

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTOS DEL AMBIENTE CONTAMINADO CON HUMO DE TABACO
SOBRE LA ESTABILIDAD CITOGÉNICA EN FELINOS**

Por

**María Erika ELERD MANSILLA
María Noel FERNÁNDEZ BENITOS**

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación

MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2021

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dra. Alejandra Mondino

Segundo Miembro (tutor):



Dr. Rody Artigas,

Tercer Miembro:



Dra. Alicia Decuadro

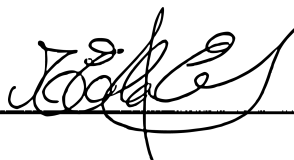
Cuarto Miembro (co-tutor):



Dra. Silvia Llambí

Fecha:

Autores:



Br. María Erika Elerd Mansilla



Br. María Noel Fernández Benitos

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a nuestro tutor el Dr. Rody Artigas por su colaboración y enseñanzas tanto a lo largo de este proyecto de investigación como en el aspecto personal.

A las familias que nos abrieron las puertas de su casa y nos permitieron tomar muestras de sus mascotas.

A la Facultad de Veterinaria por la formación dada y por reafirmar nuestra vocación.

A los funcionarios de Biblioteca y Hemeroteca de Facultad de Veterinaria por su ayuda en la búsqueda y corrección de la bibliografía.

A mi amiga y compañera María Noel por permitirme compartir con ella este proyecto e ir juntas en esta etapa.

A los amigos que la vida y la carrera me ayudaron a conocer, por su ánimo y consejo.

A mi familia, especialmente a mis padres por su amor incondicional y aunque ya no están entre nosotros su ejemplo de vida será siempre mi faro y guía.

A Selva y Tono por estar a mi lado en los momentos felices y más aún en los otros, por su apoyo y sostén.

A Rodrigo mi compañero de ruta e inspiración a ser mejor persona cada día.

A Guzmán por enseñarme a amar infinitamente y cuya llegada fue motor y motivo para la culminación de esta etapa.

María Erika Elerd Mansilla

A mi madre, Alba Benitos, a quien dedico este y cada uno de mis proyectos; responsable fundamental de que esto sea posible, gracias a su gran sacrificio y dedicación. Por apoyarnos, tanto a mí como a mi hermana, desde que estamos en este mundo hasta su partida física. Por su inmenso amor, paciencia, sabiduría y luz. Por acompañarnos y guiarnos siempre y estar presente eternamente con nosotras, gracias a su inmenso legado y amor inigualable. “Tu alma es mi razón, tu alma es la fuerza”.

A mi hermana y mejor amiga: Miriam Fernández Benitos, por su enorme paciencia y amor incondicional. Por alentarme, acompañarme, enseñarme y contenerme en todo este largo camino, y no permitirme bajar los brazos. GRACIAS por todo lo que sos!

A mis hermosos sobrinos Ismael y Umma, el mejor regalo que mi hermana me podría haber dado. A mi padre Roberto, y a mi cuñado, Rodrigo, el hermano que la vida me dió.

A Daniel, compañero incondicional, amigo y familia, gracias por el apoyo, paciencia, aprendizaje y contención durante estos años.

A todos mis amigos, que en este largo camino me ayudaron y contuvieron, y que son parte fundamental de mi vida.

A mi mejor amigo Colita, mi primer perro, quien me enseñó el amor, la comunicación y el respeto por los animales, quien estuvo presente desde mi niñez hasta que ingresé en esta casa de estudios.

A Demian, Luna Y Pelu, mis hijos peludos y mis primeros pacientes, quienes me enseñan día a día a ser mejor. Y a cada uno de los animales con los que he compartido mi vida, por su lealtad, sabiduría y compañerismo, especialmente a Manchita.

A nuestro tutor y amigo, Dr. Rody Artigas, por su enorme paciencia, compromiso y motivación.

A la Dra. Silvia Llambí, por su interés, apoyo y contención.

A toda la cátedra de Genética, por ayudarnos y brindarnos el lugar para trabajar en este proyecto y poder realizarlo. Especialmente al Lic. Eugenio Jara por las consultas estadísticas.

A cada uno de los gatitos que participaron en este proyecto, fundamentales para poder lograrlo. A sus familias, por la confianza y generosidad a la hora de tomar las muestras, y por todo el apoyo que nos brindaron desde el primer día.

A mi amiga y compañera de tesis, Erika Elerd, gracias por compartir este proyecto conmigo, un cierre hermoso para todo lo que hemos compartido, tanto dentro como fuera de Facultad. Y a Guzmancito, quien compartió este proceso con nosotras y llegó para traernos alegría, amor y motivación.

A la Dra. Perla Cabrera, quien fuera Decana de nuestra Facultad. Por haberme apoyado en un momento muy complicado en lo personal; por escucharme, aconsejarme, contenerme y preocuparse porque siguiera adelante a pesar de la adversidad.

A nuestra casa de estudio, Facultad de Veterinaria, Udelar, en donde crecimos, aprendimos, y construimos amistades y recuerdos que nos acompañarán toda la vida.

A nuestros docentes, bibliotecarios, ayudantes, funcionarios; fundamentales para nuestra formación académica y personal durante estos años.

María Noel Fernández Benitos

TABLA DE CONTENIDO.

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
SUMMARY	10
1.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1.1. Antecedentes históricos	11
1.2 Generalidades del tabaquismo en humanos	13
1.3 Efecto tóxico del humo de tabaco	14
1.4 Los animales de compañía como fumadores pasivos.	16
1.5. La boca y el epitelio de la mucosa bucal	18
1.6 Estabilidad citogenética como indicador de genotoxicidad.	22
1.7 Formación de micronúcleos.	24
1.8 Tinciones diferenciales utilizadas en la técnica TMMO	26
2. HIPÓTESIS	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 Animales	30
4.2 Toma de la muestra	31
4.3 Procesamiento de la muestra	31
4.4 Análisis estadístico	34
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	46
ANEXO	47
BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página.
Figura 1. Esquema de Epitelio plano estratificado queratinizado. Tomando de Gómez y Campos (2009) p. 115	21
Figura 2. Esquema de Epitelio plano estratificado paraqueratinizado. Tomando de Gómez y Campos (2009) p. 115	22
Figura 3. Esquema de Epitelio plano estratificado no queratinizado. Tomando de Gómez y Campos (2009) p. 115	23
Figura 4. Células del epitelio bucal en diferentes estadios del proceso de apoptosis.	37
Figura 5. Células del epitelio bucal con micronúcleos y falsos positivos. Tinción de Feulgen.	38
Figura 6. Células del epitelio bucal con alteraciones nucleares y del proceso de división celular.	38
Tabla 1: Datos de los animales a partir de los que se tomaron muestras para el presente trabajo.	31
Tabla 2: Criterio de clasificación celular del Test de Micronúcleos de la Mucosa Oral.	34
Tabla 3. Distribución de edades y sexos en los grupos de animales expuestos y no expuestos a humo de tabaco.	36
Tabla 4. Hallazgos citológicos en células de la mucosa oral de gatos expuestos y no expuestos a ambientes contaminados por humo de tabaco	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BCB	Buffer de Células Bucales
CEUA	Comisión de Ética en el Uso de Animales
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
FG	Factor de Genotoxicidad
HCl	Ácido Clorhídrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
TMMO	Test de micronúcleos en mucosa oral

,

RESUMEN

La planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) es originaria de América y se conoce desde la época precolombina, donde se le atribuían propiedades medicinales y embriagantes bajo diferentes formas de consumo. Hoy en día, la forma más frecuente de consumir tabaco es a través de cigarrillos, exponiendo a los fumadores activos y a las personas y animales que habitan ambientes contaminados con su humo (fumadores pasivos) a un gran número de sustancias tóxicas. El humo de tabaco es un factor de riesgo conocido tanto en animales como en el hombre, para enfermedades cardíacas, respiratorias y cáncer en diferentes órganos. Esto último, producto del efecto genotóxico de los componentes del humo de tabaco sobre los diferentes tipos celulares. El test de micronúcleos en células de la mucosa oral (TMMO) es un ensayo sensible, que permite evaluar el poder genotóxico de sustancias o ambientes, mediante la observación de anomalías nucleares, de la división celular y la formación de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa oral. Aún hoy en día no se ha establecido el efecto genotóxico de los ambientes contaminados con humo de tabaco en los gatos domésticos (*Felis catus*). En esta tesis se estudiaron mediante el TMMO siete gatos expuestos a ambientes contaminados con humo de cigarrillo y tres gatos controles no expuestos al mismo. Se logró adaptar el TMMO para la especie *Felis catus*, observándose una diferencia significativa de alteraciones celulares totales en los animales expuestos en relación a los animales controles ($P < 0.00001$). Asimismo, se observaron diferencias significativas entre los grupos para marcadores de apoptosis tardía (picnosis $P = 0.001$; cariolisis $P < 0.00001$), anomalías de la división celular (células binucleadas $P = 0.0002$), anomalías del núcleo (puentes nucleares $P = 0.0039$) y formación de micronúcleos ($P < 0.00001$). Los resultados presentados y discutidos en este trabajo, permiten concluir que los gatos que habitan ambientes contaminados con humo de tabaco presentan una mayor inestabilidad genómica en las células epiteliales de la mucosa oral que aquellos animales que viven en ambientes libres de mismo.

SUMMARY

Tobacco (*Nicotiana tabacum*) is a native American plant that has been known since pre-Columbian times. At that time, medicinal and intoxicant properties were attributed to it, under different routes of consumption. Today, the most frequent way of consuming tobacco is through cigarettes, exposing active smokers and people and animals that inhabit environments contaminated with their smoke (passive smokers) to a large number of toxic substances. Tobacco smoke is a known risk factor for cardiovascular and respiratory diseases as well as cancer in different organs in both animals and humans. The latter is a product of the genotoxic effect of the components of tobacco smoke on the different cell types. The micronucleus test for the oral mucosa (TMMO) is a sensitive test that allows the evaluation of the genotoxic power of substances or environments, by means of the detection of nuclear abnormalities, cell division and the formation of micronuclei in epithelial cells of the oral mucosa. Even today, the genotoxic effect of environments contaminated with tobacco smoke in domestic cats (*Felis catus*) has not been determined. In this thesis, seven cats exposed to environments contaminated with cigarette smoke and three control cats not exposed to it were studied using the TMMO. It was possible to adapt the TMMO for the *Felis catus* species, observing a significant difference in total cellular alterations in the exposed animals in relation to the control animals ($P < 0.00001$). Likewise, significant differences between the groups were observed for late apoptosis markers (pyknosis $P = 0.001$; karyolysis $P < 0.00001$), cell division abnormalities (binucleated cells $P = 0.0002$), nucleus abnormalities (nuclear bridges $P = 0.0039$) and formation of micronuclei ($P < 0.00001$). The results presented and discussed in this work allow us to conclude that cats that inhabit environments contaminated with tobacco smoke present greater genomic instability in their oral mucosa's epithelial cells than those that live in smoke-free environments.

1.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Antecedentes históricos

La planta del tabaco es originaria de América y el hombre la ha utilizado para su consumo desde hace alrededor de 2,000 años. Los primeros conocimientos sobre la combustión de la hoja de tabaco datan de remotas civilizaciones del continente americano. (Barrueco, Hernández y Torrecilla, 2003).

Los mayas, por ejemplo, lo utilizaban para varios fines, entre ellos religiosos y políticos como celebraciones, o acuerdos de paz luego de una guerra (Rubio Monteverde y Rubio Magaña, 2006). También lo utilizaban como medicamento, ya que se le atribuían propiedades curativas contra el asma, heridas producidas por la mordedura de animales, para controlar la fiebre, así como para afecciones de piel y digestivas (Rubio Monteverde y Rubio Magaña, 2006).

Los aztecas lo conocían como *yétl*. Lo utilizaban como medicina, y como elemento narcótico y embriagante (Rubio Monteverde y Rubio Magaña, 2006). Los indígenas del Caribe por su parte, consumían el humo de tabaco por medio de una caña llamada tobago (pipa) (Secretaría de Salud, 2001).

