



**Universidad  
de Valparaíso**  
CHILE



**Universidad de Valparaíso**

**Carrera de Tecnología Médica**

**“Correlación entre el recuento de micronúcleos y cantidad de cigarros consumidos por fumadores jóvenes de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe.”**

**Seminario de Grado  
presentado en conformidad a los requisitos para obtener  
el Grado Académico de  
“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y  
Citodiagnóstico”**

**Autor:**

Víctor Castro Catalán

**Profesor Guía:**

TM Víctor Soto Ahumada.

**Profesor Co-Guía:**

TM Laura Ochoa Martínez.

2011

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primera instancia agradecer a mis padres, por sus enseñanzas y sus sacrificios, por todo lo que hicieron para que pudiese llegar hasta aquí.

A mis profesores, quienes me han entregado todo sus conocimientos durante estos años de formación.

A mi Profesor Guía TM Víctor Soto Ahumada, por el apoyo, el ánimo, y principalmente por creer en esta investigación.

A mi Profesora Co-Guía y supervisora de Práctica Profesional TM Laura Ochoa Martínez, por su confianza, apoyo y sus consejos, por las conversaciones que redirigieron tantas veces el desarrollo de este trabajo.

A todos los profesionales del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Militar, a los Médico-Patólogos Dra. Jeannie Slater y al Dr. Arturo Escalona. A los TM que allí trabajan y que fueron un gran aporte en mi formación profesional y personal: TM Carmen Ferone, TM Arturo Galleguillos y especialmente a la TM Alejandra Salas, por escucharme, las conversaciones, los “tirones de orejas”, por devolverme al camino cada vez que me desviaba.

Agradecer a todas aquellas personas que estuvieron conmigo, especialmente a los que aún siguen a mi lado. Gracias por el apoyo incondicional que me han brindado durante todos estos años, por estar en las buenas y en las malas, por creer en mí.

A mis queridos Morfocitos: Camila, Daniela y Saúl.

Finalmente, agradecer a todos aquellos que donaron una muestra desinteresadamente para el desarrollo de esta investigación.

Sinceramente, Muchas Gracias.

*A mis padres, impulsores de mi afán de superación.*

*A mis hermanos, mis principales motivaciones.*

*A mi abuelo, sé que estaría orgulloso de mí.*

*Víctor.*

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,  
sino como una oportunidad para penetrar en el bello  
y maravilloso mundo del saber.”*

*A. Einstein.*

## RESUMEN.

El consumo de cigarrillos es un problema de Salud Pública desde hace varios años siendo una de las causas principales del desarrollo de diversas patologías, especialmente de cáncer. Varios componentes del humo del cigarrillo son agentes iniciadores de los procesos carcinogénicos dentro de las células, formando aductos (uniones covalentes entre el agente químico y el ADN) y posteriormente formando micronúcleos.

Con este estudio se buscó determinar la correlación entre el recuento de micronúcleos y el consumo de cigarrillos por fumadores jóvenes de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe.

Se estudiaron 114 extendidos de mucosa bucal, 42 de estudiantes fumadores y 72 de estudiantes no fumadores. Las edades de ambos grupos oscilaron entre los 18 y 30 años. Se aplicó una encuesta sobre el hábito tabáquico para constituir los grupos a estudiar, registrándose la cantidad de cigarrillos consumidos por cada individuo. Se realizó el recuento de micronúcleos en extendidos citológicos de mucosa bucal teñidos con el Método de Feulgen utilizando un microscopio óptico con un aumento de 40x, registrándose la cantidad de micronúcleos presentes en cada extendido.

Se determinó que existe una correlación positiva entre el recuento de micronúcleos y el consumo de cigarrillos, pero que existen otras variables que pueden modificar el recuento de micronúcleos.

**PALABRAS CLAVE:** *Tabaquismo, aductos, carcinogénesis, micronúcleos.*

## **ABSTRACT.**

The cigarettes consuming is a public health problem since several years being one of the main causes of development of various pathologies, especially cancer. Various components of cigarette smoke are initiators of carcinogenic processes within cells, forming adducts (covalent bonds between the chemical agent and DNA) and then forming micronucleus.

This study sought to determine the correlation between micronucleus counts and cigarettes consumed by young smokers of Medical Technology career at the University of Valparaiso, Campus San Felipe.

Were studied 114 oral mucosa smear, 42 smokers and 72 non-smoking students. The ages of both groups ranged between 18 and 30 years old. It was applied a survey on smoking to form the groups to study, recording the number of cigarettes consumed by each individual. It was done a count of the cytological micronucleus of buccal mucosa stained with Feulgen Method using a light microscope with 40x magnification, recording the number of micronucleus that appeared in each smear.

It was determined that there is a positive correlation between micronucleus counts and consumption of cigarettes, but there are other variables that may affect the recount of micronucleus.

**KEY WORDS:** *Smoking, adducts, carcinogenesis, micronuclei.*

## INDICE DE CONTENIDOS.

<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.</b>	<b>01</b>
1.1. Tabaquismo.	01
1.1.1. Tabaco.	01
1.1.2. Componentes del humo del cigarro.	02
1.2. Carcinogénesis.	04
1.2.1. Etapa de Iniciación.	05
1.2.2. Etapa de Promoción.	05
1.2.3. Etapa de Progresión.	05
1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).	06
1.3.1. Biotransformación de los HAPs.	09
1.3.2. Los HAPs y sus nitroderivados.	10
1.4. Histología y Citología de la cavidad bucal.	12
1.4.1. Criterios Citológicos.	13
1.4.1.1. Células basales.	13
1.4.1.2. Células normales diferenciadas.	13
1.4.1.3. Células micronucleadas.	14
1.4.1.4. Células binucleadas.	14
1.4.1.5. Células con cromatina condensada.	14
1.4.1.6. Células picnóticas.	15
1.4.1.7. Células cariorréxicas.	15
1.5. Micronúcleos.	16
1.5.1. Micronúcleos originados de cromosomas acéntricos o fragmentos de cromosomas.	17
1.5.2. Micronúcleos originados de cromosomas enteros.	18
1.6. Método de Feulgen.	20
1.6.1. El ADN.	20
1.6.2. El reactivo de Schiff.	21
1.6.3. Fundamento del método de Feulgen.	22

<b>CAPITULO 2: OBJETIVOS.</b>	<b>24</b>
2.1. Objetivo General.	24
2.2. Objetivos Específicos.	24
<b>CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS.</b>	<b>25</b>
3.1. Variables consideradas.	25
3.2. Diseño muestral.	25
3.3. Características de la población a estudiar.	26
3.4. Metodología experimental.	27
3.4.1. Procesamiento de muestras.	27
3.4.2. Recuento de Micronúcleos.	27
3.4.3. Análisis Estadístico.	28
3.4.3.1. Test de Normalidad de Kolmogorov – Smirnov.	28
3.4.3.2. Coeficiente de Correlación de Pearson.	29
3.4.3.3. Test T-Student para muestras independientes.	29
3.5. Materiales.	30
3.5.1. Equipos y Softwares.	30
3.5.2. Material de Laboratorio.	30
3.5.3. Reactivos.	31

<b>CAPITULO 4: RESULTADOS.</b>	<b>32</b>
4.1. Datos demográficos y sobre el consumo de cigarros.	32
4.2. Recuento de Micronúcleos.	36
4.3. Análisis Estadístico.	39
4.3.1. Test de Normalidad de Kolmogorov – Smirnov.	39
4.3.2. Coeficiente de Correlación de Pearson.	41
4.3.3. Test T-Student para muestras independientes.	43
<b>CAPITULO 5: DISCUSIÓN.</b>	<b>44</b>
<b>CAPITULO 6: CONCLUSIONES.</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>48</b>
<b>APENDICES.</b>	<b>52</b>
Apéndice 1: Cálculo de muestra poblacional.	52
Apéndice 2: Entrevista.	53
Apéndice 3: Consentimiento informado.	54
Apéndice 4: Protocolo de tinción y preparación de soluciones.	55

**INDICE DE FIGURAS.**

FIGURA 1.1. Nicotiana Tabacum.	02
FIGURA 1.2. Molécula de Naftaleno y Benzopireno.	07
FIGURA 1.3. Metabolismo del benzo(a)pireno en humanos.	09
FIGURA 1.4. Activación metabólica del 1-nitropireno y formación de aductos con ADN y hemoglobina.	11
FIGURA 1.5. Secuencia temporal de los diversos tipos celulares en la mucosa bucal.	12
FIGURA 1.6. Célula Basal (A) y Célula normal diferenciada (B).	13
FIGURA 1.7. Célula micronucleada (A) y Célula binucleada (B).	14
FIGURA 1.8. Célula con cromatina condensada (A) y Célula picnótica (B).	15
FIGURA 1.9. Célula cariorrética.	15
FIGURA 1.10. Esquema de la formación de Micronúcleos.	19
FIGURA 1.11. Esquema general del ADN.	20
FIGURA 1.12. Estructura del ADN.	20
FIGURA 1.13 Formación del Leucoderivado.	21
FIGURA 1.14. Mecanismo de hidrólisis ácida.	22
FIGURA 4.1. Distribución de la muestra.	32
FIGURA 4.2. Distribución del Grupo Estudio según sexo.	34
FIGURA 4.3. Distribución del Grupo Control según sexo.	36

**INDICE DE TABLAS.**

TABLA 1.1. Componentes del cigarrillo.	03
TABLA 1.2. Efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAPs.	08
TABLA 1.3. Eventos moleculares asociados a los Micronúcleos.	19
TABLA 4.1. Características del Grupo Estudio.	33
TABLA 4.2. Características del Grupo Control.	35
TABLA 4.3. Estadísticos descriptivos del Grupo Estudio.	36
TABLA 4.4. Estadísticos descriptivos del Grupo Control.	37
TABLA 4.5. Recuento de Micronúcleos en Grupo Estudio.	37
TABLA 4.6. Recuento de Micronúcleos en Grupo Control.	38
TABLA 4.7. Resultados Test de Kolmogorov-Smirnov para consumo de cigarrillos (Cig) y recuento de micronúcleos (MN) en Grupo Estudio.	39
TABLA 4.8. Resultados Test de Kolmogorov-Smirnov para consumo de cigarrillos (Cig) y recuento de micronúcleos (MN) en Grupo Control.	40
TABLA 4.9. Correlaciones en Grupo Estudio.	41
TABLA 4.10. Correlaciones en Grupo Control.	42
TABLA 4.11. Test T-Student para micronúcleos en Grupo Control y Estudio.	43

## **CAPITULO 1. Introducción.**

### **1.1. Tabaquismo.**

El tabaquismo es un problema de larga data y complejidad en Salud Pública, debido a que es causa de alrededor de cinco millones de muertes en todo el mundo (9) y de aproximadamente quince mil chilenos al año (8). Según estadísticas entregadas por el Instituto de Salud Pública del Ministerio de Salud, en Chile, cuatro millones setecientos setenta y nueve mil seiscientas cincuenta y tres personas fuman en promedio ocho cigarrillos diarios. Tal cantidad, define el concepto de Tabaquismo.

El problema cobra mayor relevancia ya que la edad en que se inicia el hábito tabáquico está siendo cada vez menor y esto, está en directa relación con el daño que éste provoca. Estadísticas reportan que cerca del 25% de los jóvenes menores de quince años se reconocen como fumadores y también lo son alrededor del 40% de los estudiantes de carreras del área Salud. (7)

El humo del cigarrillo es una fuente de productos tóxicos, constituyéndose en un factor de riesgo para una gran cantidad de patologías, como las cardiovasculares y respiratorias, además de ser causa directa de muerte debida a cáncer de pulmón (2), como de otros tipos de cáncer, a saber, el de labios, boca, laringe y faringe. (3)(4)

A continuación se describen las principales características del tabaco, así como los componentes del humo producto de su combustión.

#### **1.1.1. Tabaco.**

La planta del tabaco es una herbácea perenne perteneciente a la familia de las solanáceas, se han identificado sesenta y cinco especies diferentes, siendo la *Nicotiana Tabacum* la más utilizada para producir tabaco de forma comercial. Es una herbácea de altura variable y de cosecha anual.



