure to ethylene oxide. *Mutat.Res.*, 1984; 129: 98-102.
- ⁴⁶⁸. DOSAKA H, ABE S, SASAKI M, MIYAMOTO H and KAWAKAMI Y: Sister chromatid exchange induction by benzo(a)pyrene in cultured peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients and healthy individuals with or without familial history of neoplasms. *Int.J. Cancer*, 1987; 39: 329-332.
- ⁴⁶⁹. DOLL R and PETO R: Mortality in relation to smoking. *Brit.Med. J.*, 1976; 2: 1525-1536.
- ⁴⁷⁰. TOKUHATA GK and LILIENFELD AM: Familial aggregation of lung cancer in humans. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1963; 30: 289-312.
- ⁴⁷¹. MULVIHILL JJ: Clinical ecogenetics. Cancer in families. *N.Engl.J.Med.*, 1985; 312: 1569-1570.
- ⁴⁷². RAY JH and GERMAN J: Sister chromatid exchange in the chromosome breakage syndromes. In: Sandberg AA (ed.), *Sister chromatid exchange, progress and topics in cytogenetics*. AR Liss, New York, 1982; Vol. 2, pp.553-557.

-
473. COUNTRYMAN PI, HEDDLE JA and CRAWFORD E: The repair of X-ray-induced chromosomal damage in trisomy 21 and normal diploid lymphocytes. *Cancer.Res.*, 1977; 37: 52-58.
474. SUGIMOTO Y, HIGURASHI M, IIJIMA K, HIRAYAMA M and TANAKA F: Effects of Mitomycin C on the frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes cultured from patients with Down syndrome. *Proc.Jap.Acad.*, 1982; 58(Ser. B): 60-64.
475. PARSHAD R, SANFORD KK and JONES GM: Chromosomal radiosensitivity during the G₂ cell-cycle period of skin fibroblasts from individuals with familial cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci. (Wash.)*, 1985; 82: 5400-5403.
476. HSU TC, CHERRY LM and SAMAN NA: Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 1985; 17: 307-313.
477. HOPKIN JM and EVANS HJ: Cigarette smoke-induced DNA damage and lung cancer risks. *Nature*, 1980; 283: 388-390.
478. SARTO F, MUSTARI L, MAZZOTTI D, TOMANIN R and LEVIS AG: Variations of SCE frequencies in peripheral lymphocytes of ex-smokers. *Mutat.Res.*, 1987; 192: 157-162.
479. TUCKER JD, ASHWORTH LK, JOHNSTON GR, ALLEN NA and CARRANO AV: Variation in the human lymphocyte sister chromatid exchange frequency: results of a long-term longitudinal study. *Mutat.Res.*, 1988; 204: 435-444.
480. PAL K: The relationship between the levels of DNA-hydrocarbon adducts and the formation of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells treated with derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat.Res.*, 1984; 129: 365-372.
481. CARRANO AV: Sister chromatid exchange as an indicator of human exposure. In: BA Bridges, BE Butterworth and IB Weinstein (eds). *Banbury report 13: Indicators of genotoxic exposure*, Cold Spring Harbor, New York, 1982; pp 307-318.

-
- ⁴⁸². SINUÉS B, NÚÑEZ E, SINUÉS E and CONDE B: Sister chromatid exchanges micronuclei and chromosome aberrations in relation to smoking habit. *Acta Pharmacol.Ther.*, 1986; 59: 224 (Abstract).
- ⁴⁸³. IZQUIERDO M and SINUÉS B: Biomonitoring of genotoxicity induced by smoking. *Hereditas*, 1989; 111: 201-203.
- ⁴⁸⁴. LAMBERT B, LINDBLAD A, NORDENSKJOLD N and WERELIUS B: Increased frequency of sister chromatid exchange in cigarette smokers. *Hereditas*, 1978; 88: 147-149.
- ⁴⁸⁵. MURTHY PBK: Frequency of sister chromatid exchange in cigarette smokers. *Hum.Genet.*, 1979; 52: 343-345.
- ⁴⁸⁶. SORSA M, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, JÄRVETAUS H, KOSKIMIES K, SALO H and VAINIO H: Cytogenetic effects of tobacco smoke exposure among involuntary smokers. *Mutat.Res.*, 1989; 222: 111-116.
- ⁴⁸⁷. REUTERWALL C et al.: A Nordic database on somatic chromosome damage in humans. *Mutat.Res.*, 1990; 241: 325-337.
- ⁴⁸⁸. CROSSEN PE and MORGAN WF: Sister chromatid exchange in cigarette smokers. *Hum.Genet.*, 1980; 53: 425-426.
- ⁴⁸⁹. HEDNER K, HOGSTEDT B, KOLNIG AM, VENDEL ME, STROMBECK B and MITELMAN F: Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to smoking in 91 individuals. *Hereditas*, 1983; 98: 77-81.
- ⁴⁹⁰. BENDER MA, PRESTON RJ, LEONARD RC, PYATT BE and GOOCH PC: Chromosomal aberration and sister chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample, II. Extension of age range. *Mutat.Res.*, 1989; 212: 149-154.
- ⁴⁹¹. NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE: A nordic database on somatic chromosome damage in humans. *Mutat. Res.*, 1990; 241: 325-337.