En 1492, cuando Cristóbal Colón llegó a las tierras de los indios en las Antillas descubrió el tabaco, ya que muchos de los presentes que recibió tenían sus hojas. Luego, gracias a las crónicas de Fray Bartolomé de las Casas y el informe del fraile Ramón Pané al rey Carlos V en el año de 1497, donde destacan las propiedades medicinales de las hojas de tabaco, se conoce inicialmente en Europa. En 1497, Américo Vespucio lo señalaba como masticatorio por los indígenas en una de las islas de Venezuela. En 1510, los hombres de Colón llevaron las primeras semillas a España y en 1545 se notificó que los indios Ixoquis de Canadá ya lo consumían (Rubio Monteverde y Rubio Magaña, 2006).

En 1560, Jean Nicot, embajador de Francia en Portugal, y entusiasta partidario del uso de tabaco, fue el precursor en ambos países de difundir su cultivo y exponer sus propiedades medicinales. Recibiendo posteriormente la planta el nombre nicotiana, así como su alcaloide, el nombre nicotina. (Secretaría de Salud, 2001). La planta se hizo popular en las cortes del viejo continente, difundándose rápidamente con el tiempo, luego de su cultivo (Pinillos, Quesquén, Bautista y Poquioma, 2005). Hacia finales del siglo XVI su uso se había propagado por el mundo, gracias a que los marinos europeos lo habían llevado a varios países. (Rubio Monteverde y Rubio Magaña, 2006).

Los soldados también tuvieron una considerable contribución al propagar el consumo de cigarrillo. Se describe que en 1832 se elaboró el primer cigarrillo cuando los soldados de la guerra entre Turquía y Egipto rellenaron los cartuchos de sus fusiles con tabaco picado. Con el tiempo, el consumo de cigarrillos se hizo masivo (Barrueco et al., 2003)

. En la Segunda Guerra Mundial el consumo de tabaco era tan importante, que fue considerado, junto con los alimentos, un bien de primera necesidad para abastecer a las tropas. De igual forma ocurrió en la Guerra Civil española (Pinillos et al., 2005).

A principios de los años 40, comenzaron a relacionarse patologías respiratorias y pulmonares al consumo de tabaco. Desde ese momento, aumentaron las investigaciones sobre el tema. Como resultado se obtuvieron datos epidemiológicos y médicos que llevaron a que el tabaquismo fuera una preocupación en materia de salud en todo el mundo. En la década del 50, surgieron los primeros estudios que sostenían la existencia de una relación entre el consumo del tabaco y el cáncer del pulmón (Nachón, García, Nachón, Hernández y Hernández, 2010).

Hoy en día el tabaquismo es considerado una preocupación mayor. Según la Organización Mundial de la Salud el número de fumadores a nivel mundial asciende a una cifra de 1.100 millones, lo que representa aproximadamente un tercio de la población mayor de 15 años. Cuando estudiamos estas cifras por sexos un 47% de los varones y un 11% de las mujeres en este rango de edad consumen una media de 14 cigarrillos/día, lo

que supone un total de 5.827 billones de cigarrillos al año. En ambos sexos, el segmento de edad en el que se encuentra una mayor proporción de fumadores es el comprendido entre los 30 y 49 años. Según el último informe del Banco Mundial, el 74% de todos los cigarrillos se consumen en los países con ingresos medios y bajos. Globalmente, las mayores prevalencias de consumo se alcanzan en Europa y Asia central, mientras que las más bajas se encuentran en el África subsahariana (National Institute for Clinical Excellence (NICE), 2002).

1.2 Generalidades del tabaquismo en humanos

En un estudio publicado recientemente por González-Martín, Richardus Kraakman, Pérez, Lebrero y Muñoz, 2020, sobre la contaminación del aire interior, se estudiaron diferentes tipos de contaminantes ambientales, en espacios cerrados, y su impacto en la salud, afirmándose que:

- a) La mala calidad del aire interior es un factor importante que contribuye a los problemas de salud mundial, debido a que influye en la génesis de muchas enfermedades respiratorias, alergias y enfermedades cancerosas.
- b) El problema de la exposición a la contaminación del aire interior se ha vuelto más evidente en los últimos años, ya que las personas pasan más del 80% del tiempo en interiores (hogares, oficinas, medios de transporte, etc.).

La contaminación y exposición al aire de baja calidad, es la amenaza ambiental más crítica para la salud pública en todo el mundo según la Organización Mundial de la Salud. Se estima que cada año 4,3 millones de personas mueren por enfermedades que se atribuyen a la contaminación del aire interior. En este aspecto, el humo de tabaco es un tóxico dominante frente a otros contaminantes en ambientes interiores (González-Martín et al., 2020).

El tabaco es el factor de riesgo individual más importante relacionado con enfermedad en el mundo (Mozaffarian et al., 2012), siendo considerado la

principal causa de muerte evitable para el humano. Solo en Uruguay es responsable de 5000 muertes cada año (Abascal, Esteves, Goja, González, Lorenzo, y Sica, 2013). Organizaciones internacionales atribuyen al tabaco el 30% de todos los decesos producidos por cáncer, a excepción del cáncer de pulmón donde el porcentaje escala al 80% (Tarver, 2012).

Si bien, el humo de tabaco es un factor de riesgo conocido para el cáncer en diferentes órganos (Tarver, 2012), también es considerado un factor de riesgo mayor en enfermedades cardíacas y respiratorias, principales causas de muerte asociadas al tabaquismo en Uruguay (Abascal et al., 2013).

El tabaco es perjudicial en todas sus modalidades y no existe un nivel seguro de exposición al mismo (Organización Mundial de la Salud, 2019). Fumar cigarrillos es la forma de consumir tabaco más extendida en todo el mundo, y los usuarios son considerados fumadores activos. El tabaquismo pasivo, en cambio, consiste en la inhalación por no fumadores de humo de combustión derivados del tabaco para cigarrillos (Richter, Bishop, Wang y Swahn, 2009).

1.3 Efecto tóxico del humo de tabaco

Para elaborar tabaco se utiliza como materia prima la hoja de *Nicotiana tabacum* la cual se mezcla con sustancias aromatizantes y aditivos para mejorar el sabor. Esta mezcla se envasa dentro de un cilindro de papel al que se le coloca en un extremo un filtro de celulosa, de mayor o menor porosidad, y que puede, además, contener otros materiales como carbón vegetal, etc. (Abascal et al., 2013; Arul, Smitha, Masilamani, y Akshatha , 2018).

El componente químico principal de la hoja de tabaco, y que la hace adictiva, es la nicotina, sustancia que farmacológicamente tiene un efecto doble, pues resulta estimulante y sedante a la vez. Es adictiva porque produce una sensación placentera al activar la vía dopaminérgica y los receptores colinérgicos - nicotínicos del sistema nervioso central. (Rubio Monteverde y Rubio Magaña, 2006).

Los componentes químicos de las hojas del tabaco son los responsables de las sustancias que aparecen en el humo de combustión del cigarrillo. Más de 4000 de estos compuestos han sido identificados y algunos de ellos pertenecen al “Grupo I de cancerígenos humanos” como el benceno, cadmio (Cd), arsénico (As), níquel (Ni), cromo (Cr), 2-naftil-amino, cloro vinil, 4 aminobifenil y belenio (Be) (Ruiz, Gómez, Rubio, Revert y Hardisson, 2004).

Algunos trabajos sostienen que cuando se utilizan piretroides como insecticidas en las plantaciones de tabaco, pueden encontrarse residuos de los mismos en el humo del cigarrillo (Cai, Liu, Zhu, y Su, 2002; Smith, Livingston y Doolittle, 1997), lo que agregaría un compuesto tóxico adicional. Asimismo, se le agregan productos para dar sabor y aroma al cigarro, que al momento de la combustión generan aproximadamente 4000 benzopirenos, los cuales son carcinogénicos. Por otro lado, el papel del cigarrillo contiene celulosa y disulfito de potasio los cuales también son causantes de procesos cancerígenos (Vilchez Oliva, 2017).

La combustión del tabaco genera dos vías de intoxicación. Por un lado, a través de la maniobra de aspiración directa por parte del fumador (corriente principal), y por otro, a través de la inhalación pasiva del humo (corriente lateral), producto de la combustión espontánea del cigarrillo (85%) y del humo exhalado por el propio fumador (15%) (Ruiz et al., 2004; Bello, Michalland, Soto, Contreras, y Salinas, 2005).

El humo inhalado por el fumador pasivo a través de la corriente lateral es particularmente nocivo. Varios factores contribuyen a ello, por una parte, contienen numerosas sustancias citotóxicas (muchas de ellas en mayor cantidad que en la corriente principal) como: metales pesados, nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados como el benzopireno, aminas aromáticas, gases venenosos (monóxido de carbono), trazas de pesticidas e incluso elementos radioactivos como el polonio 210 (Nelson, 2001). Por otra parte, las partículas son más pequeñas, por lo que pueden alcanzar las vías aéreas profundas con gran éxito (Flórez, 2001).

Las nitrosaminas y el benzopireno tienen la capacidad de unirse al ADN formando aductos (productos formados por la unión de moléculas), que

de no repararse, podrían inducir a errores de copia durante la duplicación del ADN (Ruiz et al., 2004). Los metales pesados (Cd, Be, As, Ni y Cr) potencian el efecto, puesto que inhiben los mecanismos de reparación del ADN (Hartwig y Schwerdtle, 2002). El Be es un competidor del magnesio (Mg), por lo que actúa adicionalmente inhibiendo a las enzimas Mg dependientes como la desoxi-timidin quinasa, fundamental para la síntesis de ADN (Ruiz et al., 2004).

Finalmente, los radicales libres inhalados con el humo así como los producidos en el organismo en respuesta al monóxido de carbono, inducen daños diversos sobre el ADN, incluyendo la ruptura de la molécula (Zorrilla García, Eirez Izquierdo e Izquierdo Expósito, 2004).

La exposición al humo de tabaco como fumador pasivo también trae grandes consecuencias para la salud. Fumar en espacios cerrados provoca que tanto fumadores como no fumadores estén perjudicialmente expuestos. La contaminación del aire en interiores, conduce a una importante morbilidad y mortalidad respiratoria en los seres humanos. El humo de tabaco ajeno, causa anualmente más de 1,2 millones de muertes prematuras y graves trastornos cardiovasculares y respiratorios (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Casi la mitad de los niños respiran habitualmente aire contaminado por humo de tabaco en los lugares públicos, y 65.000 mueren cada año por enfermedades atribuibles a esta exposición. En ambientes contaminados también aumenta el riesgo de muerte súbita de los lactantes; complicaciones durante el embarazo y bajo peso en el recién nacido (Organización Mundial de la Salud, 2019).

1.4 Los animales de compañía como fumadores pasivos.

En las grandes ciudades, los animales de compañía cohabitan con el hombre en pequeños espacios. La contaminación del aire en interiores, trae consecuencias importantes en estos animales. En los perros el tabaquismo está estrechamente relacionado con el cáncer nasal y de pulmón (Smith et al., 2017). Además, en perros y gatos que conviven con personas fumadoras

aparecen irritación en los ojos y conjuntivitis, bronquitis, asma y alteraciones cardiovasculares con mayor facilidad. (Smith et al., 2017).

Entre el 2015 y el 2017 se han realizado censos poblacionales que estiman la existencia de 66 millones de gatos en Europa y 77 millones en Estados Unidos. Los gatos domésticos están considerados, al igual que los perros, integrantes del núcleo familiar (Llambí, y Arruga 2018). El vínculo estrecho que se mantiene entre humanos y felinos resulta en una exposición similar al humo de tabaco y a la contaminación de piel y textiles (Smith et al., 2017). La permanencia dentro del hogar por largos periodos de tiempo, permite que alcancen un nivel de exposición muy superior al de su propietario. La incorporación de humo de tabaco ambiental puede ser inhalatoria, transdérmica o por vía oral mediante contaminantes presentes en el pelo al momento del acicalado. Esta última vía cobra especial importancia en los gatos, debido al hábito de acicalamiento que tiene esta especie (Bertone, Snyder y Moore, 2002; Smith et al., 2017).