*Fig. 1.1. Nicotiana Tabacum*

### **1.1.2. Componentes del humo del cigarro.**

El humo del cigarro es un aerosol dinámico altamente complejo suspendido en una mezcla de vapor orgánico de igual complejidad. Más de cinco mil constituyentes han sido identificados del humo del cigarro y alrededor de ciento cincuenta son tóxicos con actividad biológica. En los últimos veinte años investigadores y organizaciones de salud pública han establecido una lista de constituyentes, dividiéndolos en grupos. (11)

Estos constituyentes se detallan en la Tabla 1.1.

TABLA 1.1. Componentes del cigarrillo.

GRUPO	ANALITO	CANTIDAD APROXIMADA.
<b>AMINAS AROMATICAS</b>	1-Aminonaftaleno	15.1 ng/cig.
	2-Aminonaftaleno	10.3 ng/cig.
	3-Aminobifenil	3 ng/cig.
	4-Aminobifenil	1.7 ng/cig.
<b>CARBONILOS</b>	Metiletilcetona	62.72 µg/cig.
	Acetaldehido	560.48 µg/cig.
	Acetona	264.74 µg/cig.
	Acroleina	58.77 µg/cig.
	Butiraldehido	29.58 µg/cig.
	Crotonaldehido	16.18 µg/cig.
	Formaldehido	21.61 µg/cig.
	Propionaldehido	43.92 µg/cig.
<b>FENOLES</b>	Catecol	37.9 µg/cig.
	Hidroquinona	32.4 µg/cig.
	m+p-Cresol	5.84 µg/cig.
	o-Cresol	1.89 µg/cig.
	Fenol	7.32 µg/cig.
	Resorcinol	0.91 µg/cig.
<b>HAP</b>	Benzo[a]pireno	7 ng/cig.
<b>INORGANICOS</b>	Amoniacó	11.02 µg/cig.
	Ácido cianhídrico	109.2 µg/cig.
	Óxido Nítrico	223.41 µg/cig.
	Monóxido de Carbono	11.96 mg/cig.
<b>ORGANICOS</b>	Acilonitrilo	8.28 µg/cig.
<b>HIDROCARBUROS VOLÁTILES</b>	1,3-Butadieno	29.94 µg/cig.
	Benzeno	43.39 µg/cig.

	Isopreno	297.68 µg/cig.
	Tolueno	64.91 µg/cig.
	Estireno	5.11 µg/cig.
<b>NITROGENADOS HETEROCÍCLICOS</b>	Piridina	7.02 µg/cig.
	Quinolina	0.23 µg/cig.
	Nicotina	0.75 mg/cig.
<b>METALES Y METALOIDES</b>	Arsénico	10.4 ng/cig.
	Cadmio	47.8 ng/cig.
	Cromo	73 ng/cig.
	Plomo	33 ng/cig.
	Mercurio	3.82 ng/cig.
	Níquel	5.12 ng/cig.
	Selenio	34.9 ng/cig.
<b>NITROSAMINAS ESPECIFICAS DEL TABACO (TSNAs)</b>	N-Nitrosoanabasina	16.3 ng/cig.
	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona	115.6 ng/cig.
	N-Nitrosonornicotina	133.1 ng/cig.
	Material particulado seco libre de Nicotina	8.91 mg/cig.
<i>Ng/cig: nanogramos por cigarrillo.</i>		
<i>Mg/cig: miligramos por cigarrillo.</i>		

Fuente: Analytical Smoke Chemistry, Research&Development at British American Tobacco.

## 1.2. Carcinogénesis.

El proceso de carcinogénesis consta de tres fases principales (13), a saber:

1.2.1. Etapa de Iniciación,

1.2.2. Etapa de Promoción

1.2.3. Etapa de Progresión.

### **1.2.1. Etapa de Iniciación.**

En la etapa de iniciación se produce una alteración inicial en el genoma de las células. Cualquier alteración durante el metabolismo, la reparación de ADN o la proliferación, pueden iniciar el proceso de carcinogénesis. Los agentes químicos implicados en la alteración de estos tres procesos se denominan agentes iniciadores. Estos agentes actúan de diferentes maneras, siendo lo más común la formación de aductos, o uniones covalentes entre el ADN y los agentes químicos, provocando cambios estructurales y conformacionales del material genético.

### **1.2.2. Etapa de Promoción.**

Durante la etapa de promoción, primordialmente se afecta la transducción de señales celulares, alterando la expresión de ciertos genes a través de receptores específicos. Se define como promotor a algún compuesto químico capaz de provocar la expansión de las células iniciadas.

### **1.2.3. Etapa de Progresión.**

Un agente progresor es un compuesto químico capaz de convertir una célula iniciada o en promoción, en una célula potencialmente maligna. En la etapa de progresión, es posible notar los daños, traducidos en inestabilidades cariotípicas.

Algunos carcinógenos se caracterizan por su capacidad de alterar la estructura del ADN de tres maneras principales: mutaciones, formación de aductos y aberraciones cromosómicas. La acción de estos agentes es aumentar el potencial oxidativo de las células lo que resulta en modificaciones del ADN o formación de uniones covalentes de los agentes o sus metabolitos a las cadenas de ADN.

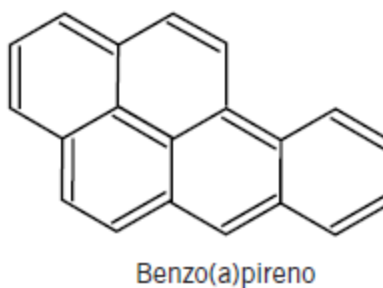
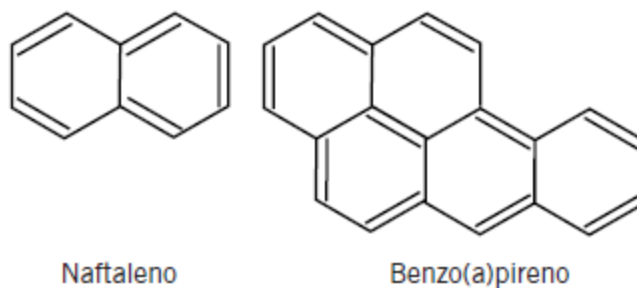
En la acción de este tipo de sustancias juega un papel fundamental el metabolismo celular, a través del cual se produce la biotransformación de sustancias en un principio inocuas o compuestos (generalmente reactivos) que presentan capacidad genotóxica. Sin embargo, la acción de estos agentes se debe acompañar de un desbalance en los mecanismos de reparación de ADN. (13)

Algunos de los agentes involucrados en el proceso de la carcinogénesis son los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), de los cuales se hace referencia a continuación.

### **1.3 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.**

La capacidad carcinogénica de los compuestos del tabaco depende fundamentalmente de la activación de los compuestos neutros de la fase particulada del humo del cigarrillo, los más importantes son los Hidrocarburos aromáticos policíclicos, donde encontramos al a-Benzopireno, y los dibenzoantracenos. Estas moléculas o algunos de sus metabolitos pueden formar uniones covalentes con el material genético, y por tanto, generar inestabilidad genética. Una forma de evaluar el riesgo de presentar dicha inestabilidad, es a través del incremento de la formación de micronúcleos en la célula. (1,14)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos condensados. La molécula más simple es el naftaleno, cuyo esquema se presenta más abajo.



*FIGURA 1.2. Molécula de Naftaleno y Benzo(a)pireno.*

El Benzo[a]pireno es uno de los HAPs que posee la capacidad de desarrollar efectos carcinogénicos, genotóxicos y/o mutagénicos. Se ha descrito como un carcinógeno débil, pero algunos de sus derivados lo son aún más como los 6-, 7-, 8- y 12-metilbenzo[a]antraceno y algunos de sus derivados dimetilados.

No todos los HAPs poseen efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutágenos y muchas veces el efecto, de haberlo, éste se atribuye a la presencia de más de un compuesto de la familia o de alguno de sus nitroderivados.

En la siguiente tabla se hacen referencia los efectos biológicos para alguno de estos compuestos.

*TABLA 1.2. Efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAPs.*

HAPs	Carcinogenicidad	Genotoxicidad	Mutagenicidad
<b>Fenantreno</b>	I	L	+
<b>Antraceno</b>	N	N	-
<b>Pireno</b>	N	L	+
<b>Benzofluorenos</b>	I	I	?
<b>Benzo(a)antraceno</b>	S	S	+
<b>Benzo(e)pireno</b>	I	L	+
<b>Benzo(a)pireno</b>	S	S	+
<b>Dibenz(a)antraceno</b>	S	S	+
<b>Benzo(ghi)perileno</b>	I	I	+
<b>Dibenzopirenos</b>	S	I	+
<b>2-Nitronaftaleno</b>	N	L	-
<b>1-Nitropireno</b>	I	S	+

(S: suficiente; I: insuficiente; N: no cancerígeno; L: limitados.)  
 Mutagenicidad (Test de Ames): + (positivo); - (negativo); ?: (inconcluso).

*Fuente: Analytical Smoke Chemistry, Research&Development at British American Tobacco.*

Actualmente se ha admitido que estas moléculas son previamente activadas en el organismo antes de ejercer su efecto como cancerígeno. También se ha propuesto que el efecto de estas sustancias considera las siguientes etapas: (15,16)

- a. Exposición.
- b. Activación metabólica.
- c. Formación de aductos entre HAPs y ADN.
- d. Mutación de genes críticos (como el p53).
- e. Sucesión de mutaciones en otros genes.

### 1.3.1. Biotransformación de los HAPs.

La biotransformación involucra una serie de enzimas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis y de enzimas que catalizan reacciones de conjugación. Estos sistemas enzimáticos están distribuidos en todos los tejidos del organismo.

Las enzimas responsables de la activación metabólica de los HAPs, incluyendo al benzo(a)pireno, son las CYP1A1, CYP1B1 y la CYP1A2 en conjunto con la epoxidohidrolasa. Estas enzimas se encuentran en el citocromo P450, una proteína asociada a membrana, presente en la membrana interna de las mitocondrias o en el retículo endoplásmico.

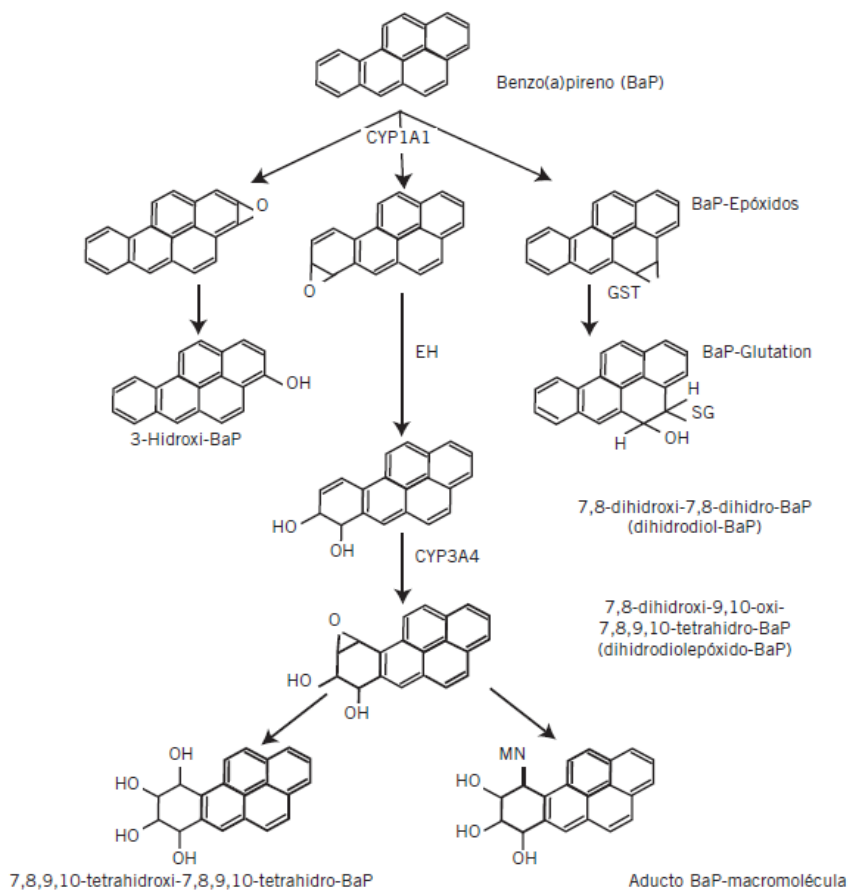


FIGURA 1.3. Metabolismo del Benzo(a)pireno en humanos (EH: epóxidohidrolasa; GST: glutatión-S-transferasa.)