-
- ⁴⁹². LAMBERTI LP, BIGATTI P and ARDITO G: Cell kinetics and sister chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat.Res.*, 1983; 120: 193-199.
- ⁴⁹³. LAZUTKA JR and DEDONYTE VV: Correlation between sister chromatid exchange frequency and proliferative kinetics in human lymphocytes: dependence on donor's sex. *Cytology (USSR)*, 1989; 31: 1206-1210.
- ⁴⁹⁴. MOORE P and STRAUSS BS: Sites of inhibition of in vitro DNA synthesis in carcinogen- and UV-treated oX174 DNA. *Nature*, 1979; 278: 664-666.
- ⁴⁹⁵. LAZUTKA JR: Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ.Mol.Mutagen.*, 1991; 17: 188-195.
- ⁴⁹⁶. PATRIANAKOS C and HOFFMAN D: Chemical studies of tobacco smoke. LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *J.Anal.Chem.*, 1979; 3: 150-154.
- ⁴⁹⁷. OBE G and HERHA J: Chromosomal aberrations in heavy smokers. *Hum.Genet.*, 1978; 41: 259-263.
- ⁴⁹⁸. EVANS HJ: Chromosomal mutations in human populations. *Citogenet.Cell.Genet.*, 1982; 33: 48-56.
- ⁴⁹⁹. TAWN EJ and CARTMELL CL: The effect of smoking on the frequencies of asymmetrical and symmetrical chromosome exchanges in human lymphocytes. *Mutat.Res.*, 1989; 224: 151-156.
- ⁵⁰⁰. BENDER MA, PRESTON RJ, LEONARD RC, PYATT BE, GOOCH PC and 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.
- ⁵⁰¹. JOHANSSON M and ÖRNDAL C: No difference between smoking lung cancer patients and smoking controls in the frequency of spontaneous and mitomycin C induced chromosome

aberrations in lymphocytes. *Hereditas*, 1989; 111: 61-63.

502. HEIM S, GREFF JS, KOLNIG AM and STRÖMBECK B: Increased levels of spontaneous and mutagen induced chromosome aberrations in skin fibroblasts from patients with adenomatosis of the colon and rectum. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 1985; 17: 333-346.

503. GERMAN J: Patterns of neoplasia associated with the chromosome-breakage syndromes. In: German J (ed.). *Chromosome mutations and neoplasia*. Alan R.Liss, New York, 1983; pp. 97-134.

504. KNUDSON AG: Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.*, 1985; 45: 1437-1443.

505. HEIM S and MITELMAN F: Cancer cytogenetics. Alan R. Liss (ed). New York, 1987.

506. THE NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE: An inter-Nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. *Cancer Genet. Citogenet.*, 1990; 45: 85-92.

507. BROGGER A, NORUM R, HANSTEEN IL, CLAUSEN KO, SKARDAL K, MITELMAN F, KOLING AM, STROMBECK B, NORDENSON I, ANDERSON G, JACOBSSON K, PRAKKANEN JM, NORPPA H, JARVENTANS H and SORSA M. Comparison between five Nordic laboratories on scoring of human lymphocyte chromosome aberrations. *Hereditas*, 1984; 100: 209-218.

508. GEBHART E: Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum.Genet.*, 1981; 58: 235-254.

509. SNOPE AJ and RARY JM: Cell-cycle duration and sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. *Mutat.Res.*, 1979; 63: 345-349.