La nicotina, principal componente adictivo del tabaco, también es liberada en la corriente lateral. Su metabolito, la cotinina, puede aislarse de la sangre, orina y saliva, por lo que constituye un marcador muy eficiente que da fe de la exposición de un individuo al humo de tabaco (Ruiz et al., 2004). Niveles significativos de cotinina han sido identificados en la orina de perros y gatos, así como en el pelo de perro y en la sangre de las aves de compañía (Cray, Roskos, y Zielezienski-Roberts, 2005; McNiel et al., 2007; Bertone-Johnson, Procter-Gray, Gollenberg, Ryan, y Barber, 2008; Knottenbelt, Bawazeer, Hammond, Mellor, y Watson, 2012). Esto demuestra altos niveles de exposición de las mascotas a los compuestos nocivos del humo, comportándose como verdaderos fumadores pasivos.

Si bien se ha documentado el efecto nocivo de la exposición de las mascotas al humo de tabaco, no hay gran cantidad de trabajos al respecto. En un estudio de caso-control (Bertone et. al 2002) demostraron que en gatos con más de 5 años de exposición pasiva al humo de tabaco existe un riesgo 3.2 veces superior a padecer linfoma maligno, por incremento de la expresión del oncogén p53 (Smith et al., 2017) comparado con aquellos gatos que viven en

un ambiente de aire puro. Tendencias similares fueron reportadas en la misma especie para el carcinoma oral de células escamosas y el carcinoma de tráquea (Bertone, Snyder, y Moore, 2003; Jelinek y Vozkova, 2012).

1.5. La boca y el epitelio de la mucosa bucal

La cavidad oral se considera como la porción inicial del sistema digestivo. Anatómicamente hablando, la boca se divide en dos partes, el vestíbulo y la cavidad bucal propiamente dicha. Los límites externos del vestíbulo comprenden los labios y mejillas; mientras que los límites de la cavidad bucal propiamente dicha hacen referencia a los rebordes alveolares y encías. Al momento de enmarcar los límites de la boca, el límite superior está dado por el paladar duro y el blando; como límite inferior encontramos al piso de la boca y, por último, los pilares de las fauces y las amígdalas forman el límite posterior (Carrillo, 2017).

La cavidad oral cuenta con un revestimiento propio, una membrana mucosa húmeda que tapiza la cavidad, que lleva el nombre de mucosa bucal, ésta cubre toda la cavidad oral y se compone de dos tipos diferentes de tejidos: el epitelio y corion. El epitelio está formado por tejido epitelial de origen ectodérmico y conforma la capa superficial. El corion, es una capa de tejido conectivo subyacente que se deriva de las células de la cresta neural. Dichas capas se unen por medio de una membrana basal. A nivel del tejido conectivo se observan prolongaciones hacia el tejido epitelial denominadas papilas coriales, que se interdigitan con las crestas epiteliales,provenientes del epitelio, y entre ambos, se evidencia la membrana basal (Carrillo, 2017).

Las células epiteliales se encuentran estrechamente unidas entre sí, siendo la barrera primaria entre el medio bucal y los tejidos profundos. El epitelio de la mucosa bucal es de tipo plano estratificado,sub clasificándose a su vez,según el grado de queratinización en:queratinizado, paraqueratinizado o no queratinizado (Vilchez Oliva, 2017).

La mucosa de la cavidad oral puede clasificarse de acuerdo a su localización y función en: mucosa de revestimiento, mucosa masticatoria y mucosa especializada o sensitiva. En zonas de la boca donde las fuerzas de fricción y deslizamiento son mayores (tales como la encía, la superficie dorsal de la lengua o el paladar duro) la mucosa es masticatoria y el epitelio que la conforma es epitelio plano estratificado paraqueratinizado o queratinizado, el corion puede ser más o menos fibroso. En el resto de la boca predomina la mucosa de revestimiento la cual rara vez recibe el impacto directo del acto masticatorio por lo que el tipo epitelial predominante es el epitelio plano estratificado no queratinizado (Vilchez Oliva, 2017, Gómez y Campos, 2009).

La mucosa especializada o sensitiva se presenta en la superficie dorsal de la lengua porque la mayoría de las papilas linguales poseen botones gustativos encargados de recibir estímulos para captar las diferentes sensaciones gustativas (Gómez y Campos, 2009).

El epitelio plano estratificado queratinizado, que como decíamos conforma gran parte de la mucosa masticatoria, está constituido principalmente por los queratinocitos que representan el 90% de la población celular. Según la morfología de las células, en este tipo epitelial se distinguen cuatro capas, que de la más profunda a la más superficial son: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo (Vilchez Oliva, 2017) (figura 1).

El estrato basal o germinativo, está constituido por una capa de células de forma cúbica o cilíndrica. Se caracterizan por tener un núcleo redondo u oval con un citoplasma intensamente basófilo. Las células del estrato basal se conectan a la membrana basal mediante hemidesmosomas y puntos de anclaje. Al ser células progenitoras es frecuente observar figuras mitóticas. En este estrato se pueden encontrar también melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans (Vilchez Oliva, 2017).

El estrato espinoso está formado por tipos celulares más grandes, de morfología esférica o algo más elíptica. Sus núcleos son algo más redondeados, más o menos pequeño con un citoplasma ligeramente basófilo. También se encuentran melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans (Vilchez Oliva, 2017).

El estrato granuloso está formado por dos o tres capas. Las células se ven algo más grandes y aplanadas con un núcleo pequeño de cromatina densa. La capa de células granulosas es la zona que comienza la degeneración del núcleo y del resto de los organelos celulares (Vilchez Oliva, 2017).

El estrato córneo se encuentra constituido por células aplanadas que no presentan núcleo y cuyo citoplasma es altamente acidófilo. La célula queratinizada se torna una “escama”, siendo así resistentes al daño mecánico y a los solventes químicos (Vilchez Oliva, 2017).

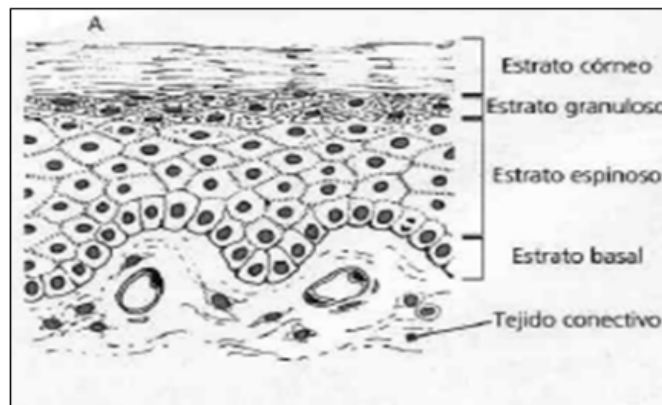


Figura 1. Esquema de Epitelio plano estratificado queratinizado. Tomando de Gómez y Campos (2009) p. 115

El epitelio plano estratificado paraqueratinizado: Es similar al epitelio queratinizado en los estratos basal, espinoso y granuloso (figura 2). Las principales diferencias a nivel de las células del estrato córneo superficial, es que éstas conservan sus núcleos y algunos organelos celulares, hasta el momento de su descamación. Los núcleos se presentan picnóticos con cromatina densa (Vilchez Oliva, 2017).

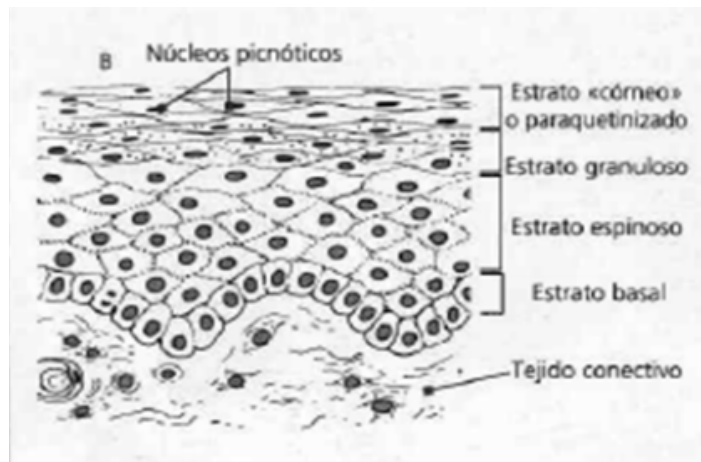


Figura 2. Esquema de Epitelio plano estratificado paraqueratinizado. Tomando de Gómez y Campos (2009) p. 115

El epitelio plano estratificado no queratinizado se diferencia principalmente con el epitelio queratinizado por no producir la capa superficial córnea y carecer, además, del estrato granuloso. Sus capas se componen por: capa basal, intermedia y superficial (Vilchez Oliva, 2017) (figura 3).

Capa basal: las células son de características similares a las descritas anteriormente. La capa intermedia: las células son de forma poliédrica con núcleo redondo de cromatina laxa, y citoplasma poco basófilo. Las cuales se encuentran conectadas entre sí por desmosomas. La capa superficial: está constituida por células aplanadas, nucleadas, de aspecto normal.

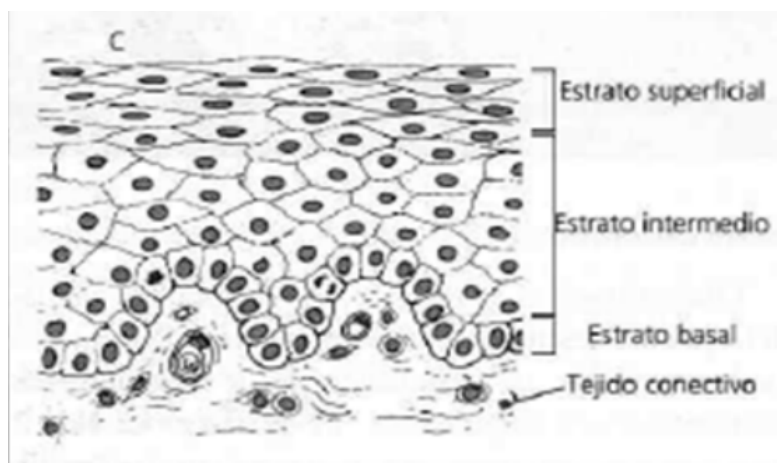


Figura 3. Esquema de Epitelio plano estratificado no queratinizado. Tomando de Gómez y Campos (2009) p. 115

Aprovechando la propiedad descamativa de los epitelios estratificados la citología exfoliativa surge como método diagnóstico de importancia para el estudio de ciertas enfermedades (Vilchez Oliva, 2017). Asimismo, constituyen una valiosa herramienta para el monitoreo de toxicidad ambiental, mediante la evaluación de la estabilidad citogenética (Thomas et al., 2009).

Existen enfermedades infecciosas, pre neoplásicas, sistémicas y neoplásicas que afectan a la mucosa bucal presentando cierta predilección por un sustrato tisular (Carrillo, 2017). La mucosa bucal es la más propensa a desarrollar neoplasias y lesiones pre-neoplásicas ya que en esta zona es que el humo de tabaco se encuentra en contacto estrecho (De Geus et al., 2018)

1.6 Estabilidad citogenética como indicador de genotoxicidad.

El humo de tabaco presenta un gran efecto genotóxico sobre las células que las predisponen a transformarse en cancerígenas. Los compuestos tóxicos del humo producen por diferentes mecanismos roturas en las cadenas de ADN (incluso fragmentación por daño oxidativo), inhibición de síntesis de ADN y bloqueo de los mecanismos de reparación del daño, entre otros efectos (Hartwig et al., 2002; Ruiz et al., 2004; Zorrilla et al., 2004).

La exposición a agentes con un posible efecto genotóxico, ya sean éstos de naturaleza física o química (clastógenos), puede producir anomalías cromosómicas y un aumento en el intercambio de cromátidas hermanas. Mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas podemos detectar los cambios en el número y la estructura de los cromosomas, siendo indicadores de exposición a genotóxicos y de efectos mutagénicos (Solans y Hernández, s.f.). Si bien las alteraciones pueden detectarse por medio de la microscopía óptica, este, resulta un test sensible pero laborioso, que requiere de cultivo celular.

El test de micronúcleos en la mucosa oral (TMMO) es una técnica altamente sensible, utilizada para evaluar la estabilidad genómica de los individuos expuestos a contaminantes ambientales. Esta prueba se desarrolló como un método citogenético cuantitativo para evaluar la frecuencia de daño cromosómico in vivo en células nucleadas (Silva et al., 2012; Rodrigues, Faria, Pimenta, Perez y Almeida Junior, 2020). Su sensibilidad es comparable a los ensayos de aberraciones cromosómicas (Schmid, 1975).