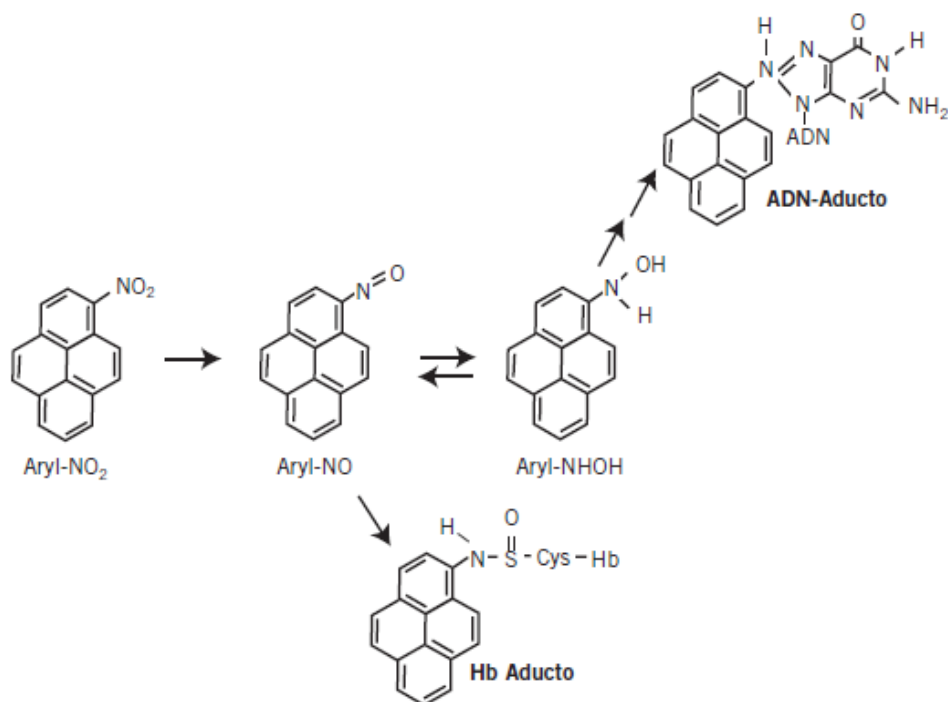
Las monoxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP1A) son responsables de la oxidación enzimática de los HAPs. Estas actúan sobre la molécula, formando epóxidos que pueden formar espontáneamente fenoles, o por acción de las epóxidohidrolasas, producir dihidrodioles. (17)

De los fenoles formados, algunos son oxidados a quinonas y otros producen epóxidos secundarios (dihidrodiolépidos) que son las formas más reactivas con el ADN. El carbono bencílico de los dihidrodiolépidos es capaz de reaccionar con las porciones nucleofílicas del ADN, que poseen la capacidad de reaccionar cediendo electrones libres a otra molécula uniéndose covalentemente, fundamentalmente con guanidina, y eventualmente iniciar un proceso mutagénico.

### **1.3.2. Los HAPs y sus nitroderivados.**

Los nitroderivados de los HAPs han sido comprobados como potentes mutágenos a través del Test de Ames para *Salmonella Typhimurium*, para bacterias y células eucariontes. (14)

Los mononitroderivados son metabolizados generalmente a través de procesos de oxidación generando especies semejantes a las formadas por los HAPs (diolépidos y aminodiolépidos) capaces de formar aductos por reacción con la deoxiguanosina. Además sufren igualmente reacciones de reducción del grupo nitro a N-hidroxilamina con formación de un intermediario capaz de reaccionar con el carbono número 8 (C-8) de la deoxiadenosina formando aductos.



*FIGURA 1.4. Activación metabólica del 1-nitropireno y formación de aductos con ADN y Hemoglobina.*

Aunque todos los procesos anteriormente mencionados ocurren a nivel molecular, se pueden evidenciar morfológicamente con la expresión de micronúcleos en las células epiteliales de la mucosa bucal. Existen variados tipos celulares originados de las distintas capas histológicas de la mucosa, que poseen distintas características citomorfológicas. Es importante poder reconocer dichas características ya que los micronúcleos no se encuentran en todas las células que se pueden observar en un extendido.

Se presenta a continuación una descripción histológica y citológica de las células de la mucosa bucal.

## 1.4. Histología y Citología de la Cavity Bucal.

La mucosa bucal es un epitelio escamoso estratificado que posee cuatro distintas capas. Los diferentes tipos celulares, anomalías nucleares y las posibles interrelaciones pueden ser observados y evaluados en el ensayo de micronúcleos.

El estrato córneo, corresponde a la capa más superficial donde están las células que constantemente son exfoliadas naturalmente. La capa celular inferior corresponde al estrato granuloso y al estrato espinoso, que contiene las células ya diferenciadas, en apoptosis y en necrosis. La última capa corresponde a las papilas del estrato germinativo, que contiene las células madre basales, que se dividen y forman las células basales que son las encargadas de mantener el perfil, la estructura y la integridad de la mucosa bucal.

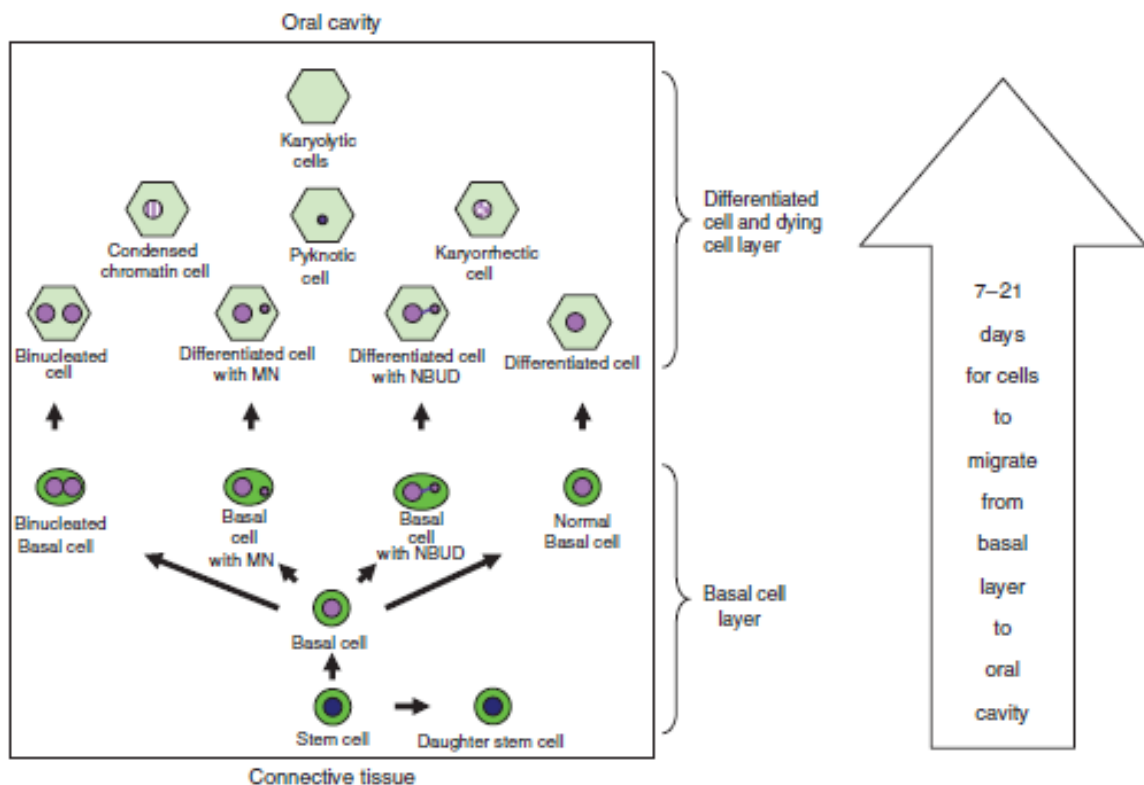


FIGURA 1.5. Secuencia temporal de los diversos tipos celulares en la mucosa bucal.

### 1.4.1. Criterios Citológicos.

Los criterios citológicos para identificar las diferentes células son los descritos por Tolbert et al. Y adaptados por Thomas (12).

#### 1.4.1.1. Células Basales.

Las células basales tienen una relación núcleo citoplasma menor en relación a las células ya diferenciadas. Tienen un núcleo oval de tinción uniforme. El citoplasma no contiene más estructuras aparte de su núcleo, y es típicamente teñido de un tono más oscuro de verde con EA50.

#### 1.4.1.2. Células normales diferenciadas.

Tienen un núcleo uniforme, ovalado o redondo. Se distingue de las células basales por su mayor tamaño y por una mayor relación núcleo citoplasma. No se observan otras estructuras en el citoplasma más que su núcleo. Reciben también el nombre de células diferenciales terminales, ya que no se observan mitosis en esta población.

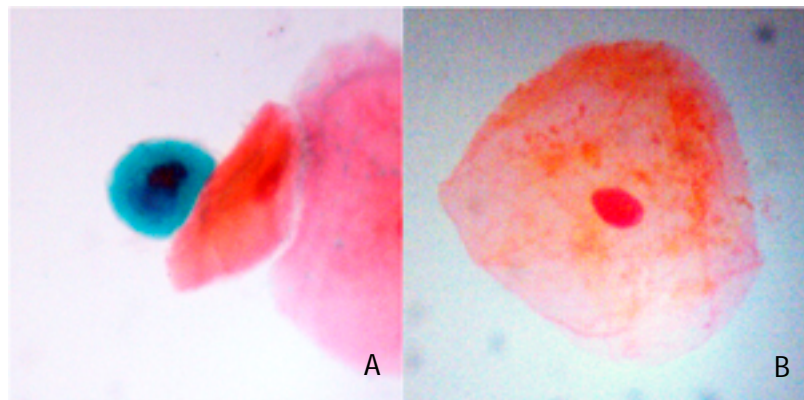


FIGURA 1.6. Célula Basal (A) y Célula normal diferenciada (B).

#### 1.4.1.3. Células micronucleadas.

Se caracterizan por la presencia de un núcleo principal y una o más estructuras nucleares llamadas micronúcleos dentro del citoplasma de la célula epitelial. Dichas estructuras son redondas u ovaladas y su diámetro debe oscilar entre  $1/3$  y  $1/16$  del diámetro del núcleo principal, y tienen la misma intensidad de tinción. La mayoría de las células micronucleadas poseen sólo un micronúcleo.

#### 1.4.1.4. Células binucleadas.

Son células que contienen dos núcleos principales en vez de uno. Estos núcleos están generalmente muy cerca y tienen la misma morfología de los núcleos observados en las células normales. La importancia de estas células aún es desconocida, pero probablemente sean indicativas de citocinesis incompletas después de su división celular. (12)

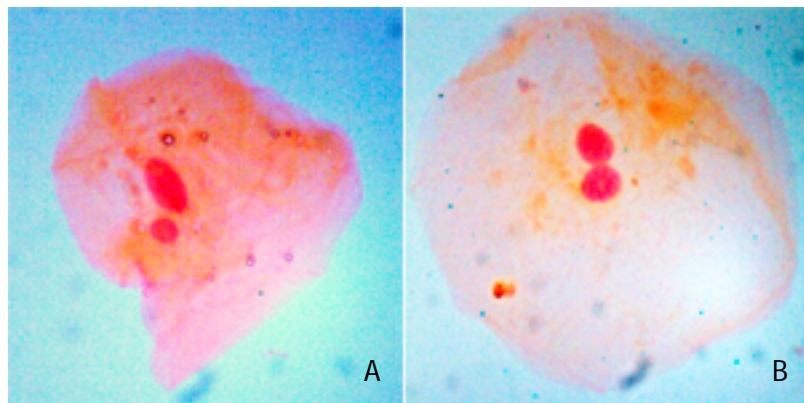


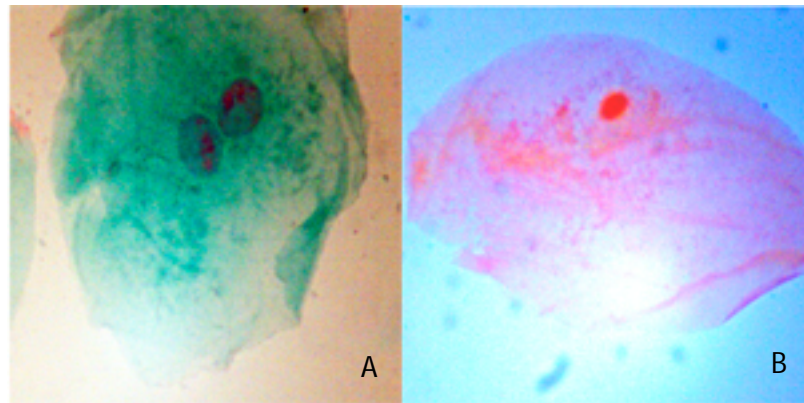
FIGURA 1.7. Célula micronucleada (A) y Célula binucleada (B).