510. HEDDLE JA and CARRANO AV: The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma irradiation evidence that micronuclei arise from acentric

chromosomal fragments. *Mutat. Res.*, 1977; 44: 63-69.

⁵¹¹. SCHMID W: The micronucleus test. *Mutat.Res.*, 1975; 21: 9-15.

⁵¹². AU WW, WALKER DM, WARD Jr JB, WHORTON E, LEGATOR MS and SINGH V: Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes to cigarette smokers. *Mutat.Res.*, 1991; 260: 137-144.

⁵¹³. HÖGSTEDT B, GULLEBERG B, HEDNER K, KOLNING AM, MITELMAN F, SKERFVING S and WIDEGREN B: Chromosome aberrations and micronuclei in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes in humans exposed to ethylene oxide. *Hereditas*, 1983; 98: 105-113.

⁵¹⁴. STENSTRAND K: Effects of ionizing radiation on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei in lymphocytes of smokers and non smokers. *Hereditas*, 1985; 102: 71-76.

⁵¹⁵. SUDHARSAN RAJ A and HEDDLE JA: Simultaneous detection of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. Experience with DNA-intercalating agents. *Mutat.Res.*, 1980; 78: 253-260.

⁵¹⁶. HEDDLE JA: A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat.Res.*, 1973; 18: 187.

⁵¹⁷. YAGER JW, SORSA M and SELVIN S: Micronuclei in cytoquinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. In: Bartsch H, Hemminki K and O'Neill IK (eds.). *Methods for detecting DNA damaging agents in humans: Application in cancer epidemiology and prevention*, IARC Scientific Publications No. 89, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1988; pp.213-216.

⁵¹⁸. KLIESCHU U, PONPOVA I and ADLER ID: Induction of chromosome damage in mouse bone-marrow by benzo(a)pyrene. FRG, 1982.

-
519. TOTH KM, BERGER EM, BEEHLER CJ and REPINE JE: Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from non smokers. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1986; 134: 281-284.
520. SINUÉS B, RUEDA P, SÁENZ MA, BERNAL ML y ALCALÁ A: Glutación eritrocitario y tioéteres urinarios en fumadores. *Med.Clin.*, 1990; 95: 725-727.
521. LAUTERBERG BH, SMITH CV, HUGHES H and MITCHELL JR: Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response to oxidative stress. *J.Clin.Invest.*, 1984; 73: 124-133.
522. CRAPO JD, SJOSTRON K and DREW RT: Tolerance and cross tolerance using NO₂ and O₂. I. Toxicology and biochemistry. *J.Appl.Physiol.*, 1978; 44: 364-369.
523. WHITE CW and REPINE JE: Pulmonary antioxidant defense mechanisms: A mini review. *Exp.Lung Res.*, 1985; 8: 81-96.
524. FRANK L: Effects of oxygen on the newborn. *Fed.Proc.*, 1985; 44: 2328-2334.
525. BEEHLER CJ, BERGER EM, DRAKE SK, TOTH KM, WHITE CW and REPINE JE: Erythrocyte (RBC) glutathione (GSH) levels, but not catalase (CAT) or glutathione peroxidase (GPX) activities, increase in rats exposed to hyperoxia for 48 hours (Abstract). *Clin.Res.*, 1986; 34: 410A.
526. JANOFF A: Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 1985; 132: 417-433.
527. NOVI AL: Regression of aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinomas by reduced glutathione. *Science*, 1981; 212: 541-542.
528. HEINONEN T, KYTONIENI V, SORSA M and VAINIO H: Urinary excretion of thioethers among low-tar and medium-tar cigarette smokers. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 1983; 52:

11-16.

529. VAINIO H, SAVOLAINEN H and KILPIKARI I: Urinary thioether of employees of a chemical plant. *Br.J.Ind.Med.*, 1978; 35: 232-234.

530. VAN DOORN R, LEIJDEKKERS CN, NOSSENT SM and HENDERSON PT: Excretion of TTCA in human urine after administration of disulfiram. *Toxicol.Lett.*, 1982; 12: 77-92.

531. LAFUENTE A and MALLOL J: Urinary thioethers in low-tar cigarette smokers. *Public.Health*, 1986; 100: 392-398.

532. SINUES B, IZQUIERDO M and PÉREZ-VIGUERA J: Chromosome aberrations and urinary thioethers in smokers. *Mutat.Res.*, 1990; 240: 289-293.