El ensayo de micronúcleos está universalmente validado. Es muy práctico, accesible tecnológicamente, económico rápido y confiable. Se lo considera muy útil para evaluar la inestabilidad genética estimulada por agentes genotóxicos; sin embargo, no debe dejar de considerarse que tiene poca utilidad en células con una tasa baja de división celular (Zalacain, Sierrasesúмага y Patiño, 2005; Jimenez, 2019).

Las células pertenecientes a la mucosa de la cavidad oral, poseen una baja capacidad de reparación del ADN, si las comparamos con otras células, como por ejemplo los linfocitos de la sangre periférica. Por lo mismo, nos pueden dar una noción más precisa sobre los sucesos de la inestabilidad genómica en los tejidos epiteliales (De Geus et al.,2018). La técnica implica un exfoliado epitelial de la mucosa vestibular y la tinción con diferentes colorantes (Thomas et al., 2009). Ofrece grandes potencialidades en lo que respecta a medir el daño en el ADN (micronúcleos y puentes nucleares), defectos citogenéticos (células binucleadas), proliferación (frecuencia de células

basales) y apoptosis (cromatina condensada, cariolisis, cariorrexis y picnosis) (Thomas et al., 2009).

Los micronúcleos, son estructuras derivadas del núcleo de las células, separados y más pequeños que el mismo. Son el resultado de cromosomas que se han fragmentado o eliminado del núcleo principal durante el proceso de la mitosis (Pradeep et al., 2014; Ramos, Cury, Scapulatempo Neto, Marques y Silveira, 2014; Arul et al., 2018). Microscópicamente, un micronúcleo se observa como una estructura redondeada de cromatina, con una intensidad de tinción similar o más débil que la del núcleo principal. Presenta un borde claro (lo que sugiere una membrana nuclear), y son de ubicación intracitoplasmática, con un diámetro inferior a 1/5 del núcleo principal (diámetro de núcleo celular promedio: 6 micras) (Rodríguez et al., 2020).

Dado que la mayoría de los procesos oncológicos en humanos tienen origen epitelial, la evaluación de la frecuencia de micronúcleos es un método viable para la definición de riesgo de su padecimiento (De Geus et al., 2018).

1.7 Formación de micronúcleos.

La formación de micronúcleos, tiene lugar, comúnmente, días o semanas después del contacto con el agente cancerígeno, y son un reflejo del daño cromosómico. Por lo mismo se lo considera un marcador temprano de carcinogénesis. Los mecanismos celulares por los que se forman los micronúcleos en la célula mitótica se pueden clasificar principalmente en aquellos de degradación cromosómica o en los de disfunción del aparato mitótico. En el primer caso los clastógenos o agentes mutagénicos dan lugar a roturas en los cromosomas que producen fragmentos cromosómicos los cuales se incluyen en los micronúcleos (Jimenez, 2019).

En el caso de las disfunciones del aparato mitótico los agentes aneugénicos (aquellos responsables de las alteraciones numéricas en los cromosomas) afectan la formación del aparato mitótico, a causa de esto, algunos cromosomas enteros quedan rodeados por la envoltura nuclear

formando micronúcleos. En este caso, a diferencia del anterior (fragmentación cromosómica) los micronúcleos tienen cromosomas completos (Jimenez, 2019).

Además de los mecanismos explicados anteriormente otra causa posible de formación de micronúcleos es la rotura de puentes anafásicos. La causa de esta rotura puede ser por cromátidas dicentricas, anillos cromosómicos fusionados o unión de cromátidas hermanas (Jimenez, 2019).

La presencia de micronúcleos no siempre significa la pérdida de material genético, ya que también pueden estar dados por la amplificación de ADN. Esto puede presentarse en tumores durante la amplificación de oncogenes, estas estructuras cromosómicas se replican auténticamente y son acéntricas siendo llamadas “Cromosomas dobles diminutos”. Estos cromosomas dobles diminutos son removidos del núcleo por regulación celular dando lugar a un micronúcleo que se origina de un brote de la membrana nuclear durante la fase S donde se produce la replicación o síntesis del ADN (Jimenez , 2019).

Existen factores que pueden influenciar el número de micronúcleos presentes en una célula, incluso éstos se pueden encontrar de modo espontáneo. La prevalencia media de células que presentan micronúcleos, en poblaciones humanas se encuentra generalmente entre 0 a 0.9% (Dehghan Nezhad, Jalayer Naderi y Semyari 2020; Jimenez, 2019). Sin embargo, entre los factores que pueden aumentar el número de micronúcleos, debemos tener en cuenta la edad, el género, la exposición diaria a agentes de naturaleza genotóxica (contaminantes ambientales, metales pesados, radiación, drogas, químicos venenosos), hábitos alimenticios, consumo no alimentario (fumar y beber), lesiones por radicales libres, inflamación crónica, quimioterapia, afecciones preneoplásicas o neoplásicas, (Zalacain et al., 2019), además de una gran cantidad de enfermedades genéticas, infecciones y deficiencias nutricionales (Jimenez, 2019)

1.8 Tinciones diferenciales utilizadas en la técnica TMMO

Se ha demostrado un cierto número de falsos positivos o falsos negativos al hacer uso de tinciones no específicas para ADN en la técnica de micronúcleos de mucosa oral. El tipo de tinción está fuertemente relacionada a la frecuencia de micronúcleos observada. Varios investigadores han concluido que el método más confiable para la evaluación de micronúcleos es la técnica de Feulgen siendo ésta una tinción específica para ADN (Dehghan et al., 2020).

Brevemente, la tinción de Feulgen se basa en el uso de una hidrólisis ácida débil la cual es suficiente para extraer el ARN que desaparece, pero no así el ADN. En esta técnica la cantidad de ADN es proporcional a la cantidad de tinción lo que permite determinar la cantidad de material nuclear que contienen las células (Diniz Freitas, García García, Crespo Abelleira, Martins Carneiro y Gándara Rey, 2004).

En concordancia con los resultados de De Geus et al., (2018), Metgud y Neelesh (2018) concluyeron que las tinciones no específicas de ADN tales como Giemsa o Romanowsky enmascaran el conteo de micronúcleos y tienden a presentar una media más alta.

Las causales por las que el conteo de micronúcleos tiende a ser mayor al usar técnicas de tinción no específicas para ADN se explican por Metgud y Neelesh (2018):

- Malinterpretación de anomalías nucleares como cariorrexis, cariólisis, cromatina condensada y células binucleadas como si fueran micronúcleos.
- Formación de gránulos de queratina que son hallados en células degeneradas con anomalías nucleares. Estos cuerpos redondeados formados a partir de daño celular no contienen ADN, pero pueden ser contados como micronúcleos.
- Contaminación bacteriana y detritos.

- Otros gránulos pequeños que se asemejan a micronúcleos pero pueden ser diferenciados por el índice de refractariedad y la intensidad del color.

A pesar de su gran utilidad, el TMMO no ha sido muy utilizado en animales domésticos, siendo necesaria su adaptación a las diferentes especies. De igual manera, no es claro el efecto genotóxico que el ambiente contaminado con humo de tabaco podría tener en los gatos. Por lo tanto, en esta tesis, se plantea evaluar las alteraciones en las células epiteliales de la mucosa oral en gatos expuestos y no expuestos a ambientes contaminados con humo de tabaco mediante el TMMO.

2. HIPÓTESIS

La inestabilidad citogenética de las células de la mucosa oral es mayor en gatos expuestos a ambientes contaminados con humo de tabaco que en aquellos que habitan ambientes libres del mismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar los niveles de inestabilidad citogenética en gatos de ambientes contaminados con humo de tabaco y ambientes libres de él, mediante el test de micronúcleos en la mucosa oral.

3.2 Objetivos específicos

- a) Adaptar el TMMO a la especie felina.
- b) Obtener células epiteliales de la mucosa oral de felinos expuestos y no expuestos a ambientes contaminados por humo de tabaco.
- c) Evaluar la presencia de alteraciones nucleares y de la división celular en las células epiteliales de la mucosa oral.
- d) Comparar la expresión de los marcadores de inestabilidad citogenética entre los felinos que habitan y los que no habitan hogares fumadores.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

Se analizaron 10 felinos (*Felis catus*), de ambos sexos, siete provenientes de ambientes contaminados con humo de tabaco y tres de ambientes libres del mismo. Todos los animales provenían de la ciudad de Montevideo - Uruguay, y no tenían acceso al exterior. Los animales utilizaban collar antipulgas o pipetas, colocados como mínimo un mes antes del muestreo y no habían sido sometidos a tratamientos antiparasitarios internos ni a otro manejo médico en los 30 días previos al muestreo. En la tabla 1 se indican los datos de los animales utilizados en este trabajo.

Tabla 1: Datos de los animales a partir de los que se tomaron muestras para el presente trabajo.

Control/ expuesto	Nombre	Sexo	Edad (años)	Lugar de residencia	Hábitos de fumar de sus propietarios
Expuesto	Panqueca	Hembra	1	Montevideo	9 cigarrillos/ día. Fuma dentro del hogar
Expuesto	Luna	Hembra	14	Montevideo	9-10 cigarrillos /día. Fuma dentro del hogar
Expuesto	Fede	Macho	6	Montevideo	20 cigarrillos /día. Fuma dentro del hogar
Expuesto	Super	Hembra	6	Montevideo	20 cigarrillos /día. Fuma dentro del hogar
Expuesto	Moca	Hembra	5	Montevideo	Fuma 15-20 cigarrillos/día. A veces también marihuana y habanos dentro del hogar
Expuesto	Bartola	Hembra	4	Montevideo	5-6 cigarrillos /día. Fuma dentro del hogar
Expuesto	Cocoa	Hembra	7	Montevideo	5-6 cigarrillos /día. Fuma dentro del hogar
Control	Nita	Hembra	12	Montevideo	No fuma
Control	Nepalí	Hembra	5	Montevideo	No fuma
Control	Umbiau	Macho	4	Montevideo	No fuma

4.2 Toma de la muestra

Las muestras de las células de la mucosa oral, fueron tomadas con un cepillo citológico (citobrush), mediante suave raspado de la cara interna de cada una de las mejillas de los animales. El cepillo fue depositado en un tubo estéril, conteniendo Buffer de células bucales (BCB) (anexo), y rotado por la pared del tubo para desprender las células epiteliales de la mucosa oral.

Las muestras fueron transportadas en refrigeración, a 4 °C, al laboratorio del Área Genética, donde se procesaron de inmediato. Las muestras fueron codificadas en orden consecutivo según se fueron colectando. La toma de las muestras se realizó según protocolo aprobado por la CEUA (CEUA N° 805).

4.3 Procesamiento de la muestra

Las células fueron lavadas tres veces mediante centrifugado (800 rpm, 10 min) y resuspensión en suero fisiológico para eliminar bacterias y detritos. Las muestras fueron fijadas en el fijador Carnoy (3:1, metanol - ác.acético) y almacenadas en la heladera hasta su procesamiento. La noche anterior a su tinción, se realizaron las preparaciones microscópicas, extendidos celulares, mediante goteo de 50µL de la suspensión celular en láminas portaobjetos. Por último, se dejaron secar al aire hasta la mañana siguiente para que las células queden bien adheridas al vidrio .

La mañana siguiente, los preparados fueron tratados con la técnica de tinción de Feulgen, modificada en esta tesis para la especie felina, y posteriormente con la coloración de contraste verde luz.

Las adaptaciones que realizamos sobre la Técnica de tinción de Feulgen fueron:

- Se aumentó el tiempo de acción del reactivo de Schiff's, de una hora a toda la noche.
- Utilizamos metabisulfito de Sodio en el baño sulfuroso, en lugar de metabisulfito de Potasio.

Estas adaptaciones nos permitieron obtener una adecuada tinción, ya que con la técnica original no lo conseguimos.

El protocolo utilizado fue el siguiente: Se prepararon las láminas dejándolas secar toda la noche previa a la tinción. Al día siguiente se sumergieron en Etanol 50% (anexo) por 1 minuto, luego en Etanol 20% (anexo) por un minuto y se enjuagó con agua destilada por 2 minutos. Se secaron levemente y se colocaron en solución HCL 5N (anexo) por 30 minutos a temperatura ambiente para luego enjuagar por 3 minutos. La formulación de estas soluciones se encuentra descrita en el anexo.