#### 1.4.1.5. Células con cromatina condensada.

Muestran un patrón cromatínico con agregaciones intensas. En algunos casos puede simular la fragmentación del material genético. Estas células invariablemente resultan en núcleos fragmentados y en su eventual desintegración.

#### 1.4.1.6. Células picnóticas.

Se caracterizan por poseer un pequeño núcleo condensado, que se tiñe uniforme pero intensamente. El tamaño es generalmente de 1 a 2/3 del tamaño de un núcleo de una célula diferenciada normal. Una célula picnótica generalmente está en su último estadio, y se encuentra a punto de exfoliar.



*FIGURA 1.8. Célula con cromatina condensada (A) y Célula picnótica (B).*

#### 1.4.1.7. Células cariorréxicas.

Son células que poseen un material genético completamente desintegrado y se manifiesta con un núcleo fantasma con reacción de Feulgen negativa.



*FIGURA 1.9. Célula cariorréxica.*

Debido a la importancia del proceso de formación de los micronúcleos, en el siguiente punto se ahonda en las características de estos.

### **1.5. Micronúcleos.**

La división celular del material genético, implica su replicación y división equitativa, dando lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso se puede producir de manera errónea durante la replicación y división del ADN, debido a roturas cromosómicas y al efecto de sustancias genotóxicas, como ya se ha comentado en páginas anteriores. Estos efectos pueden traducirse en pérdidas cromosómicas y también en el reparto del material genético de forma desigual. Al ocurrir esto, el material genético desprendido queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de alguna de las células hijas, originando un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado micronúcleo, el cual es fácilmente visible al microscopio óptico. Este material desprendido deriva de cromosomas enteros o de fragmentos cromosómicos acéntricos, vale decir que no tienen centrómero, que han sido excluidos durante el anafase mitótico.

Los micronúcleos fueron identificados y descritos en eritrocitos patológicos por los hematólogos William Howell y Justin Jolly, quienes en 1961 publicaron la asociación de los micronúcleos con el déficit de folato y vitamina B12. También se publicaron en el año 1954 y 1959 estudios que relacionaban la expresión de micronúcleos con la exposición a sustancias químicas y a agentes ambientales, respectivamente. (10)

Es así como el método de recuento de micronúcleos fue propuesto en 1976 por Countryman y Heddle, y fue validado a nivel mundial y considerado como un biomarcador efectivo del daño en el ADN en 1999. (1) Para dicha validación, se desarrolló el programa Human MicroNucleus Project (HUMN). Se ha demostrado que sobre el 90% de los cánceres son de origen epitelial, y este método de recuento se ha

utilizado como un indicador efectivo del daño de los cromosomas en células epiteliales exfoliadas del pulmón, vejiga, cavidad bucal, nasal y el cérvix. (5)

Se han descrito diferentes eventos moleculares asociados a la formación de los micronúcleos, que pueden dividirse dependiendo del origen del material genético que da origen a los micronúcleos:

1.5.1 Originados de cromosomas acéntricos o fragmentos de cromosomas.

1.5.2 Originados de cromosomas enteros.

### **1.5.1. Micronúcleos originados de cromosomas acéntricos o fragmentos de cromosomas.**

Los micronúcleos de cromosomas acéntricos o de fragmentos de cromátidas de cromosomas acéntricos se originan a través de múltiples mecanismos. Estudios de la biología de la radiación durante varias décadas han demostrado que se pueden provocar rupturas en la doble hebra de ADN dando lugar a cromátidas simétricas y asimétricas y el intercambio de cromosomas, así como de fragmentos de los mismos.

Una pequeña porción de fragmentos de cromosomas acéntricos puede surgir de las fracturas del ADN reparadas defectuosamente, pero esto sólo es posible cuando la cantidad de daños en el ADN excede la capacidad de reparación de la célula en un determinado período de tiempo.

La propensión a reparar defectuosamente los quiebres en el ADN es mayor si la vía de reparación de este es disfuncional debido a defectos en genes relevantes como el BRCA1 y BRCA2; además quiebres en el ADN que conducen a la formación de micronúcleos pueden no repararse si las enzimas de reparación son defectuosas. Otros mecanismos que podrían producir micronúcleos de fragmentos acéntricos incluyen la reparación anómala y escisión simultánea de las secuencias dañadas o la incorporación de bases incorrectas en el ADN que se encuentran cerca o en su hebra

complementaria. Los eventos de escisión, en especial si no se logra reponer la secuencia eliminada, llevan a la ruptura de la doble hebra de ADN y a la formación de micronúcleos.

Recientemente se ha demostrado que la formación de micronúcleos también puede provenir del material cromosómico fragmentado cuando se forman y rompen los puentes nucleoplasmáticos. Estas estructuras corresponden a verdaderos “puentes” de material genético que unen dos núcleos existentes en el citoplasma de una misma célula. (18)

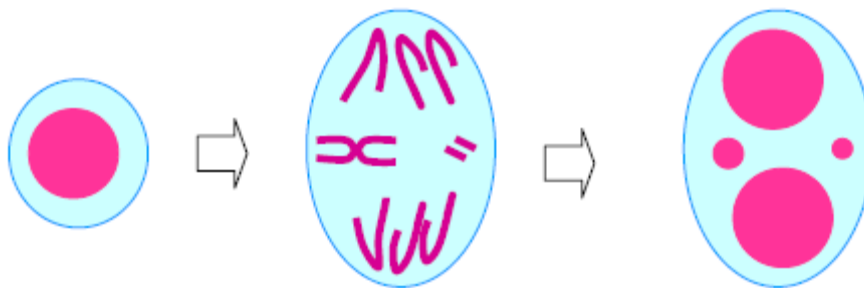
### **1.5.2. Micronúcleos originados de cromosomas enteros.**

Hay una serie de posibles mecanismos moleculares que podrían causar la segregación deficiente de cromosomas enteros en el anafase, resultando en la formación de micronúcleos. Uno de estos mecanismos es la hipometilación de la citosina en secuencias repetidas específicas del ADN centromérico y pericentromérico. (19,20)

La heterocromatina pericentromérica de los cromosomas 1,9 y 16 se encuentra enormemente distendida cuando la citosina se encuentra hipometilada, lo que conduce a la segregación deficiente de cualquiera de estos cromosomas y/o a su pérdida como micronúcleo, debido probablemente al inadecuado montaje del cinetocoro. (20,21)

El ensamblaje de las proteínas del cinetocoro en el centrómero generalmente es afectado por el estado de metilación de la citosina, así como de la metilación de las histonas. (22)

Otras variables que pueden aumentar la cantidad de micronúcleos por pérdida de cromosomas son los defectos en el ensamblaje del huso mitótico, defectos en los puntos de control de la mitosis y amplificación anormal del centrosoma.



*FIGURA 1.10. Esquema de la formación de Micronúcleos.*

<b>TABLA 1.3. Eventos Moleculares Asociados con los Micronúcleos.</b>	
<b>1. Rezagamiento de cromosomas acéntricos o fragmentos de cromosomas en anafase.</b>	
1.1.	Reparación anómala de quiebres en el ADN.
1.2.	No reparación de quiebres en el ADN.
<b>2. Rezagamiento de cromosomas enteros.</b>	
2.1.	Hipometilación de secuencia repetidas en ADN centromérico y pericentromérico.
2.2	Defectos del ensamblaje de las proteínas del cinetocoro.
2.3	Hebra de ADN disfuncional.
2.4	Genes de los puntos de control del anafase defectuosos.

Como se ha mencionado en el punto anterior, los micronúcleos corresponden a fragmentos de material genético, por lo que es necesario utilizar un método de coloración lo suficientemente específico para identificarlos. Uno de estos es el método de Feulgen, desarrollado por Feulgen y Rosenberg en 1921.

## 1.6. Método de Feulgen.

### 1.6.1. El ADN.

Los ácidos nucleicos son compuestos macromoleculares que poseen una estructura repetitiva de nucleótidos, consistentes en un grupo fosfato, un azúcar y una base nitrogenada.

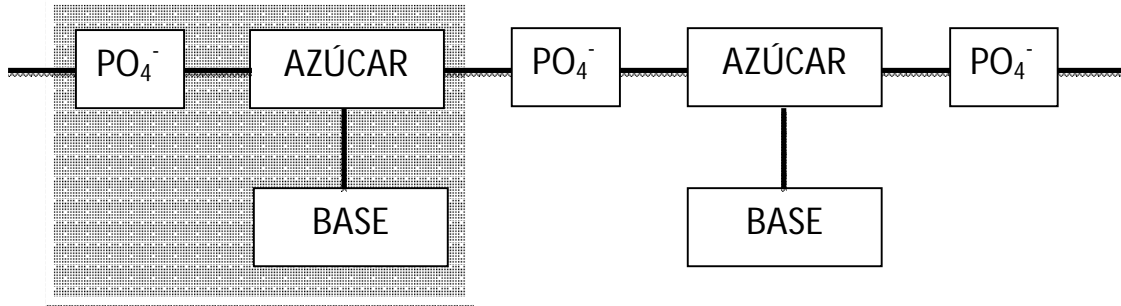


FIGURA 1.11. Esquema general del ADN.

Las bases nitrogenadas son compuestos aromáticos heterocíclicos y pueden ser purínicas, adenina y guanina, o pirimidínicas, citosina, timina y uracilo. En el ADN, el azúcar es la  $\alpha$ -2-desoxirribofuranosa o desoxirribosa, y en el ARN la  $\alpha$ -ribofuranosa o ribosa.

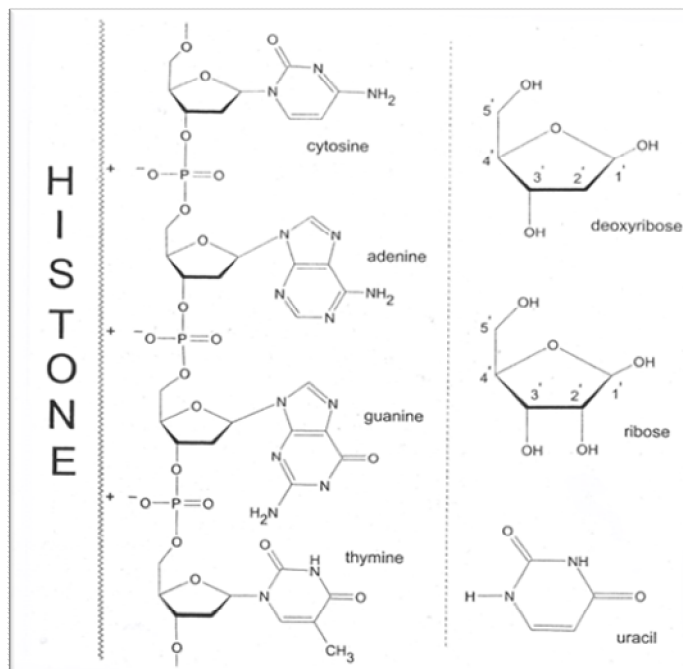


FIGURA 1.12. Estructura del ADN.

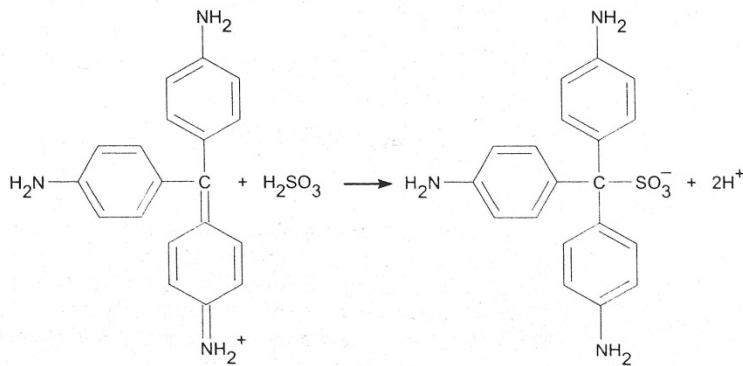
### 1.6.2. El reactivo de Schiff.