533. KROESE ED, ZEILMAKER MJ, MOHN GR and MEERMAN JHN: Preventive action of thioethers towards in vitro DNA binding and mutagenesis in E.Coli K12 by alkylating agents. *Mutat.Res.*, 1990; 245: 67-74.

534. SEIDEGARD J and PERO RW: The hereditary transmission of high glutathione transferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes. *Hum.Genet.*, 1985; 69: 66-68.

535. AWASTHI YC, SINGH SV, AHMAD H, et al.: Expression of glutathione S-transferase isoenzymes in human small cell lung cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 1988; 9(1): 89-93.

536. MOLDEUS P, JONES DP, ORMSTADT K and ORRENIUS S: Formation and metabolism of a glutathione-S-conjugated in isolated rat liver and kidney cells. *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, 1987; 83: 195-200.

537. KRIEBEL D, HENRY J, GOLD JC, BRONSON A and COMMONER B: The mutagenicity of cigarette smokers urine. *J.Env.Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1985; 6(2): 157-170.

538. KADO NY, MANSON C, EISENSTADT E and HSIEM DPH: The

kinetics of mutagen excretion in the urine of cigarette smokers. *Mutat. Res.*, 1985; 157: 227-233.

⁵³⁹. VINEIS P, CAPORASO N, TANNENBAUM SR, SKIPPER PL et al.: Acetylation phenotype, carcinogen-hemoglobin adducts and cigarette smoking. *Cancer Res.*, 1990; 50: 3002-3004.

⁵⁴⁰. KAWANO H, INAHASU T, ISHIZAWA M, ISHINISHI N and KUHAZAWA J: Mutagenicity of urine from young male smokers and non smokers. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*, 1978; 59(1): 1-9.

⁵⁴¹. SINUES B, PEREZ J, BERNAL ML, SAENZ MA, LANUZA J and BARTOLOME M: Urinary mutagenicity and N-acetylation phenotype in textile industry workers exposed to arylamines. *Cancer Res.*, 1992; 52: 1-5.

⁵⁴². VAN DOORN R, BOS RP, LEIJDEKKERS ChM, WAGENAAS-ZEGERS MAP, THEUWS JLG and HENDERSON PT: Thioether concentration and mutagenicity of urine from cigarette smokers. *Int.Arch.Occup. Environ.Health*, 1979; 43: 159-166.

⁵⁴³. MALAVEILLE C, VINEIS P, ESTEVE J, OHSHIMA H, et al.: Levels of mutagens in the urine of smokers of black and blonde tobacco correlate with their risk of bladder cancer. *Carcinogenesis*, 1989; 10: 577-586.

⁵⁴⁴. PHILLIPSON CE, IOANNIDES C and PARKE DW: Metabolic activation of dimethylnitrosamine to mutagens: role of cytochromes P-450 and P-448. *Toxicol.Lett.*, 1982; 11: 95-101.

⁵⁴⁵. STEELE CM and IOANNIDES C: Induction of rat hepatic mixed function oxidases by aromatic amines and its relationship to their bioactivation to mutagens. *Mutat.Res.*, 1986; 162: 41-46.

⁵⁴⁶. BARTSCH H, CAPORASO N, CODA M, KADLUBAR F, MALAVEILLE C, SKIPPER P, TALASKA G, TANNENBAUM SR and VINEIS P: Carcinogen hemoglobin adducts, urinary mutagenicity and metabolic phenotype in active and pasive cigarette smokers. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1990; 82: 1826-1831.