Posteriormente se colocaron con reactivo de Schiff's por el tiempo anteriormente indicado, a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego de esto se realizó un baño sulfuroso del modo previamente explicitado por 2 minutos, seguido por un lavado con agua destilada. Finalmente se contrastó con verde luz 0,2% por 15 segundos. Las láminas se enjuagaron con agua destilada y se secaron brevemente a temperatura ambiente para su observación.

Las láminas fueron visualizadas bajo un sistema de ciego (las mismas fueron codificadas en la medida que ingresaban al laboratorio y fueron analizadas sin saber si pertenecían a gatos de ambientes contaminados con humo de tabaco, o a gatos de ambientes libres del mismo). De cada animal se analizaron 700 células bajo objetivo de inmersión (1000X), utilizando microscopio Olympus BX 60. Las imágenes se digitalizaron utilizando cámara Evolution VF (Media Cybernetics) y el software Image Pro-Express 6.0 (Media Cybernetics). Una vez capturadas, las imágenes fueron evaluadas en consenso por los mismos dos observadores. Se contabilizaron células normales y con señales de apoptosis (condensación de la cromatina, cariorrexis, picnosis y cariólisis), así como la presencia de micronúcleos, puentes nucleares, y células binucleadas. Para la contabilización de los tipos celulares se siguieron los criterios de Thomas et al., (2009) y Tolbert, Shy y Allen, (1992) resumidos en la

tabla 2. Las células basales y las células diferenciadas fueron consideradas como una sola variable denominada células normales.

Tabla 2: Criterio de clasificación celular del Test de Micronúcleos de la Mucosa Oral.

Tipo celular.	Características morfológicas.
Células basales.	Núcleo amplio: mayor proporción de núcleo/citoplasma que las células bucales diferenciadas. Pequeñas y más ovales. Núcleo uniformemente teñido. Citoplasma verde más oscuro en relación con la célula diferenciada cuando se ve bajo microscopio de luz óptica.
Células diferenciadas	Relación núcleo/citoplasma más pequeña. Más angular y más planas que las células basales. Núcleo redondo teñido uniformemente
Células con micronúcleo.	Contiene tanto el núcleo principal como el micronúcleo. Los micronúcleos son redondos u ovalados con una intensidad de tinción similar a la del núcleo principal. Los micronúcleos suelen tener $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{16}$ de diámetro del núcleo principal. Los micronúcleos deben ubicarse en el citoplasma celular. Hallados sólo en células basales y diferenciadas.
Puente nuclear.	El núcleo principal tiene una constricción aguda que forma una yema. La yema está unida al núcleo principal, con una intensidad de tinción similar. El diámetro de la yema puede ser de un cuarto a la mitad del diámetro nuclear.
Broken-egg	El núcleo parece "dividido" en dos, con las caras enfrentadas de aspecto aplanado.
Células binucleadas.	La célula contiene dos núcleos principales. Ambos núcleos son similares tanto en tamaño como intensidad de la tinción.
Célula con cromatina condensada	El núcleo muestra áreas de cromatina agregada. Distintas áreas del núcleo se tiñen de un modo más intenso. El núcleo exhibe un patrón estriado.
Célula cariorexica	El núcleo muestra extensos agregados de cromatina. La fragmentación nuclear suele ser evidente.
Célula picnótica	La célula tiene un núcleo pequeño encogido. El núcleo es teñido intensamente y de modo uniforme. El diámetro del núcleo es $\frac{1}{3}$ a $\frac{2}{3}$ del diámetro normal de un núcleo.
Célula cariolítica	El núcleo tiene un contenido de ADN reducido. El núcleo no se tiñe por Feulgen

4.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos, que se resumieron por medio de tablas de frecuencia. La homogeneidad de los grupos: expuesto y no expuesto a humo de tabaco en relación con sexo y edad fue realizada mediante pruebas de χ^2 de homogeneidad.

Los grupos de animales expuestos y no expuestos a humo de tabaco fueron comparados para cada variable mediante el test estadístico de χ^2 . Para todas las comparaciones un *P* valor menor a 0.05 fue considerado como significativo. Todos los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando la plataforma on-line de libre acceso: <https://www.socscistatistics.com/>.

El nivel de genotoxicidad expresado en las muestras fue evaluado mediante el Factor de Genotoxicidad (FG) según Leonardi et al., (2020). El FG se calculó como:

$$FG = \frac{\text{frecuencia de micronúcleos en población expuesta}}{\text{Frecuencia de micronúcleos en población no expuesta}}$$

dónde: $FG \leq 1.4$ = exposición negativa; $1.5 \leq FG \leq 2.9$ = exposición leve; $3.0 \leq FG \leq 14.9$ = exposición positiva; $F \geq 15$ = exposición fuertemente positiva.

5. RESULTADOS

En la tabla 3 se muestra la distribución de edades y sexos entre los grupos de animales expuestos y no expuestos a humo de tabaco. El rango de edades fue de 1 a 14 años en el grupo de animales expuestos (media de 6.1 ± 3.9 años), mientras que para el grupo de animales no expuestos el rango de edades fue de 4 a 10 años (media de 6.3 ± 3.2 años). No se observaron diferencias significativas en relación al sexo o edad entre los grupos ($P=0.72$).

Tabla 3. Distribución de edades y sexos en los grupos de animales expuestos y no expuestos a humo de tabaco.

Grupo	Sexo			Edad (años)				
	M	H	P *	1-4	5-9	>10	Media \pm DE	P*
Expuesto a humo de tabaco	1	6	0.49	2	4	1	6.1 \pm 3.9	0.72
No expuesto a humo de tabaco	1	2		1	1	1	6.3 \pm 3.2	

*P valor para la prueba de χ^2 de homogeneidad de grupos.
DE: desvío estándar

Mediante la adaptación de la técnica de Feulgen se lograron observar diferentes estadios del proceso de apoptosis, micronúcleos, anomalías nucleares y de la división celular. En las figuras 4, 5 y 6 se muestran algunos ejemplos de los hallazgos citológicos detectados en este trabajo.

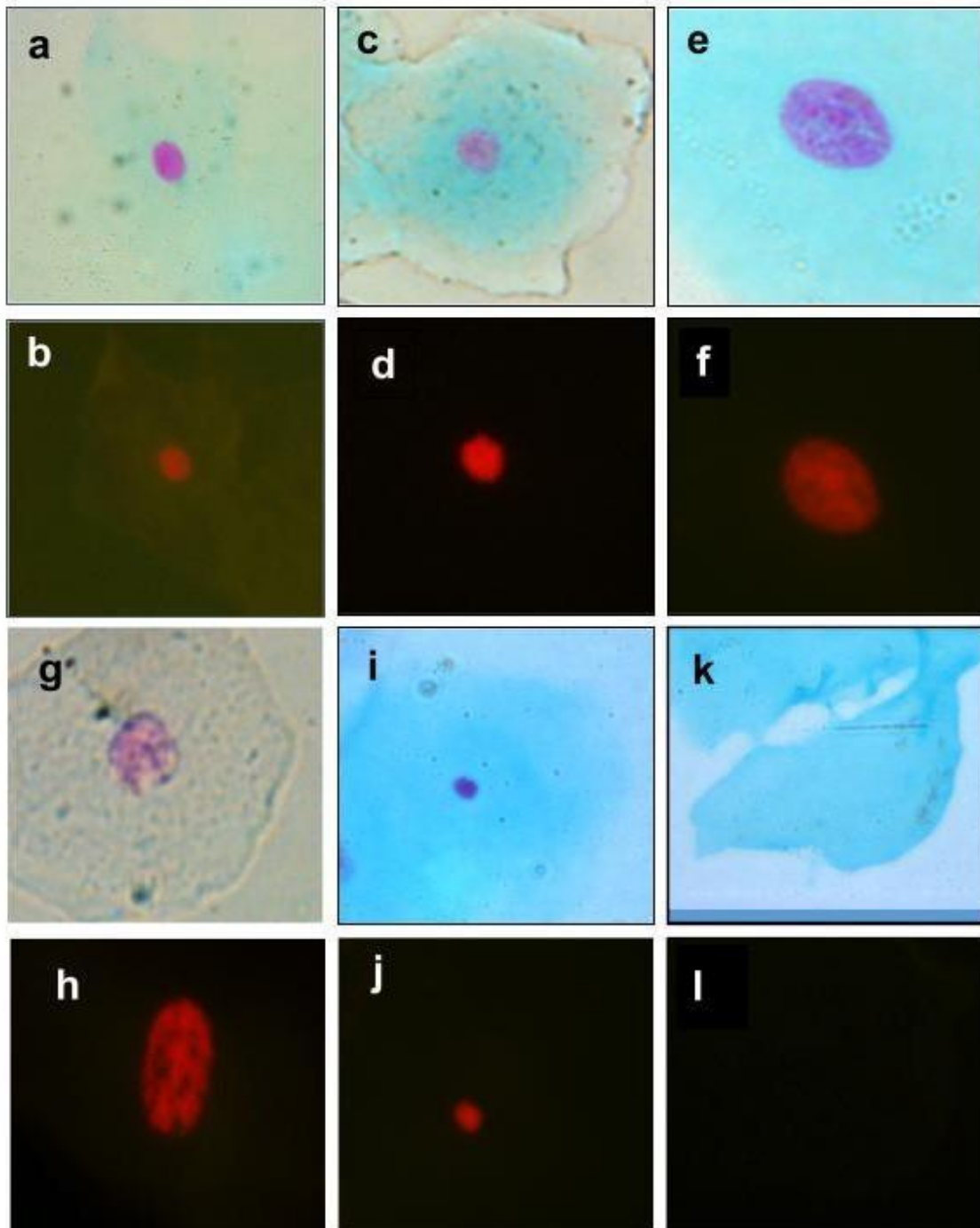


Figura 4. Células del epitelio bucal en diferentes estadios del proceso de apoptosis. Tinción de Feulgen. Objetivo de inmersión, 100X. Fila superior microscopía de luz. Fila inferior microscopía de fluorescencia a), b), c) y d) células diferenciadas, e) y f) células con cromatina condensada, g) y h) células cariorréticas, i) y j) picnosis celular, k) y l) célula cariofítica.

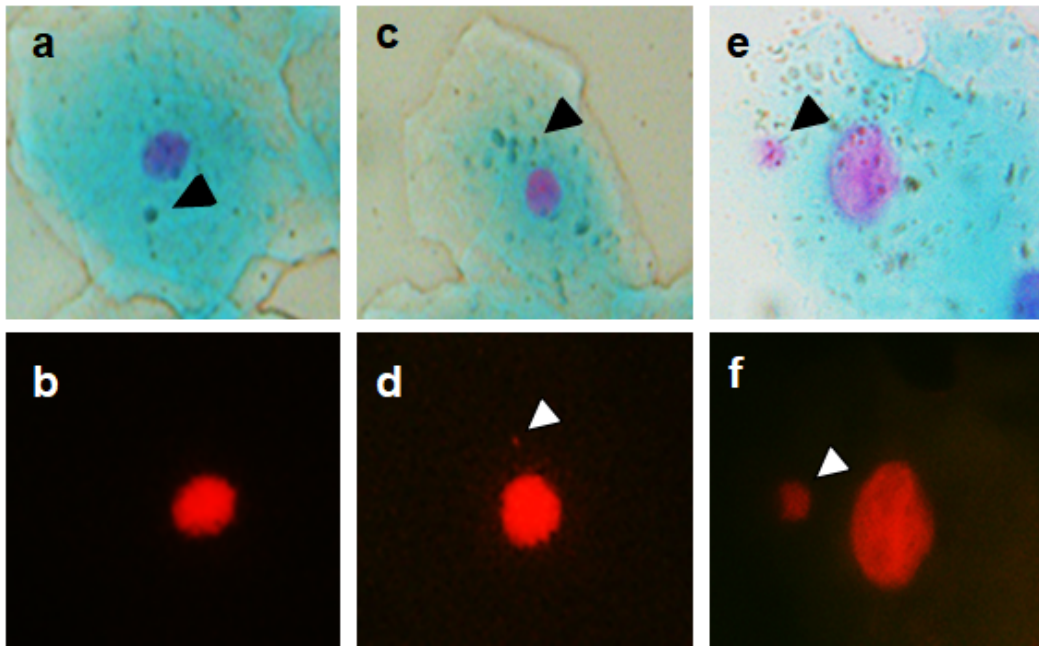


Figura 5. Células del epitelio bucal con micronúcleos y falsos positivos. Tinción de Feulgen. Objetivo de inmersión, 100X. Fila superior microscopía de luz. Fila inferior microscopía de fluorescencia. a) y b) célula con falso micronúcleo, c) y d) célula con un micronúcleo pequeño, e) y f) célula con un micronúcleo grande.