El reactivo de Schiff es el más utilizado en la detección de grupos aldehídos y es preparado tratando una solución de fucsina básica con ácido sulfuroso. Este ácido débil es formado cuando el dióxido de sulfuro se combina con agua.



Este equilibrio desplaza la concentración de hidrógenos, disminuyendo el pH de la solución. El ácido sulfuroso, que contiene el dióxido de sulfuro, es preparado en el transcurso de la elaboración del reactivo de Schiff, tras la reacción del metabisulfito de sodio con el ácido clorhídrico y el agua.

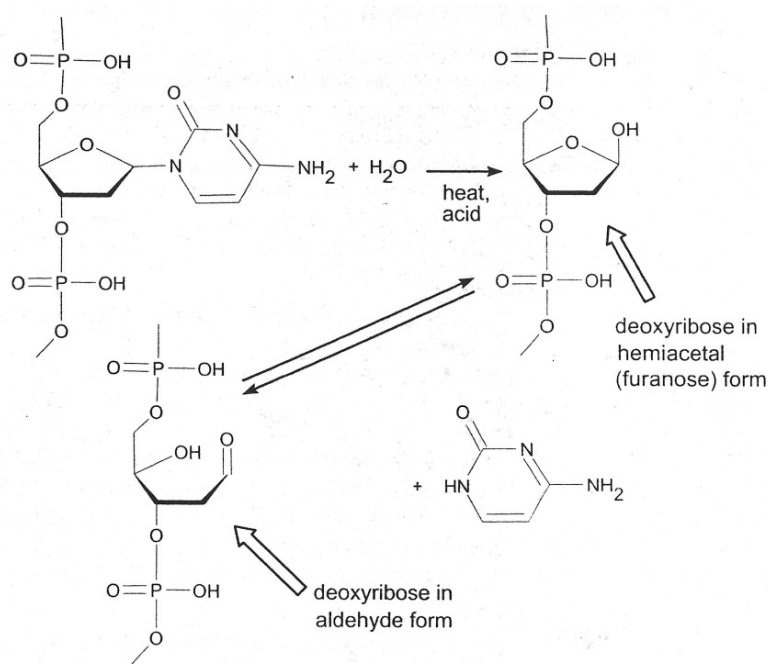
La reacción con el ácido sulfuroso agrega un grupo ácido sulfónico al carbono central de la estructura del trifenilmetano, formando una molécula de ácido leucosulfónico. En este punto, la molécula de fucsina básica es reducida, destruyendo la estructura cromofórica del colorante (anillo quinoide) y transformándose en un leucoderivado.



*FIGURA 1.13. Formación del ácido leucosulfónico. Fuente: Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice, J.A. Kiernan, Fourth Edition, 2008.*

### 1.6.3. Fundamento del método de Feulgen.

Cuando las muestras son tratadas con una solución ácida por un tiempo determinado, el ARN es denaturado completamente pero no así el ADN que sólo sufre una hidrólisis parcial. Las bases purínicas del ADN son separadas de los residuos de desoxirribosa, quienes quedan en su forma hemiacetal. Estos azúcares, forman un grupo aldehído que posteriormente reaccionará con la molécula de ácido leucofucsínico. La hidrólisis para este método no rompe las uniones éster que están entre los ácidos fosfóricos y las unidades de azúcar.



**FIGURA 1.14.** Mecanismo de hidrólisis ácida. Fuente: *Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice*, J.A. Kiernan, Fourth Edition, 2008.

Cuando el reactivo de Schiff entra en contacto con los grupos aldehídos formados en la hidrólisis, estos ceden sus electrones al leucoderivado, oxidándolo, reconstituyendo la molécula cromogénica del colorante y así forman un producto coloreado magenta.

Las técnicas histoquímicas basan su especificidad en el correcto uso de controles positivos y negativos. Como control positivo se utilizó un corte de ganglio del cual se conocía su positividad para la técnica, y como control negativo se utilizó un corte de ganglio que no fue hidrolizado con HCl 5N. Esto permitió que posteriormente, cuando se evaluaran los extendidos, se pudiese determinar que las estructuras presentes en los citoplasmas correspondiesen efectivamente a material genético, y por lo tanto, micronúcleos.

## **CAPITULO 2. Objetivos.**

### **2.1 Objetivo General.**

Relacionar el Recuento de Micronúcleos con la cantidad de cigarros consumidos por fumadores jóvenes de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe.

### **2.2 Objetivos Específicos.**

1. Determinar el número de cigarrillos consumidos por cada individuo.
2. Realizar el recuento de micronúcleos por cada individuo..
3. Determinar relación entre el recuento de micronúcleos y la cantidad de cigarros consumidos.

## **CAPITULO 3. Materiales y Métodos.**

### **3.1 Variables consideradas.**

Se han establecido dos variables para el desarrollo de esta investigación. La variable independiente corresponde al consumo de tabaco, medido por la cantidad de cigarros consumidos al día.

La variable dependiente, es la cantidad de micronúcleos en aproximadamente 100 campos de aumento mayor (40X), hasta contabilizar 1000 células.

### **3.2 Diseño Muestral.**

Se emplea un muestreo probabilístico aleatorio sin reposición, que se define por su equiprobabilidad, es decir, que cada individuo seleccionado en la muestra tiene igual probabilidad de ser escogido, sin volver a repetirse.

Para determinar el tamaño muestral de este estudio (ver Anexo 1), se tomó en cuenta los siguientes aspectos:

- Nivel de confianza: para una seguridad del 95% se utiliza el coeficiente 1,96. Se utilizó este porcentaje de confianza a fin de evitar los errores de tipo 1 y 2, los que se definen como, el rechazo de una hipótesis nula ( $H_0$ ) que es verdadera en la población, o bien, rechazar la hipótesis nula siendo esta falsa en la población, respectivamente.
- Precisión: se asume un error del 5%, equivalente a 0,05.
- Variabilidad: es la probabilidad con la que se aceptó o rechazó la hipótesis que se quiso investigar en algún ensayo o estudio previo a la investigación actual. El porcentaje con que se acepta la hipótesis se denomina variabilidad positiva y se denota por  $p$ , y el porcentaje con que se rechaza dicha hipótesis se denomina variabilidad negativa y se denota por  $q$ . Se habla de máxima variabilidad cuando

no existen antecedentes anteriores sobre la investigación, como es el caso de este estudio, asignando el mismo valor a  $p$  y a  $q$ , es decir,  $p=q=0,5$ .

### **3.3. Características de la población a estudiar.**

La población en estudio es de 162 personas, correspondiente a la cantidad total de alumnos de la carrera de Tecnología Médica del Campus San Felipe. Se utilizó una muestra representativa de la población correspondiente a 114 jóvenes (ver anexo 1).

Como criterios de inclusión se considero a los jóvenes hombres o mujeres desde 18 hasta 30 años, estudiantes de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe.

La toma de muestras se llevó a cabo en dependencias de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe, previa aplicación de un cuestionario (ver anexo 2), y firma del consentimiento informado (ver anexo 3), para obtener los siguientes datos:

- Sexo
- Fumador, No Fumador.
- Inicio hábito tabáquico.
- Cantidad de cigarrillos al día.

La muestra se subdividió en dos grupos basados en sus hábitos tabáquicos: Grupo Estudio y Grupo Control. El Grupo Estudio está compuesto por 42 muestras obtenidas de fumadores jóvenes activos, y el Grupo Control de 72 muestras obtenidas de jóvenes no fumadores.

### **3.4. Metodología Experimental.**

#### **3.4.1. Procesamiento de muestras.**

Se tomaron dos extendidos citológicos de mucosa bucal de cada uno de los 114 jóvenes que constituyen la muestra poblacional. Las muestras fueron obtenidas mediante exfoliación mecánica raspando suavemente la cara interior de las mejillas con un bajalenguas de madera, y posteriormente extendiéndolas en portaobjetos esmerilados.

Dichos extendidos fueron fijados en alcohol etílico al 95%, manteniendo uno de ellos guardado en caja sellada para evitar su contaminación (por si ocurrían errores en el proceso de tinción) el segundo se tiñó con el Método de Feulgen (6) (Ver anexo 4). Posterior a la reacción de Feulgen el preparado fue deshidratado en alcoholes acedentes, aclarado en xilol y montado en resina sintética (Entellán). El procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Militar de Santiago.

#### **3.4.2. Recuento de Micronúcleos.**

Se revisaron los extendidos con aumento mayor (40X) utilizando un microscopio óptico Olympus CX21. Se marcó cada una de las células micronucleadas (MN) que se encontraron en 1000 células del extendido, y se registraron para posteriormente hacer la correlación estadística. Todo este proceso se realizó en ciego, sin conocer ningún antecedente del individuo al que correspondía cada muestra.

Los criterios para determinar qué células evaluar y para identificar los micronúcleos son los descritos a continuación (29,30):

- I. Células Epiteliales:
  - a. Células de citoplasma intacto.
  - b. Células individuales y no sobrepuestas.
  - c. Núcleo normal e intacto.

## II. Micronúcleos:

- a. Ser positivo para la reacción de Feulgen.
- b. El micronúcleo debe ser máximo un tercio del tamaño del núcleo principal.
- c. Redondeado u oval, con los bordes claramente definidos.
- d. No debe estar en contacto con el núcleo principal.
- e. Poseer la misma intensidad de reacción, textura y refracción del núcleo principal.

### **3.4.3. Análisis Estadístico.**

Se calcularon medidas de tendencia central para los datos obtenidos de las encuestas y también la desviación estándar de cada grupo, con ayuda del programa Microsoft Office Excel 2010. Además, se calcularon test estadísticos específicos, los que se detallan a continuación.

#### *3.4.3.1. Test de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov.*

En estadística se llama distribución normal, de Gauss o gaussiana, a una distribución de probabilidad de variable continua que se aproxima a la distribución de datos existente en los fenómenos reales. Gráficamente tiene una forma acampanada y es simétrica respecto de algún parámetro, como la media. Esta curva recibe el nombre de Campana de Gauss.

La importancia de esta distribución radica en que nos permite modelar numerosos fenómenos naturales. Ya que la mayoría de los mecanismos involucrados en estos fenómenos son desconocidos por la enorme cantidad de variables que intervienen, se justifica el uso de un modelo normal asumiendo que cada observación se obtiene como la suma de unas pocas causas independientes.

Por lo anterior expuesto es que se aplicó el Test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos poseían dicha distribución.

#### 3.4.3.2. *Coefficiente de Correlación lineal de Pearson.*

Debido a que ambas variables estudiadas son paramétricas aleatorias y tienen el mismo interés e importancia en el estudio, se busco determinar si existe una relación lineal entre ambas.

El Coeficiente de correlación momento-producto de Pearson ( $\rho$ ) es la medida de asociación más frecuentemente utilizada para determinar la correlación lineal de dos variables aleatorias, y se define como la medida de la forma en que X e Y varían conjuntamente. El valor de  $\rho$  varía entre -1 y 1, ambos inclusive. Si  $\rho=1$  decimos que existe una correlación positiva perfecta entre las dos variables. Si  $\rho=-1$  se dice que existe una correlación negativa perfecta. En la circunstancia en que  $\rho=0$  se dice que no existe una asociación lineal, pero esto no significa que las variables no estén relacionadas.

Si aplicamos estos valores al contraste de hipótesis de este estudio, tendríamos lo siguiente:

$H_0: \rho = 0$ . No existe una correlación entre la cantidad de cigarros consumidos y el recuento de micronúcleos.

$H_1: \rho \neq 0$ . Existe una correlación entre la cantidad de cigarros consumidos y el recuento de micronúcleos, la que puede ser de tipo positiva o negativa.

Sin embargo, aunque exista una correlación de tipo lineal es necesario determinar la significancia estadística de dicho resultado, para poder definir si esta relación es cierta o simplemente se debe al azar.

### 3.4.3.3. *Test T-Student para muestras independientes.*

Este test es utilizado cuando se necesita hacer una comparación entre las medias de los datos de dos poblaciones independientes, en este caso entre el grupo Estudio y el grupo Control, para determinar si las diferencias entre ellos son significativas y no se deben al azar.