-
547. McQUEEN EG: Pharmacological basis of adverse drug reactions. In: *Drug Treatment*, Avery GS (Ed.), Sydney, ADISS Press, 1980; 202-235.
548. MOMMSEN S, and AAGAARD J: Tobacco as a risk factor in bladder cancer. *Carcinogenesis*, 1983; 4: 335-338.
549. ISOCOVICH J, CASTELLETO R, ESTEVE J, MUÑOZ N, COLANZI R, CORONEL A, DEMAZOLA I, TASSI V and ARSLAN S: Tobacco smoking, occupational exposure, and bladder cancer in Argentina. *Int.J. Cancer*, 1987; 40: 734-740.
550. BARTSCH H, CODA M, TALASKA G and KADLUBAR F: Acetylation phenotype, carcinogen-hemoglobin adducts and cigarette smoking. *Cancer Res.*, 1990; 50: 3002-3004.
551. LADERO JM, JARA C, BENITEZ J, FERNANDEZ MJ, VARGAS E, MUÑOZ JJ, LLERENA A, COBALEDA J and PEREZ-MANGA G: Polimorfismo acetilador en el cáncer de pulmón. *An.Med.Intern.* (Madrid), 1991; 8(2): 66-68.
552. BENITEZ J, COBALEDA J, LOZANO L, ELENA A, CERMENO JA and MARIN J: Debrisoquine oxidation phenotype in a Spanish population. *Acta Pharmacol.Toxicol.*, (COPENH.), 1986; Suppl. V: 216.
553. CAPORASSO N, PICKLE LW, BALE S, AYESH R, HETZEL M and IDLE J: The distribution of the debrisoquine metabolic phenotypes and implications for the suggested association with lung cancer risk. *Genet.Epid.*, 1989; 6: 517-524.
554. HENTHORN TK, BENITEZ J, AVRAM MJ, MARTINEZ C, LLERENA A, COVALEDA J, KRESECIE TC and GIBBONS RD. Assesment of the debrisoquin and dextromethorphan phenotyping test by gaussian mixture distributions analysis. *Clin.Pharmacol. Ther.*, 1989; 45: 328-333.
555. JACKSON PR, TUCKER GT and WOODS HF: Testing for bimodality in frequency distributions of data suggesting polymorphisms of drug metabolism-histograms and probit plots. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1989; 28: 647-654.

-
- ⁵⁵⁶. LAW MR, HETZEL MR and IDLE JR: Debrisoquine metabolism and genetic predisposition to lung cancer. *Br.J.Cancer*, 1989; 59: 686-687.
- ⁵⁵⁷. DUCHE JC, JOANNE C, BARRE J, DE CREMOUX H et al.: Lack of relationship between the polymorphism of debrisoquine oxidation and lung cancer. *Br.J.Clin.Pharmac.*, 1991; 31: 533-536.
- ⁵⁵⁸. HORMANS Y, DESAGER JP and HARVENGT C: Is there a link between debrisoquine oxidation phenotype and lung cancer susceptibility ? *Biomed.Pharmacother.*, 1991; 45: 359-362.
- ⁵⁵⁹. SPEIRS CJ, MURRAY S, DAVIES DS, BIOLA AF and BOOBIS AR: Desbrisoquine oxidation phenotype and susceptibility to lung cancer. *Br.J.Clin.Pharmac.*, 1990; 29: 101-109.
- ⁵⁶⁰. HARMER D, EVANS DAP, EZE LC et al.: The relationship between the acetylator and the sparteine hydroxylation polymorphisms. *J. Med.Genet.*, 1986; 23: 155-156.
- ⁵⁶¹. SELLERS TA, ELSTON RC, ATWOOD LD and ROTHSCHILD H: Lung cancer histologic type and family history of cancer. *Cancer*, 1992; 69: 86-91.
- ⁵⁶². CELIKOGLU S, AYKAN TB, KARAYEL T, DEMIRCI S and GOKSEL FM: Frequency of distribution according to histological types of lung cancer in the tracheobronchial tree. *Respiration*, 1986; 49: 152-156.
- ⁵⁶³. BOSCH FX and CARDIS E: Black tobacco and cancer: introducing an epidemiological review. *Eur.J.Cancer*, 1991; 27(11): 1345-1348.
- ⁵⁶⁴. JOLY OG, LUBIN JH and CARABALLOSO M: Dark tobacco and lung cancer in Cuba. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1983; 70: 1033-1039.
- ⁵⁶⁵. BENHAMOU S, BENHAMOU E TIMARCHE M and FLAMAND R: Lung cancer and use of cigarette: a French case-control study. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1987; 74: 1169-1175.

⁵⁶⁶. TUYNS AJ and ESTEVE J: Pipe, commercial and hand rolled cigarettes smoking in oesophageal cancer. *Int.J.Epidemiol.*, 1983; 12: 110-113.

⁵⁶⁷. McGEOCH C, MORGAN ET, HALPERT J et al.: Purification, characterization and pituitary regulation of the sex specific cytochrome P450 15 β -hydroxylase from liver microsome of untreated female rats. *J.Biol.Chem.*, 1984; 259: 15433-15439.

⁵⁶⁸. JARA C: Polimorfismos enzimáticos en cáncer de pulmón. Tesis doctoral, 1990.