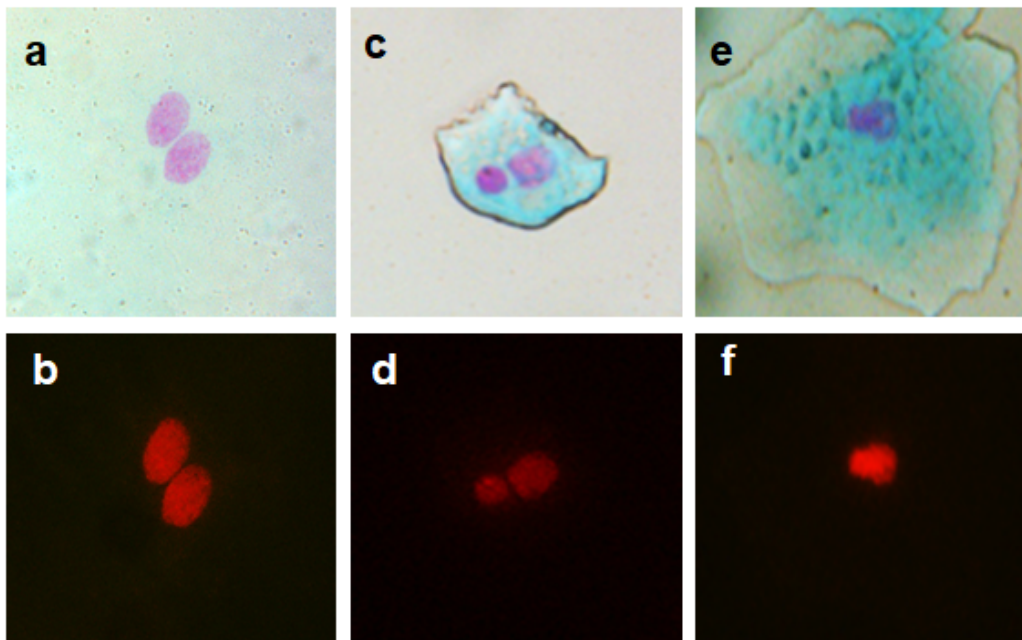


Figura 6. Células del epitelio bucal con alteraciones nucleares y del proceso de división celular. Tinción de Feulgen. Objetivo de inmersión, 100X. Fila superior microscopía de luz. Fila inferior microscopía de fluorescencia. a) y b) célula binucleada, c) y d) célula "broken-egg", e) y f) célula con un puente nuclear.

En total se analizaron 5006 células pertenecientes a los gatos expuestos a ambientes contaminados con humo de tabaco y 2162 células pertenecientes a gatos no expuestos al mismo. Al considerar el número total de células con algún tipo de alteración como: señales de apoptosis (cromatina condensada, cariorrexis, picnosis y cariólisis), micronúcleos, alteraciones de la división celular (células binucleadas) o del núcleo (broken-egg y puentes nucleares), estas fueron más frecuentes en los animales expuestos a ambientes contaminados con humo de tabaco que en los animales no expuestos ($P < 0.00001$) (tabla 4).

El número de células con núcleos que presentaban señales tempranas de apoptosis (cromatina condensada y cariorrexis) no difirió entre ambos grupos. Sin embargo, el número de células con núcleos picnóticos y con cariólisis fue más alto en el grupo de animales expuestos al humo de tabaco ($p < 0.01$ y $p < 0.00001$ respectivamente) que en los animales no expuestos.

En relación al número de células que presentaba micronúcleos en el grupo de animales que habitaban en ambientes contaminados con humo de tabaco, fue significativamente superior ($p < 0.00001$) al observado en los animales que habitaban ambientes libres del mismo.

De forma similar a los micronúcleos, se observaron diferencias significativas en el número de células con puentes nucleares. Éste fue superior en los animales expuestos a ambientes contaminados con humo de cigarrillo ($P = 0.039$) en comparación a los animales que no presentaban esa exposición. Contrario a esto, el número de células con "Broken-eggs" fue similar entre ambos grupos de animales estudiados.

Tabla 4. Hallazgos citológicos en células de la mucosa oral de gatos expuestos y no expuestos a ambientes contaminados por humo de tabaco

Hallazgo	Células de gatos expuestos (N=5006)		Células de gatos no expuestos (N=2162)		P valor (pruebas χ^2)
	n	Frec. (n/N)	n	Frec. (n/N)	
Células normales	2322	0.4638	1624	0.7512	<0.00001*
Células con cromatina condensada	16	0.0031	7	0.0032	0.98
Células con cariorrexis	43	0.0086	22	0.0102	0.52
Células con picnosis	83	0.0166	19	0.0088	0.01*
Células con cariólisis	2362	0.4718	468	0.2165	<0.00001*
Células con Micronúcleos	92	0.0184	7	0.0032	<0.00001*
Células binucleadas	46	0.0092	3	0.0014	0.0002*
Células con puentes nucleares	29	0.0058	2	0.0009	0.0039*
Broken-egg	13	0.0026	10	0.0046	0.16

Frec.: frecuencia. *P<0.05

La frecuencia de micronúcleos en el grupo de animales expuestos fue significativamente mayor al del grupo de animales no expuestos, (0.0184 vs 0.0032 respectivamente $p = <0.00001$ (0.0184, mientras que en el grupo de animales no expuestos fue de 0.0032 (tabla 4).

Al evaluar el nivel de genotoxicidad expresado en las muestras de gatos provenientes de ambientes fumadores en relación al de gatos no expuestos a los mismos, se encontró un factor de genotoxicidad calculado de 5.75.

6. DISCUSIÓN

El test de micronúcleos ha sido ampliamente utilizado, sobre todo en humanos, sin embargo, hay escasas comunicaciones acerca de su utilización en animales domésticos (Pérez Restrepo, Berrío, Jaramillo, Urrego, y Arias, 2014). De hecho, para nuestro conocimiento, no existían hasta el momento, reportes de su utilización en gatos. En esta tesis logramos adaptar, por primera vez, el ensayo de micronúcleos en la mucosa oral a la especie *Felis catus*.

Las células epiteliales colectadas en este estudio por medio de cepillos citológicos fueron muy similares en gatos y en humanos. Todos los tipos celulares descritos por Thomas et al., (2009) fueron encontrados en los gatos analizados, y las alteraciones detectadas a nivel del núcleo fueron muy similares a las comunicadas por el mismo autor.

Estudios realizados en palomas (*Columba livia*) demostraron que la frecuencia de base de formación de micronúcleos (0.88 micronúcleos /1000 células) era similar a la frecuencia basal informada en humanos (Shepherd y Somers, 2012). Sin embargo, aún se desconocen estos valores de referencia en gatos domésticos.

Existen trabajos que sugieren que la presencia de micronúcleos, en las células de la mucosa bucal, puede verse afectada por la edad de los individuos (Zalacain et al., 2005; Shepherd y Somers, 2012, Jimenez, 2019). En la medida en que las células envejecen, la frecuencia de los micronúcleos puede verse aumentada, producto de daños celulares y genéticos vía mutágenos endógenos al ser menos eficientes los mecanismos de reparación del ADN (Thomas et al., 2009). Estudios en humanos, sugieren que la edad aumenta la frecuencia de micronúcleos, independientemente de la exposición a genotoxinas ambientales (Bolognesi et al., 1999; Thomas et al., 2009). A su vez, Shepherd y Somers (2012) demostraron que las palomas adultas presentan una frecuencia de micronúcleos tres veces mayor que las aves jóvenes.

Del mismo modo que con la edad, ocurre con el sexo (Fenech, Neville y Rinaldi, 1994, Hando, Tucker, Davenport, Tepperberg, y Nath, 1997; Bonassi,

Coskun, Ceppi, Lando, Bolognesi, Burgaz y Fenech, 2011). Algunos estudios vinculan la edad y sexo de los individuos, de modo que la incidencia es mayor en mujeres en edad reproductiva (entre 25 y 50 años) y en hombres mayores de 50 años (Taborga, 2016). En un trabajo realizado en linfocitos humanos, se encontró que los micronúcleos centrómero negativos dominan en los hombres más jóvenes y los centrómero positivo en mujeres mayores. Estos autores consideran que los efectos de la edad y el género se deben principalmente a la micronucleación diferencial de los cromosomas sexuales (Lindberg et al., 2007). En la misma línea, varios estudios han demostrado la inclusión preferencial del cromosoma X en los micronúcleos de mujeres (Guttenbach, Schakowski y Schmid, 1994; Hando, Nath y Tucker, 1994; Richard et al., 1993).

Si bien el sexo parecería afectar la frecuencia basal de micronúcleos, los resultados aún son poco claros y contradictorios. Fenech et al., (1994) establecen que la frecuencia espontánea es mayor en mujeres que en hombres. Sin embargo, hay autores que no encuentran diferencias significativas entre sexos (Dietz, Diehl, Prolla, y Furtado, 2000) o que reportan una mayor frecuencia en hombres que en mujeres (Benites, Amado, Vianna y Martino-Roth, 2006). El efecto del sexo podría ser diferente de acuerdo a la especie. Shepherd y Somers ,2012) encontraron que las palomas machos presentaban una frecuencia de micronúcleos 1.4 a 2.2 veces mayor que las hembras. Si bien en nuestro estudio no pudimos discriminar por edad y sexo, debido al bajo número de animales, nuestros grupos (expuestos y no expuestos) fueron homogéneos en su composición (Edad $P=0.72$, Sexo $P=0.49$). Teniendo en cuenta que la edad y sexo son variables que pueden influir en los resultados, y que no conocemos los niveles basales para la especie felina, sería conveniente realizar estudios posteriores con un n mayor donde los grupos, aparte de ser homogéneos entre sí, presenten igual cantidad de individuos de ambos sexos, y donde los animales puedan evaluarse agrupandolos según rango etario.

La cromatina condensada y la cariorrexis constituyen los primeros estadios de la muerte celular, donde muestran un núcleo fragmentado que desemboca posteriormente en su desintegración. En algunas situaciones, el

número de células a nivel de la mucosa bucal con estas características puede verse afectada debido a la exposición a ciertos genotóxicos (Thomas et al., 2009). La presencia de cariorrexis indica que la célula ha estado expuesta a un alto grado de daño citogenético (esto se manifiesta como una mayor cantidad de células moribundas y queratinizadas) y un alto grado de genotoxicidad (mayor número de células en apoptosis) (Bohrer, 2005).

En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas en las frecuencias de células cariorréxicas ($P= 0.52$) o con cromatina condensada ($P= 0.98$), entre el grupo de animales expuestos y no expuestos. Sin embargo, resultados contradictorios al nuestro fueron reportados estudiando humanos expuestos a humo de tabaco, ya sea de manera activa o pasiva, en donde sí existía un aumento significativo de estas alteraciones (Vilchez Oliva, 2017; Jimenez, 2019; Shepherd y Somers, 2012). Esta diferencia puede deberse a que, si bien este test de micronúcleos tiene muchas ventajas, ya comentadas como su sensibilidad y sencillez, requiere gran nivel de entrenamiento del observador. Siendo que en la especie *Felis catus* se visualizaron estadios más avanzados en el proceso de apoptosis, se esperarían encontrar estos tipos celulares. Sin embargo, al ser la cariorrexis y la cromatina condensada alteraciones más sutiles, seguramente no logramos diferenciar en forma cabal estos cambios en el núcleo.