Para la aplicación de todos los test estadísticos antes mencionados se utilizó el software SPSS Statistics v.17.0.

## **3.5. Materiales.**

### 3.5.1. Equipos y Softwares

- Microscopio Óptico Olympus CX21 (sistema óptico Universal corregido al infinito, con objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X).
- Microscopio Óptico Olympus CX31 (sistema óptico Universal corregido al infinito, con objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X).
- Notebook Acer Aspire 4551.
- Microsoft Office Professional 2010.
- SPSS Statistics v17.0.0.
- Micrometrics SE Premium.

### 3.5.2. Material de Laboratorio.

- Coplin plásticos y de vidrio.
- Portaobjetos esmerilados.
- Cubreobjetos.
- Bajalenguas de madera.

- Guantes de procedimiento.
- Balanza analítica
- Agitador magnético
- Probetas graduadas.
- Vasos precipitados.
- Matraz de Erlenmeyer.
- Embudo de vidrio.
- Papel filtro.

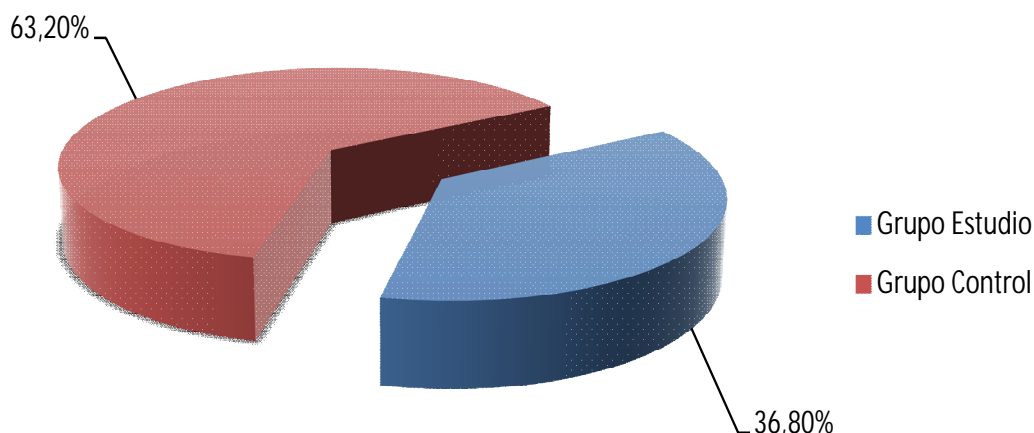
### 3.5.3. Reactivos.

- Solución de Papanicolaou 2a: solución de anaranjado G. (Merck, CI 16230)
- Solución de Papanicolaou 3b: solución policroma EA50. (Merck)
- Fucsina básica. (Merck, CI 42510)
- Ácido clorhídrico pro-análisis. (Merck, 37% pureza.)
- Metabisulfito de sodio. (Riedel de Haën AG)
- Metabisulfito de potasio. (Merck)
- Carbón activado. (May and Baker Ltda)
- Alcohol Etílico Absoluto. (Arquimed)
- Alcohol Etílico al 95%. (Arquimed)
- Xilol (Arquimed).
- Resina sintética Entellán. (Merck)
- Agua bidestilada. (ValmaMed)

## CAPITULO 4. Resultados.

### 4.1. Datos demográficos y sobre el Consumo de cigarros.

Como se mencionó anteriormente, se estudio un muestra de 114 jóvenes que fue subdividida en dos grupos según sus hábitos tabáquicos: Grupo Estudio y Grupo Control (Figura 4.1.).



*Figura 4.1. Distribución de la Muestra.*

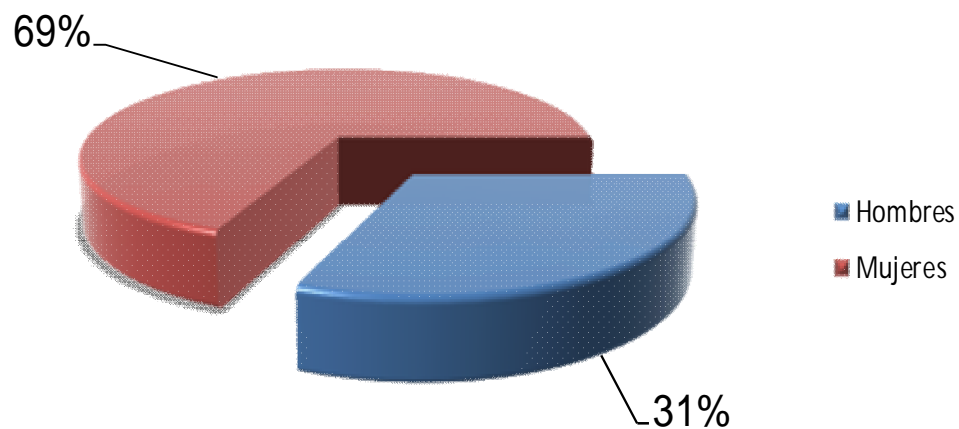
El Grupo Estudio (Tabla 4.1.) está constituido por 42 muestras de fumadores jóvenes, con una edad promedio de 21, 9 años (con una desviación estándar de 1,9 años) y un consumo promedio de cigarros al día de 3,3 (con desviación estándar de 2,5 cigarros). Además, está constituido en un 31% de jóvenes de sexo masculino, y por un 69% de jóvenes de sexo femenino. (Gráfico 4.1.). Además, se estimo que el inicio del hábito tabáquico fue a la edad promedio de 16,3 años (con desviación estándar de 1,4 años).

TABLA 4.1. Características Grupo Estudio.

N° Muestra	Sexo	Edad	Cigarros x día
4	F	21	1
5	M	22	10
6	M	22	1
7	F	21	3
9	F	20	1
11	F	23	3
15	M	23	1
16	F	24	10
18	F	24	8
23	F	24	5
30	M	21	1
35	F	23	3
36	F	24	1
38	M	22	1
40	F	22	1
42	F	23	1
44	M	23	2
45	M	22	1
47	F	19	6
48	F	21	6
54	F	22	1

N° Muestra	Sexo	Edad	Cigarros x día
55	F	26	6
57	F	22	3
60	F	20	5
61	M	19	6
64	F	23	6
69	F	19	3
76	F	20	3
79	F	22	1
80	F	22	1
84	F	20	5
89	M	22	1
91	F	24	8
94	M	19	3
95	F	21	3
97	F	26	2
99	M	22	1
103	M	23	5
106	F	20	2
108	M	26	3
111	F	21	4
114	F	24	4

1. Promedio de edad: 21,9 años  $\pm$  1,9 años.
2. Promedio Consumo de Cigarros día: 3,3 cigarros  $\pm$  2,5 cigarros.



*Figura 4.2. Distribución Grupo Estudio según sexo.*

El Grupo Control (Tabla 4.2.) se constituye de 72 muestras obtenidas de jóvenes no fumadores con un promedio de edad de 21,9 años (con desviación estándar de 1,8 años) y sin consumo de cigarrillos. Este grupo está constituido en un 40,3% de jóvenes de sexo masculino, y en un 59,7% de jóvenes de sexo femenino. (Gráfico 4.2.)

TABLA 4.2. Características Grupo Control.

N° Muestra	Sexo	Edad	Cigarros x día
1	F	21	0
2	F	21	0
3	F	21	0
8	F	21	0
10	M	26	0
12	M	22	0
13	M	21	0
14	F	19	0
17	F	23	0
19	F	23	0
20	M	24	0
21	M	22	0
22	F	23	0
24	F	23	0
25	F	20	0
26	F	21	0
27	F	24	0
28	F	22	0
29	M	23	0
31	F	22	0
32	F	21	0
33	F	22	0
34	F	22	0
37	M	21	0
39	M	22	0
41	F	24	0
43	M	22	0
46	F	19	0
49	M	20	0
50	F	21	0
51	F	24	0
52	F	25	0
53	F	25	0
56	M	23	0
58	F	20	0
59	M	19	0

N° Muestra	Sexo	Edad	Cigarros x día
62	F	21	0
63	F	20	0
65	M	23	0
66	M	19	0
67	M	23	0
68	M	20	0
70	M	20	0
71	F	24	0
72	M	21	0
73	M	21	0
74	M	19	0
75	M	21	0
77	F	21	0
78	F	20	0
81	F	23	0
82	F	22	0
83	M	18	0
85	F	20	0
86	M	24	0
87	F	23	0
88	F	24	0
90	F	26	0
92	F	23	0
93	M	20	0
96	M	24	0
98	F	23	0
100	F	20	0
101	F	19	0
102	F	25	0
104	F	20	0
105	M	24	0
107	F	25	0
109	M	24	0
110	F	21	0
112	M	20	0
113	M	19	0

1. Promedio de edad: 21,9 años  $\pm$  1,8 años.
2. Sin consumo de cigarros por día.

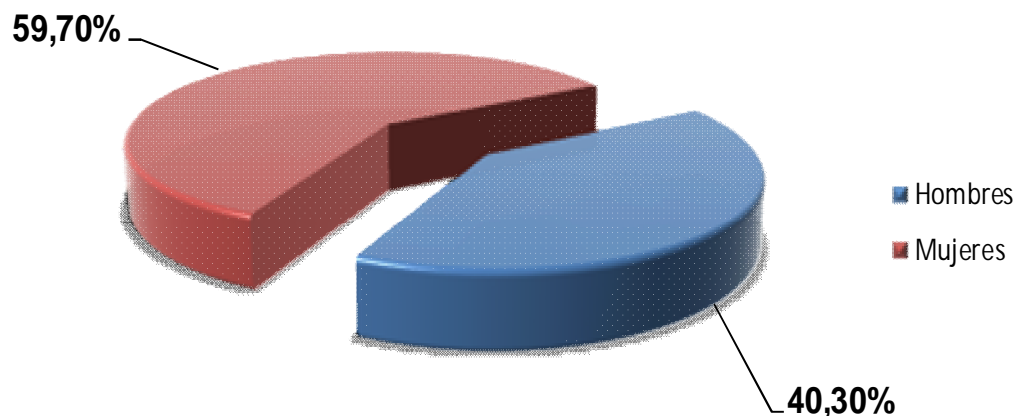


Figura 4.3. Distribución Grupo Control según sexo.

## 4.2. Recuento de Micronúcleos.

Se calcularon estadísticos descriptivos para ambos grupos. En el Grupo Estudio se analizaron 42 datos (TABLA 4.5.), con un recuento promedio de 0,78 micrónucleos con una desviación estándar de 1,09. El recuento mínimo fue de 0 micrónucleos, y el máximo de 4. (TABLA 4.3.)

<i>TABLA 4. 3. Estadísticos descriptivos del Grupo Estudio.</i>					
	<b>N</b>	<b>Min.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>
<b>MN</b>	42	0,00	4,00	0,78	1,09
<b>N valido</b>	42				

Para el Grupo Control se analizaron 72 datos (TABLA 4.6.), con un recuento promedio de 0,34 micrónucleos con una desviación estándar de 1,06. El recuento mínimo fue de 0 micrónucleos, y el máximo de 6. (TABLA 4.4.)

TABLA 4.4. Estadísticos Descriptivos para el Grupo Control.

	<b>N</b>	<b>Min.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>
<b>MN</b>	72	0,00	6,00	0,34	1,06
<b>N valido</b>	72				

TABLA 4.5. Recuento de Micronúcleos en Grupo Estudio.

<b>N° Muestra</b>	<b>Cigarros x día</b>	<b>MN</b>
4	1	0
5	10	2
6	1	1
7	3	0
9	1	0
11	3	0
15	1	0
16	10	3
18	8	1
23	5	0
30	1	0
35	3	3
36	1	0
38	1	0
40	1	0
42	1	4
44	2	1
45	1	0
47	6	0
48	6	0
54	1	0

<b>N° Muestra</b>	<b>Cigarros x día</b>	<b>MN</b>
55	6	3
57	3	1
60	5	0
61	6	2
64	6	2
69	3	0
76	3	0
79	1	2
80	1	0
84	5	2
89	1	0
91	8	2
94	3	1
95	3	0
97	2	0
99	1	0
103	5	1
106	2	1
108	3	0
111	4	1
114	4	0

TABLA 4.6. Recuento de micronúcleos en Grupo Control.

N° Muestra	Cigarros x día	MN
1	0	0
2	0	0
3	0	0
8	0	0
10	0	0
12	0	0
13	0	3
14	0	1
17	0	3
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	0	0
24	0	1
25	0	0
26	0	0
27	0	0
28	0	0
29	0	0
31	0	1
32	0	0
33	0	0
34	0	0
37	0	0
39	0	0
41	0	6
43	0	1
46	0	0
49	0	5
50	0	0
51	0	2
52	0	0
53	0	0
56	0	0
58	0	0
59	0	0

N° Muestra	Cigarros x día	MN
62	0	0
63	0	0
65	0	0
66	0	0
67	0	0
68	0	0
70	0	0
71	0	0
72	0	0
73	0	0
74	0	0
75	0	0
77	0	0
78	0	0
81	0	0
82	0	0
83	0	0
85	0	0
86	0	0
87	0	0
88	0	0
90	0	0
92	0	0
93	0	0
96	0	0
98	0	0
100	0	0
101	0	0
102	0	0
104	0	0
105	0	1
107	0	0
109	0	0
110	0	0
112	0	1
113	0	0

### 4.3. Análisis estadístico.

#### 4.3.1. Test de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Para el Grupo Estudio, se determinó que la distribución del consumo de cigarros y el recuento de micronúcleos (TABLA 4.7.) es normal, de igual manera que en el Grupo Control (TABLA 4.8.).

En el Grupo Estudio, se analizó un total de 42 extendidos. Se determinó que el consumo de cigarros tiene una media de 3,38 cigarros diarios con una desviación estándar de 2,55 cigarros, y una media de 0,78 micronúcleos con una desviación estándar de 1,09 micronúcleos (TABLA 4.7.).

*Tabla 4.7. Resultados Test de Kolmogorov-Smirnov para consumo de cigarros (Cig) y recuento de micronúcleos (MN) en Grupo Estudio.*

		<b>Cig</b>	<b>MN</b>
<b>N</b>		42	42
<b>Parametros Normales</b> <sup>a,b</sup>	Media	3,38	0,78
	Desviación Estándar	2,55	1,09
<b>Diferencias Extremas</b>	Absoluta	0,20	0,33
	Positiva	0,20	0,33
	Negativa	-0,17	-0,23
<b>Kolmogorov-Smirnov Z</b>		1,31	2,17
<b>Significancia</b>		0,06	0,00
a. La distribución es Normal.			
b. Calculado de los datos.			

Para el grupo control se analizaron 72 extendidos. Se determinó que el consumo de cigarrillos era de cero, y una media de 0,78 micronúcleos con desviación estándar de 1,06 micronúcleos (TABLA 4.8.).

*Tabla 4.8. Resultados Test de Kolmogorov-Smirnov para consumo de cigarrillos (Cig) y recuento de micronúcleos (MN) en Grupo Control.*

	<b>Cig</b>	<b>MN</b>
<b>N</b>	72	72
<b>Parametros Normales</b> <sup>a,b</sup>	Media	0,00
	Desviación Estándar	0,00 <sup>c</sup>
<b>Diferencias Extremas</b>	Absoluta	0,47
	Positiva	0,47
	Negativa	-0,37
<b>Kolmogorov-Smirnov Z</b>		4,03
<b>Significancia</b>		0,00
<p>a. La distribución es Normal.</p> <p>b. Calculado de los datos.</p> <p>c. La distribución no tiene variación.</p>		

### 4.3.2. Coeficiente de Correlación de Pearson.

Para el Grupo Estudio, se determinó que el Coeficiente de Correlación de Pearson entre el Consumo de cigarrillo y el recuento de micronúcleos es de  $\rho=0,43$  con una significancia estadística de 0,004 (entendiéndose como válida una significancia que no supere el 0,01). (TABLA 4.9.)

<i>TABLA 4.9. Correlaciones en Grupo Estudio.</i>			
	<b>Cig</b>	<b>MN</b>	
<b>Cig</b>	Correlación de Pearson	1	0,43**
	Significancia		0,004
	N	42	42
<b>MN</b>	Correlación de Pearson	0,43**	1
	Significancia	0,004	
	N	42	42
<b>** Correlación es significativa al nivel 0,01.</b>			

Para el grupo control no se pudo determinar el Coeficiente de Correlación de Pearson entre el Consumo de cigarrillo y el recuento de micronúcleos debido a que una de las variables, Consumo de cigarrillos, se mantiene constante para el valor cero. (TABLA 4.10.)

<i>TABLA 4.10. Correlaciones en Grupo Control.</i>			
		Cig	MN
<b>Cig</b>	Correlación de Pearson	a.	a.
	Significancia		
	N	72	72
<b>MN</b>	Correlación de Pearson	a.	1
	Significancia		
	N	72	72
<b>a. No se puede calcular debido a que una variable es constante.</b>			

### 4.3.3. Test T-Student para muestras independientes.

Se determinaron las medias, las desviaciones estándar, los intervalos de confianza y las diferencias para el recuento de micronúcleos de ambos grupos. (TABLA 4.11.)

Existe una diferencia de -0,438 micronucleos entre el Grupo Control y el Grupo Estudio con una significancia estadística de 0,037, lo que quiere decir que existen diferencias significativas entre el recuento de micronúcleos entre los dos grupos y estas diferencias no se deben al azar. Se tomó en cuenta el valor absoluto de la diferencia, sin importar si la relación es de tipo positiva o negativa.

<i>TABLA 4.11. Test T-Student para micronúcleos en Grupo Control y Estudio.</i>						
<b>Grupo</b>	N	Media	Error Est.	Desv. Est.	Intervalo de Conf. 95%	
<b>Control</b>	72	0,347	0,125	1,063	0,097	0,597
<b>Estudio</b>	42	0,785	0,168	1,094	0,444	1,126
<b>Combinado</b>	114	0,508	0,102	1,090	0,306	0,711
<b>Diferencias</b>		-0,438	0,208		-0,851	-0,024
Dif = media control – media estudio					t	-2,101
H0: dif = 0				Grados de Libertad		112
H1: dif < 0		H1: dif! = 0		H1: dif > 0		
Pr(T < t) = 0,0189		Pr( T  >  t ) = 0,037		Pr(T > t) = 0,981		

## CAPITULO 5. Discusión.

El objetivo principal de esta investigación es relacionar el recuento de micronúcleos con la cantidad de cigarrillos consumidos por fumadores jóvenes de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe. Para esto se estudió un grupo de 114 jóvenes, subdivididos en un Grupo Estudio y en un Grupo Control, abarcando ambos sexos entre los 18 y 30 años.

Estudios exponen que existen variaciones en el recuento de micronúcleos entre grupos de gente fumadora y gente que no posee el hábito. Stich et al (1982) determinaron que un 0,47% de las células de la mucosa bucal de los no fumadores poseen micronúcleos, y este nivel se eleva hasta un 8,4% en personas que si fuman. (29) Los hallazgos encontrados en la presente investigación arrojan cifras bastante menos significativas, un 0,078% de micronúcleos en el grupo de fumadores y un 0,034% en el grupo de no fumadores.

Con respecto a la correlación entre los datos, esta existe entre el consumo de cigarrillo y el recuento de micronúcleos de  $\rho=0,43$  con una significancia estadística de 0,004. Como mencionábamos anteriormente un valor de  $\rho$  entre -1 y 1, acepta la hipótesis de correlación entre las variables y que sea un valor mayor a cero, demuestra que es de tipo positiva.

Aunque se esperaba que no se encontraran micronúcleos en el Grupo Control, se determinó que alrededor de un 0,034% de las células los poseen. Diversas publicaciones han expuesto que existen otras variables que pueden aumentar la expresión de micronúcleos como la edad, el sexo, la presencia de genes polimórficos, la exposición a diversos fármacos y a la radiación, la deficiencia de micronutrientes como el folato, y el consumo de alcohol y drogas psicoactivas. (25, 27, 28)

Otro de los hallazgos importantes, fue el hecho de no encontrar micronúcleos en algunas de las muestras del Grupo Estudio, y esto probablemente se deba a que los procesos metabólicos propios de las células pueden detoxificar, eliminar o activar cierto químicos mucho antes de que se unan de forma covalente el ADN. Los mismos

procesos de reparación del material genético pueden eliminar lesiones mutagénicas, por lo que esos daños no se traducirían en la expresión de micronúcleos. Estos dos procesos son características que varían de persona a persona. (26)

Como se mencionó anteriormente, las moléculas de benzo(a)pireno inducen la expresión de sitios frágiles en los cromosomas al formar aductos con el ADN que pueden desencadenar la formación de micronúcleos. Sin embargo estas anomalías son transitorias y reversibles si se descontinúa el hábito tabáquico, por lo que el recuento de micronúcleos se vería claramente disminuido.

Con la aplicación del Test T-Student se logró demostrar que la diferencia del recuento de micronúcleos entre el Grupo Estudio y el Grupo Control es significativa.

En vista del potencial que tiene el estudio de los micronúcleos como un biomarcador de la exposición a agentes genotóxicos, sería interesante poder generar una nueva línea de investigación a partir de este estudio.

Unos de los aspectos importantes a considerar en una investigación posterior sería establecer las diferentes variables que pueden provocar variaciones en el recuento, y poder determinar la importancia de cada una.

Otro aspecto es el origen de la muestra. Varios autores coinciden en que una buena forma de obtener micronúcleos es realizando cultivos de linfocitos y posteriormente bloquear la citocinesis con citocalasina B. Otro método sería usar muestras de mucosa bucal citocentrifugadas para obtener una mayor cantidad de células aisladas.

La tinción es un factor de importancia, ya que muchos colorantes usados, principalmente Giemsa, no son específicos para el ADN. El uso de algún fluorocromo, como DAPI, y la microscopía de fluorescencia ayudarían a aumentar la especificidad de la técnica.

Otra posibilidad, sería la realización de bloques celulares de muestras citológicas provenientes de raspados bucales de pacientes fumadores y que tienen expresión de micronúcleos en sus células epiteliales. Con esta técnica se podría obtener muestras aptas para el diagnóstico mediante inmunohistoquímica buscando la sobreexpresión de p53, BRCA1 y 2.

La desventaja de todas estas posibles modificaciones, es que se requeriría mucho más tiempo para poder desarrollar la investigación, además de mayores recursos e implementación tecnológica.

## **CAPITULO 6. Conclusiones.**

La formación de micronúcleos puede ser evidenciada claramente en los extendidos de mucosa bucal, especialmente en quienes consumen cigarrillos. Probablemente también se expresen frente a la exposición a otros agentes, debido al hallazgo de micronúcleos en la población control utilizada en este estudio.

De acuerdo a los datos obtenidos, existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre el consumo de cigarrillos y el recuento de micronúcleos ( $\rho=0,43$  con significancia estadística de  $P=0,004$ ).

Estos resultados demostrarían una tendencia en un determinado grupo poblacional, y no se podría extrapolar los resultados a una población completa debido a lo limitado de las muestras analizadas. Para poder obtener un resultado que refleje las características de una población, en este caso fumadores jóvenes, sería necesario ampliar dicha población. Además, los factores individuales pueden producir un sesgo en los resultados.

La expresión de micronúcleos no se debe sólo al consumo de cigarrillos, sino que existen otros factores que los pueden producir, como la exposición a otros agentes mutagénicos, Así también se puede inferir que probablemente, existen diferencias individuales que impiden la expresión de ellos.

No obstante lo anterior, y a partir de la literatura consultada y el presente trabajo se puede colegir que el recuento de micronúcleos se relaciona con la cantidad de cigarrillos consumidos por fumadores jóvenes de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe.

## Bibliografía.

### Bibliografía General.

- Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice, J.A. Kiernan, Fourth Edition, 2008.