La picnosis y la cariólisis son señales tardías del proceso de apoptosis. La picnosis se caracteriza por presentarse en células terminalmente diferenciadas, las mismas tienen un núcleo pequeño cuyo diámetro es $1/3$ o $2/3$ partes del núcleo normal de una célula diferenciada. Manifiesta una condensación irreversible de la cromatina, que culmina con células cariolíticas. Estas últimas, son células diferenciadas terminales, que parecen estar ausentes de núcleo, ya que el mismo se encuentra sin ADN, observándose como una imagen fantasmal del mismo (Alonso, 2015). Estas señales tardías de apoptosis fueron ampliamente diferentes en nuestro trabajo entre los grupos control y expuestos. Nuestros resultados indican que la diferencia en la exposición podría estar determinando una descamación y muerte más acelerada de las células del epitelio de la mucosa oral en los animales expuestos al humo de tabaco. Tanto en nuestro estudio como en los

consultados en la bibliografía, los resultados encontrados de células cariolíticas, en humanos y animales expuestos a humo de tabaco, son significativamente mayores que los que no están expuestos (Vilchez Oliva, 2017; Jimenez, 2019; Rodrigues et al., 2020; Morales, 2014).

Los ensayos de micronúcleos se usan extensamente en testeo y biomonitorización de genotoxicidad como marcador de exposición humana a agentes genotóxicos (Lindberg et al., 2007). Es sabido que el humo de tabaco afecta la presencia de micronúcleos en la mucosa bucal, y que el test de micronúcleos es sensible para buscar alteraciones a este nivel (Silva et al., 2012; Negri, 2009; Rodrigues et al., 2020; Zalacain et al., 2005; Jimenez., 2019; Thomas et al., 2009). Consultando en la literatura, vimos que el tabaquismo afecta tanto al fumador activo como a los fumadores pasivos que conviven con el mismo, incluidos los animales (Morales, 2014).

En humanos, De Geus et al., (2018), mostraron una mayor frecuencia de micronúcleos en las células exfoliadas de fumadores en comparación con el grupo de no fumadores. En perros expuestos al humo de cigarrillo se ha encontrado por medio de estudios histopatológicos y ensayos cometa en muestras de biopsia, un daño temprano del ADN, asociado a los efectos genotóxicos del mismo (Pérez Restrepo et al., 2014). Morales, 2014) estudió que la incidencia de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa oral fue estadísticamente mayor en perros que conviven con fumadores activos, que en los que no lo hacen. Concluyeron que existía una asociación entre la dependencia al cigarrillo de sus tutores y la frecuencia de alteraciones citogenéticas en perros expuestos al ambiente contaminado con humo de tabaco.

En nuestro trabajo encontramos un efecto similar, ya que los gatos que habitan en ambientes contaminados, presentan mayor frecuencia de micronúcleos que los que no están expuestos ($P=<0.00001$). Probablemente, los componentes tóxicos del humo de tabaco podrían producir algún tipo de daño en el ADN de las células de los animales expuestos, generando fracturas cromosómicas, retrasos anafásicos, rotura de puentes anafásicos o fenómenos

de amplificación del ADN, ya que los micronúcleos son los resultados de estos (Terradas, Martín, Tusell y Genescà, 2010; Lindberg et al., 2007).

Es conocido que la formación de puentes nucleares se ve incrementada tras la exposición a diversos oxidantes y carcinógenos entre ellos los presentes en el humo de tabaco. Los puentes nucleares se originan durante el proceso de mitosis celular en la etapa de anafase, cuando los centrómeros de los cromosomas son guiados a polos opuestos, ya sea por puentes anafásicos rotos o por "anafase rezagada". Ante la eventualidad que no se produzca el quiebre del puente anafásico, la membrana nuclear rodea al "núcleo hijo" y el resto del puente anafásico dando así la figura nuclear conocida como puente nuclear (Fenech et al., 2011). Otros modelos estipulan que los puentes nucleares se forman en la fase S del ciclo celular, siendo una expulsión de material nuclear ya sea a causa de una amplificación de ADN o por un fallo en su replicación (Lindberg et al., 2007).

En nuestro trabajo se vio una diferencia significativa en la frecuencia de puentes nucleares entre los gatos expuestos y no expuestos al humo de tabaco ($P=0.039$). La frecuencia aumentada de puentes nucleares va de la mano con los resultados obtenidos por diferentes autores que han tomado como estudio el TMMO en humanos (Tolbert et al., 1992; Kausar et al., 2009; Nersesyan, Muradyan, Kundi y Knasmueller, 2011; Nefi, Musanovic, Kurteshi, Prutina y Turcalo, 2013). Estos trabajos evalúan la frecuencia de puentes nucleares que va en concordancia con el aumento de micronúcleos en seres humanos expuestos a diferentes productos y concentraciones de tabaco, ya sea con o sin humo.

En el trabajo de Bohrer (2005) se vio un conteo mayor, aunque no significativo, en los broken-egg en el grupo control con respecto al grupo de fumadores o consumidores de tabaco. Los broken-egg son formas nucleares anormales de origen y significado desconocido. Este hallazgo sugiere que los broken-egg constituyen una alteración nuclear temprana y podrían ser un intento de la célula por reparar el daño en su ADN a través de la eliminación de material genético defectuoso, o ser una anomalía nuclear resultante de un stress de baja intensidad. Según Nersesyan (2006) los broken-egg no parecen

ser debidos a una acción genotóxica o factores ambientales. Estos hallazgos en los trabajos anteriormente mencionados podrían explicar por qué en nuestra investigación no encontramos diferencia significativa en las frecuencias de broken-egg entre el grupo control y el grupo expuesto ($P=0.16$)

Observamos una mayor cantidad de alteraciones totales a nivel del núcleo y de la división celular en los gatos expuestos en comparación con los controles no expuestos ($P<0.00001$). Esto va de la mano del valor de genotoxicidad encontrado ($FG=5.75$) que indicaría una exposición positiva a un agente genotóxico ($3.0 \leq FG \leq 14.9$; Leonardi et al., 2020). Puesto que no existen estudios en felinos relativos al FG, se utilizó la escala de humanos, ya que la frecuencia basal de micronúcleos ha sido similar entre el hombre y otras especies (Shepherd y Somers, 2012).

Si bien es sabido que los diferentes productos químicos utilizados en el control de pulgas pueden dar lugar a efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos; (Souza , 2010) en el presente estudio ambos grupos, tanto expuestos al humo de tabaco como no expuestos al mismo, no habían sido dosificados con productos para el control de pulgas en los últimos 30 días. Debido a esto, y al bajo número de individuos estudiados, no se evaluó cómo el método de control pudiera afectar la frecuencia de micronúcleos en las distintas poblaciones, aunque podría ser objeto de estudio en una investigación posterior. Asimismo, no fue evaluado el efecto del número de cigarrillos fumados por día por los propietarios debido al N reducido, sin embargo, cabe señalar que se ha establecido que no existe un nivel de exposición seguro al humo de tabaco (Organización Mundial de la Salud, 2019).

7. CONCLUSIONES

- En este trabajo logramos adaptar por primera vez la TMMO para la especie *Felis catus*, observándose todos los tipos celulares, alteraciones nucleares y de la división celular descritas anteriormente para otras especies
- La estabilidad citogenética de las células del epitelio de la mucosa oral se vio afectada en los gatos que habitaban ambientes contaminados con humo de tabaco en relación a los que habitan ambientes libres del mismo.

ANEXO

Preparado BCB

El Buccal cell Buffer fue realizado en laboratorio previo a cada evento de toma de muestra según las siguientes indicaciones:

1,6 gr de TRIS HCL, 38 gr de EDTA y 1,2 gr de NaCl, disuelto en un volumen total de 1 L, con su pH ajustado a 7 y autoclavado a 121 C durante 30 minutos.

Etanol 50%

La solución de Etanol al 50% se formuló a partir de Etanol 95% teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$\text{Sol } 50\% \Rightarrow [95\%] \times \text{Vol } i = 50\% \times 50\text{mL}$$

$$\text{Vol } i = (50\% \times 50\text{mL}) / 95\% =$$

Al volumen inicial dado por la fórmula se le adicionó agua destilada para llegar a la concentración deseada.

Etanol 20%

La solución de Etanol al 20% se formuló a partir de Etanol 95% teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$\text{Sol } 20\% \Rightarrow [95\%] \times \text{Vol } i = 20\% \times 50\text{mL}$$

$$\text{Vol } i = (20\% \times 50\text{mL}) / 95\% =$$

Al volumen inicial dado por la fórmula se le adicionó agua destilada para llegar a la concentración deseada.

HCL 5M

La Solución de Ácido clorhídrico 5 M se preparó a partir de una solución de HCl al 37% y 12M teniendo en cuenta las siguiente fórmula:

$$C_i \times Vol_i = C_f \times Vol_f$$

$$\Rightarrow 12M \times Vol_i = 5M \times 200mL$$

$$Vol_i = (C_f \times Vol_f) / C_i$$

$$\Rightarrow Vol_i = (5M \times 200mL) / 12M$$

Al volumen inicial dado por la fórmula se le adicionó agua destilada para llegar a la concentración deseada. Se tuvo la precaución de colocar el ácido al agua por goteo lento ya que desencadena una reacción exotérmica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, W., Esteves, E., Goja, B., González, F., Lorenzo, A., y Sica, A. (2013). Impacto de las políticas de control de tabaco en el Uruguay. 2006-2009. Programa Nacional para Control del Tabaco. *Archivos de Medicina Interna*, 35(Supl.4),1-16. Recuperado de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-423X2013000400001&lng=es&tlng=es
- Alonso Zotea, A. (2015). *Identificación de micronúcleos y anormalidades nucleares en mucosa bucal de niños expuestos y no expuestos a plaguicidas* (Tesis de maestría). Centro de investigación y estudios avanzados en odontología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca.
- Arul, P., Smitha, S., Masilamani, S., y Akshatha, C. (2018). Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells Using Liquid Based Cytology Preparations in Building Construction Workers. *Iranian Journal of Pathology*, 13(1), 30–37.
- Barrueco, M. Hernández, M. y Torrecilla, M. (2003). *Manual de Prevención y Tratamiento del Tabaquismo* (2ª ed.). Madrid: Ergon.
- Bello, S., Michalland, S., Soto, M., Contreras, C., y Salinas, J. (2005). Efectos de la exposición al humo de tabaco ambiental en no fumadores. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 21(3), 179-192. doi: 10.4067/S0717-73482005000300005
- Benites, C.I., Amado, L.L., Vianna, R.A., y Martino-Roth, M. da G. (2006). Micronucleus test on gas station attendants. *Genetics and Molecular Research*, 5, 45-54. Recuperado de http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2006/vol1-5/gmr0170_full_text.htm
- Bertone, E.R., Snyder, L.A., y Moore, A.S. (2002). Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *American Journal of Epidemiology*, 156(3), 268–273. doi:10.1093/aje/kwf044

- Bertone, E.R., Snyder, L.A. y Moore, A.S. (2003). Environmental and life style risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats. *Journal of veterinary Internal Medicine*, 17(4), 557-562.
doi:10.1111/j.1939-1676.2003.tb02478.x
- Bertone-Johnson, E.R., Procter-Gray, E., Gollenberg, A.L., Ryan, M.B. y Barber, L.G. (2008). Environmental tobacco smoke and canine urinary cotinine level. *Environmental Research*, 106(3), 361–364.
doi:10.1016/j.envres.2007.09.007
- Bohrer, P.L. (2005). Assessment of Micronucleus Frequency in Normal Oral Mucosa of Patients Exposed to Carcinogens. *Acta Cytologica*, 49, 265–272. doi: 10.1159 / 000326148
- Bolognesi, C., Lando, C., Forni, A., Landini, E., Scarpakto, R., Migliore, L., y Bonassi, S. (1999). Chromosomal damage and ageing: Effect on micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes. *Age and Ageing*, 28, 393–397. doi:10.1093 / envejecimiento / 28.4.393
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., ... Fenech, M. (2011). The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 728(3), 88–97. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.06.005
- Cai, J., Liu, B., Zhu, X., y Su, Q. (2002). Determination of pyrethroid residues in tobacco and cigarette smoke by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*. A, 964(1-2), 205–211. doi: 10.1016/s0021-9673(02)00586-1
- Carrillo Navarro, M.C. (2017). *Lesiones bucodentales ocasionadas por el consumo de alcohol y cigarrillo* (Proyecto de Investigación). Colegio de Ciencias de la Salud, Universidad San Francisco de Quito, Quito.
- Cray, C., Roskos, J. y Zielezienski-Roberts, K. (2005). Detection of cotinine, a nicotine metabolite, in the plasma of birds exposed to secondhand

smoke. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 19(4), 277-279. doi: 10.1647/2004-031.1

De Geus, J.L., Wambier, L.M., Bortoluzzi, M.C., Loguercio, A.D., Kossatz, S. y Reis, A. (2018). Does smoking habit increase the micronuclei frequency in the oral mucosa of adults compared to non-smokers? A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 22(1), 81–91. doi: 10.1007/s00784-017-2246-4

Dehghan Nezhad, M., Jalayer Naderi, N. y Semyari, H. (2020). Micronucleus Assay of Buccal Mucosa Cells in Waterpipe (Hookah) Smokers: A Cytologic Study. *Iranian Journal of Pathology*, 15(2), 75-80. doi: 10.30699/ijp.2020.101701.2010

Dietz, J., Diehl, A.S., Prolla, J.C. y Furtado, A.D. (2000). Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46(3), 207–211. doi: 10.1590/S0104-42302000000300004

Diniz Freitas, M., García García, A., Crespo Abelleira, A., Martins Carneiro, J.L., y Gándara Rey, J.M. (2004). Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 9(4), 355-361. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169844472004000400014&lng=es&tlng=es

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., ... Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagénesis*, 26(1), 125–132. doi: 10.1093/mutage/geq052

Fenech, M., Neville, S, y Rinaldi, J. (1994). Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesisblocked lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 313(2-3), 203-207. doi: 10.1016/0165-1161(94)90050-7

- Flórez Martín, S. (2001). Tabaquismo pasivo: ¿Qué podemos hacer? *Prevención del Tabaquismo*, 3(4):205-206.
- Gómez de Ferraris, M.E. y Campos Muñoz, A. (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. Buenos Aires: Panamericana.
- González-Martín, J., Richardus Kraakman, N.J., Pérez, C., Lebrero, R., y Muñoz, R.A. (2020). A state-of-the-art review on indoor air pollution and strategies for indoor air pollution control. *Chemosphere*, 262, 128376. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128376
- Guttenbach, M., Schakowski, R. y Schmid, M. (1994). Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei. *Human Genetics*, 94, 295-298. doi: 10.1007/BF00208287
- Hando, J.C., Nath, J., y Tucker, J.D. (1994). Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma* 103, 186–192. doi: 10.1007/BF00368011
- Hando, J.C., Tucker, J.D., Davenport, M., Tepperberg, J., y Nath, J. (1997). X chromosome inactivation and micronuclei in normal and Turner individuals. *Human Genetics*, 100(5-6), 624–628. doi: 10.1007/s004390050564
- Hartwig, A., y Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, 127(1-3), 47–54. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00482-9
- Jelinek, F., y Vozkova, D. (2012). Carcinoma of the trachea in a cat. *Journal of Comparative Pathology*, 147(2-3), 177–180. doi: 10.1016/j.jcpa.2011.11.200
- Jimenez, H.G.Q. (2019). *Avaliação subclínica da frequência de micronúcleos em células da mucosa bucal em pacientes fumantes e não fumantes* (Tesis de Maestría). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Recuperado de <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/50593>

- Kausar, A., Giri, S., Mazumdar, M., Giri, A., Roya, P., y Dhar, P. (2009). Micronucleus and other nuclear abnormalities among betel quid chewers with or without sadagura, a unique smokeless tobacco preparation, in a population from North-East India. *Mutation Research*, 677(1-2), 72–75. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.05.007
- Knottenbelt, C.M., Bawazeer, S., Hammond, J., Mellor, D., y Watson, D.G. (2012). Nicotine hair concentrations in dogs exposed to environmental tobacco smoke: a pilot study. *The Journal of Small Animal Practice*, 53(11), 623–626. doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01284.x
- Leonardi, S., Poma, A. M., Colafarina, S., D'Aloisio, F., Scatigna, M., Zarivi, O., ... Fabiani, L. (2020). Early genotoxic damage through micronucleus test in exfoliated buccal cells and occupational dust exposure in construction workers: a cross-sectional study in L'Aquila, Italy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 110989. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110989
- Lindberg, H.K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G., Norppa, H., y Fenech, M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 617, (1–2), 33-45. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510706003484>
- Llambí, S., y Arruga, M. (2018). *Selecciones de genética veterinaria I*. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
- McNiel, E.A., Carmella, S.G., Heath, L.A., Bliss, R.L., Le, K.A., y Hecht, S.S. (2007). Urinary biomarkers to assess exposure of cats to environmental tobacco smoke. *American Journal of Veterinary Research*, 68(4), 349–353. doi: 10.2460/ajvr.68.4.349
- Metgud, R., y Neelesh, B.T. (2018). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assay in the exfoliated buccal mucosal cells of smokers and nonsmokers: A pilot study. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(2), 372–376. doi: 10.4103/0973-1482.157351

- Morales, E.N. (2014). *Estudo dos efeitos mutagênicos do tabagismo passivo em cães* (Tesis de maestría). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mozaffarian, D., Afshin, A., Benowitz, N.L., Bittner, V., Daniels, S.R., Franch, H.A., ... Zakai, N.A. (2012). Population approaches to improve diet, physical activity, and smoking habits: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 126(12), 1514–1563. doi: 10.1161/CIR.0b013e318260a20b
- Nachón, M., García, M., Nachón, F., Hernández, T., y Hernández, L. (2010). Tabaquismo y cáncer bucal: una revisión teórica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 10(1), 30-37.
- National Institute for Clinical Excellence (NICE). (2002). Guidance on the use of nicotine replacement therapy (NRT) and bupropion for smoking cessation. London: National Institute for Clinical Excellence.
- Nefi, H., Musanovic, J., Kurteshi, K., Prutina, E., y Turcalo, E. (2013). The effects of sex, age and cigarette smoking on micronucleus and degenerative nuclear alteration frequencies in human buccal cells of healthy Bosnian subjects. *Journal of Health Sciences*, 3(3),196-204. doi: 10.17532/jhsci.2013.107
- Nelson, E. (2001). The miseries of passive smoking. *Human & Experimental Toxicology*, 20(2), 61–83. doi: 10.1191/096032701670538508
- Negri, A. (2009). *Estudo dos efeitos mutagênicos da poluição ambiental em trabalhadores de rua em São Paulo* (Tesis de doctorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. doi: 10.11606/T.5.2009.tde-25022010-154540.
- Nersesyan, A. (2006). The nature of "broken-egg" events in exfoliated human cells. *Acta Cytologica*,50(5), 598–599.
- Nersesyan, A., Muradyan, R., Kundi, M., y Knasmueller, S. (2011). Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities

in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis*, 26(2), 295–301. doi: 10.1093/mutage/geq092

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). Tabaco. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tobacco/>

Pérez Restrepo, N., Berrío, A., Jaramillo, J.E., Urrego, R., y Arias, M.P. (2014). Exposure to cigarette smoke causes DNA damage in oropharyngeal tissue in dogs. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 13-19. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.013

Pinillos, L., Quesquén, M., Bautista, F., y Poquioma, E. (2005). Tabaquismo: un problema de salud pública en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(1), 64-70.

Pradeep, M.R., Yadavalli, G., Maji, J., Kartikay S., Deepa, K., y Vishnudas, P. (2014). Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(5), ZC21–ZC24. doi: 10.7860/JCDR/2014/8733.4357

Ramos, M.A., Cury, F., Scapulatempo Neto, C., Marques, M.M., y Silveira, H.C. (2014). Micronucleus evaluation of exfoliated buccal epithelial cells using liquid-based cytology preparation. *Acta Cytologica*, 58(6), 582–588. doi: 10.1159/000366224

Ramsey, M., Moore, D., Briner, J., Lee, D., Olsen, L., Senft, J., y Tucker, J. (1995). The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutation Research/DNAging*, 338(1–6), 95-106. doi:10.1016/0921-8734(95)00015-X

Richard, F., Aurias, A., Couturier, J., Dutrillaux, A.M., Flüry-Hérard, A., Gerbault-Seureau, M., ...Lombard, M. (1993). Aneuploidy in human lymphocytes: an extensive study of eight individuals of various ages. *Mutation Research*, 295(2), 71–80. doi: 10.1016/0921-8734(93)90003-I

- Richter, P.A., Bishop, E.E., Wang, J., y Swahn, M.H. (2009). Tobacco smoke exposure and levels of urinary metals in the U.S. youth and adult population: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(7), 1930–1946. doi: 10.3390/ijerph6071930
- Rodrigues, A. A., Faria, J.C., Pimenta, A.B., Perez, J.A.P., y Almeida Junior, S. (2020). Prueba de micronúcleo en mucosa para la evaluación de toxicidad en perros por exposición al tabaco. *Pubsaúde*, 3, a016. doi: 10.31533/pubsaude3.a016
- Rubio Monteverde, H., y Rubio Magaña, A. (2006). Breves comentarios sobre la historia del tabaco y el tabaquismo. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 19(4), 297-300. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852006000400013&lng=es&tlng=es.
- Ruiz, A.M., Gómez, I.R., Rubio, C., Revert, C., y Hardisson, A. (2004). Efectos tóxicos del tabaco. *Revista de Toxicología*, 21(2-3), 64-71. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91921302>
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31(1), 9–15. doi: 10.1016/0165-1161(75)90058-8
- Secretaría de Salud. (2001). *Programa de Acción: Adicciones. Tabaquismo*. México: Secretaría de Salud.
- Shepherd, G.L., y Somers, C.M. (2012). Adapting the buccal micronucleus cytome assay for use in wild birds: age and sex affect background frequency in pigeons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(2), 136–144. doi: 10.1002/em.21673
- Silva, I., Peron, M.C.C., Arbex, M., Lichtenfels, A.J.F.C., Lobo, D., Giocondo, M. P., ... Soares, C. (2012). Micronucleus formation induced by biomass burning particles derived from biomass burning induce high micronucleus frequency in *Tradescantia pallida* assay (TRAD-MN). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 7, 1-7. doi: 10.5132 / jbse.2012.01.001

- Smith, C.J., Livingston, S.D., y Doolittle, D.J. (1997). An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. *Food and Chemical Toxicology*, 35(10-11), 1107–1130. doi:10.1016/s0278-6915(97)00063-x
- Smith, V.A., McBrearty, A.R., Watson, D.G., Mellor, D.J. , Spence, S., y Knottenbelt, C. (2017). Hair nicotine concentration measurement in cats and its relationship to owner-reported environmental tobacco smoke exposure. *Journal of Small Animal Practice*, 58(1), 3-9. doi:10.1111/jsap.12616
- Solans Lampurlanés, X., y Hernández Malo, M.R. (s.f). *NTP 354: Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas*. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Recuperado de https://www.cso.go.cr/legislacion/notas_tecnicas_preventivas_insht/NTP%20354%20-%20Control%20biologico%20de%20la%20exposicion%20a%200genotoxicos%20tecnicas%20citogeneticas.pdf
- Souza, L. de L. (2010). *Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do fipronil, após fotodegradação, utilizando Allium cepa como organismo teste* (Trabajo de finalización del curso). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11449/121438>
- Taborga Manrique, X. (2016). Presencia de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral en personas expuestas a agentes genotóxicos. *Revista Con-Ciencia*. 4(2), 35-44. Recuperado de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652016000200004&lng=es
- Tarver, T. (2012). Cancer Facts & Figures 2012 (revisión del libro, por American Cancer Society). *Journal of Consumer Health on the Internet*, 16(3), 366-367. doi: 10.1080/15398285.2012.701177

- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., y Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. *Mutation Research*, 705(1), 60–67. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.03.004
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., ... Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4(6), 825–837. doi: 10.1038/nprot.2009.53
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., y Allen, J.W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, 271(1), 69–77. doi: 10.1016/0165-1161(92)90033-i
- Vilchez Oliva, K.L. (2017). *Estudio comparativo de las características citológicas en el epitelio de la mucosa oral en pacientes fumadores de tabaco y pacientes no fumadores* (Tesis de Grado). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.
- Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227-236. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300007&lng=es&tlng=es
- Zorrilla García, A.E., Eirez Izquierdo, M., y Izquierdo Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1), 51-57. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403002004000100008&lng=es&tlng=es