### Referencias.

1. Zalacain M, Sierrasesúmaga L & Patiño A. (2005) *The cytogenetic assay measure of genetic instability induced by genotoxic agents*. An. Sist. Sanit. Navar; 28(2): 227-236.
2. Travis WD, Travis LB & DeVessa SS. (2005). *Lung Cancer*, Cancer; 75:191- 202.
3. Petersen PE. (2003). *Tobacco and oral health, the role of the World Health Organization*. Oral Health Prev Dent; 1: 309-315.
4. Zdravkovic T, Genbacey O, McMaster MT & Fisher SJ. (2005). *The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review*. Placenta; 6: Suppl A: S81-6.
5. Olgun Erdemir E, Sengün A & Ulker M. (2007). *Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test*. Eur J Dent; 2:80-85.
6. Nersesyan A, Kundi M & Atefi K. (2006). *Effect of staining procedures on the results of Micronucleus assays with epithelial oral mucosa cells*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev; 15: 1835-1840. Recuperado desde [www.cebp.aacrjournals.org](http://www.cebp.aacrjournals.org) el 30 de mayo de 2011.
7. MINSAL (2005) Encuesta Mundial de Tabaquismo en Estudiantes de Profesiones de Salud (EMTES). Recuperado desde <http://epi.minsal.cl/epi/html/invest/InformeFinalEMTESChile2008.pdf> el 28 de Junio de 2011.
8. MINSAL Situación en Chile. Recuperado desde [http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g\\_proteccion/g\\_tabaco/situacionenchile.html](http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_tabaco/situacionenchile.html) el 8 de agosto de 2011.

9. OMS Iniciativa liberarse del tabaco. ¿Por qué el tabaco es una prioridad de salud pública?. Recuperado desde [http://www.who.int/tobacco/health\\_priority/es/index.html](http://www.who.int/tobacco/health_priority/es/index.html) el 8 de agosto de 2011.
10. Fenech M, Kirsch-Volders M et al. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear buds in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26(1):125-132. Recuperado desde [mutage.oxfordjournals.org](http://mutage.oxfordjournals.org) el 12 de agosto de 2011.
11. Analytical Smoke Chemistry, Research&Development at British American Tobacco. Recuperado desde [http://www.bat-science.com/groupms/sites/BAT\\_7AWFH3.nsf/vwPagesWebLive/DO85CLWB?opendocument&SKN=1](http://www.bat-science.com/groupms/sites/BAT_7AWFH3.nsf/vwPagesWebLive/DO85CLWB?opendocument&SKN=1) el 03 de octubre de 2011.
12. Thomas P, Holland N, Bolognesi C et al. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 4(6):825-837. Recuperado desde <http://www.nature.com/natureprotocols> el 12 de agosto de 2011.
13. Domínguez L. (2004). Principios generales de Carcinogénesis: Carcinogénesis Química y Hormonal. *Biocáncer* 1. Recuperado desde <http://www.lemona.biz/SALUD%20Y%20CEMENTO-2/estudio%20cancer.pdf> el 10 de octubre de 2011.
14. Mastrandea C et al. (2005) Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 39(1):27-36. Recuperada desde <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v39n1/v39n1a06.pdf> el 10 de octubre de 2011.
15. Krewski D, Thorslund T, Withey J. (1989). Carcinogenic risk assessment of complex mixture. *Toxicology and Industrial Health* 5:851-867.
16. Denissenko M, Pao A, Tang M. (1996). Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274:430-432.
17. US Departmentt of Health and Human Services. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (Updates). Atlanta, GA, US.1995. Recuperado desde <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-p.pdf> el 10 de octubre de 2011.

18. Hoffelder D, Luo L, Burke N et al. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*, 112:389-397. Recuperado desde <http://www.pitt.edu/~biohome/Dept/pdf/1621.pdf> el 10 de octubre de 2011.
19. Pironon N, Puechberty J y Roize's G. (2010). Molecular and evolutionary characteristics of the fraction of human alpha satellite DNA associated with CENP-A at the centromeres of chromosomes 1, 5, 19 and 21. *BMC Genomics*, 11:195-203. Recuperado desde <http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/61/72/35/PDF/1471-2164-11-195.pdf> el 10 de octubre de 2011.
20. Schueler M and Sullivan B. (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genetic*, 7:301-313. Recuperado desde <http://www.genome.duke.edu/labs/sullivanlab/publications/SchuelerSullivan2006.pdf> el 10 de octubre de 2011.
21. Guttenbach M and Schmid M. (1994). Exclusion of specific chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocytes cultures. *Exp. Cell Res.*, 211:127-132.
22. Gieni, R. S., Chan, G. and Hendzel, M. J. (2008) Epigenetics regulate centromere formation and kinetochore function. *J. Cell. Biochem.*, 104,2027–2039.
23. Gisselsson, D. (2008) Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma*, 117, 511–519.
24. Zyss, D. and Gergely, F. (2009) Centrosome function in cancer: guilty or innocent? *Trends Cell Biol.*, 19, 334–346.
25. Ceppi, M. Gallo, F. and Bonassi, S. (2011) Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. *Mutagenesis*, 26(1), 247-252.
26. Anwar, A. (1997) Biomarkers of human exposure to pesticides. *Envir. Health Persp.* 105(4).

27. Angelieri, F. et al. (2010) Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Clin Oral Invest*, 14:669-674.
28. Thomas, P. Dhillon, V. and Fenech, M. (2011) Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 26(1):69-76.
29. Titenko-Holland, N. Moore, L. and Smith, M. (1994) Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mut. Res.* 312:39-50.
30. Piyathilake, C. Macaluso, M. Hine, R. (1995) Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency, and occurrence of micronuclei in epithelial cells of the buccal mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:751-758.

## Apéndices.

### Apéndice 1: Calculo de muestra poblacional.

Se utilizó la siguiente formula estadística:

$$n = \frac{Z^2 pq N}{NE^2 + Z^2 pq}$$

Dónde:

n = tamaño muestral.

Z = nivel de confianza (1,96 equivalente a 95%).

p = variabilidad positiva (0,5).

q = variabilidad negativa (0,5).

N = tamaño población (162).

E = precisión o error (0,05 equivalente a 5%).

Reemplazando, se obtiene un n = 114.



**Apéndice 3: Consentimiento Informado.****CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**TITULO DEL ESTUDIO:** “Correlación entre el recuento de micronúcleos y cantidad de cigarrillos consumidos por fumadores jóvenes de la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe.”

**INVESTIGADOR:** Víctor Castro Catalán, tesista de la Carrera de Tecnología Médica mención Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, de la Universidad de Valparaíso Campus San Felipe.

La presencia de micronúcleos en las células de la mucosa bucal es un indicador del daño del ADN, por lo que la información que se obtenga de esta investigación puede permitir relacionar el consumo de cigarrillos con el desarrollo de posibles daños genéticos.

El procedimiento del estudio no implica un daño para los participantes, el cual incluye:

- 1) Contestar un cuestionario sobre consumo de cigarrillos. Dicho cuestionario será aplicado por el investigador.
- 2) Toma de muestras (extendido de mucosa bucal).

La participación en el estudio va a ocuparle aproximadamente 10 minutos. Puede preguntar cualquier duda sobre el estudio o sobre su participación en este.

Su participación en el estudio es voluntaria; no tiene ninguna obligación de participar y puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando haya firmado este consentimiento.

Las muestras del estudio serán registradas con códigos para que no puedan relacionarse con usted. Su identidad no se publicará durante la realización del estudio, ni una vez que haya sido publicado. Toda la información del estudio será recopilada por el investigador y se mantendrá en un lugar seguro.

YO ..... declaro haber leído el documento y voluntariamente consiento en participar en este estudio.

VICTOR CASTRO C.

PARTICIPANTE

Fecha:.....

## Apéndice 4: Protocolo de Tinción.

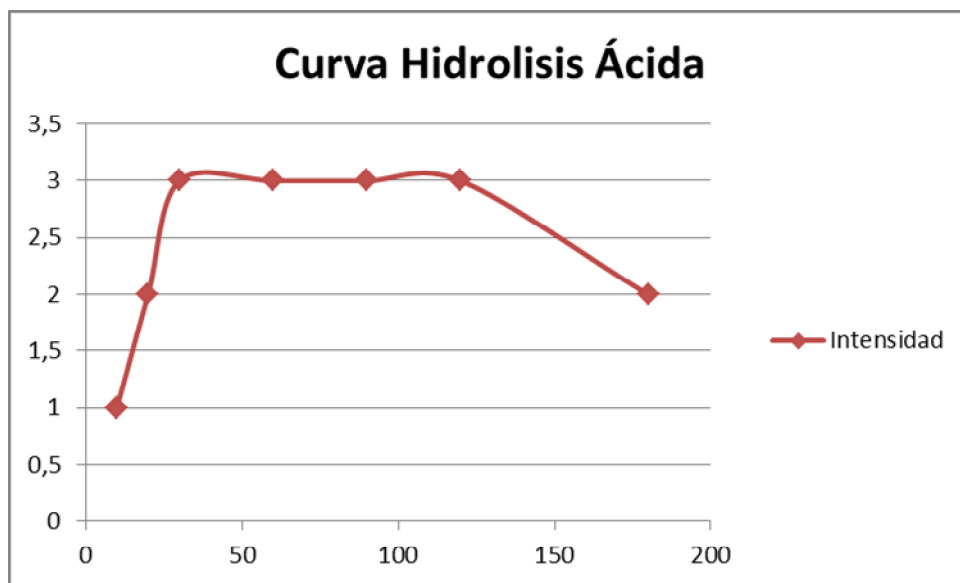
Método de Feulgen (modificado) para Ácidos Nucleicos:

1. Hidratación de los extendidos citológicos de mucosa bucal en agua destilada.
2. Hidrólisis de los extendidos con HCl 5N a temperatura ambiente por 60 minutos.\*
3. Lavado de los extendidos en agua corriente.
4. Lavado en agua destilada.
5. Sumergir los extendidos en Reactivo de Schiff por 30 minutos.\*\*
6. Lavado de los extendidos en Agua sulfurosa.\*\*\*
7. Lavado de los extendidos en agua corriente.
8. Tinción de los extendidos con Orange G por 3 minutos.
9. Lavado de los extendidos en OH 95° por 2 minutos.
10. Tinción de los extendidos con EA50 por 4 minutos.
11. Deshidratar los extendidos en alcoholes ascendentes, Aclararlos en xilol y Montar con resina sintética.

- \* El tiempo óptimo de hidrólisis se determinó experimentalmente. Se utilizaron 7 extendidos, cada uno con diferentes tiempos de hidrólisis. Se asignaron 3 valores para medir la intensidad: leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

Los extendidos fueron evaluados por los Médicos Anatómo-Patólogos Dra. Jeannie Slater y Dr. Arturo Escalona, y la Citotecnóloga Sra. T.M. Carmen Ferone, todos profesionales del Hospital Militar de Santiago, quienes constituyeron un panel de expertos con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de hidrólisis. Se obtuvieron los siguientes resultados, y la siguiente curva de hidrólisis.

Evaluador	10'	20'	30'	60'	90'	120'	180'
<b>JS</b>	+	++	+++	+++	++	+++	++
<b>AE</b>	++	+++	++	++	+++	++	+++
<b>CF</b>	+	++	+++	+++	+++	+++	++
<b>Final</b>	+	++	+++	+++	+++	+++	++



Para llevar a cabo la hidrólisis ácida controlada se utilizó HCl pro-análisis, marca Merck, cuyo peso molecular es de 36,45 g/mol, pureza del 37% y densidad de 1,19 g/mol.

Los cálculos para la preparación del reactivo a utilizar (HCl 5N) son los siguientes:

1 mol HCl..... 36,45 g HCl

5 moles HCl..... X

X= 181,25 g HCl

37 g de HCl..... 100 g de solución HCl comercial

181,25 gHCl..... X g de solución HCl comercial

X= 489, 87 g de solución de HCl comercial

1,19 g de solución HCl comercial.....1 ml de solución HCl comercial

489,87 g de solución HCl comercial..... X ml de solución comercial

X= 411 ml de solución comercial.

Para preparar un litro de HCl 5N, se tomaron 411 ml de solución comercial de HCl concentrado y se llevaron a un litro con agua destilada.

- \*\* Reactivo de Schiff:

Fucsina básica	1 g
Agua destilada	200 ml
Acido Clorhídrico 1 N	20 ml
Metabisulfito de Sodio	1 g
Carbón vegetal activado	0,1 g

Disolver cuidadosamente la Fucsina Básica en el agua destilada hirviendo. Enfriar a 50°C, filtrar y agregar el ácido clorhídrico. Enfriar a 25°C y agregar el Metabisulfito de Sodio. Dejar reposar la solución en la oscuridad durante 24 horas. Finalmente adicionar el carbón activado, agitar y filtrar. El resultado debe ser una solución incolora. Conservar en la oscuridad a 4°C en un frasco ámbar bien cerrado y completamente lleno.

- \*\*\* Agua Sulfurosa:

Agua destilada	100 ml.
Acido Clorhídrico 1 N	5 ml.
Metabisulfito de Potasio	5 ml.