

# HÁBITO TABÁQUICO y TIOÉTERES URINARIOS EN PERSONAL DE LA ESCUELA DE BIOANÁLISIS, VALENCIA 2010

Cristian Álvarez, Crisabeth Blanco, Exila Rivero, Aura Palencia, Gabriela Romero

Unidad de Investigación en Toxicología Molecular. Escuela de Bioanálisis. Facultad Ciencias de la Salud Sede Carabobo

Recibido: Diciembre 2011. Aceptado: Febrero 2012

## RESUMEN

La determinación de tioéteres urinarios ha sido utilizada como un indicador de exposición a agentes potencialmente alquilantes, diversos estudios han señalado la utilidad de este biomarcador como un ensayo de screening a la exposición del humo del tabaco, y en consecuencia puede contribuir con el desarrollo de medidas o programas que aborden el tabaquismo como problema de salud pública. El humo del tabaco contiene más de 4000 sustancias químicas como producto de su combustión, y al menos 40 de ellas son consideradas cancerígenas para el hombre; alguna de estas sustancias alquilantes se pueden unir a proteínas, ARN y ADN causando su modificación. La presente investigación tuvo como objetivo analizar los niveles de tioéteres urinarios según el hábito tabáquico, en el personal obrero y administrativo de la Escuela de Bioanálisis, Valencia periodo 2010. La muestra estuvo constituida por un total de 30 personas, distribuida de la siguiente manera: 18 del personal administrativo y 12 del personal obrero. La concentración de tioéteres se realizó en orina puntual mediante el Método de Ellman. Los resultados muestran valores promedio de tioéteres en fumadores de  $13.56 \pm 7.76$  mmol SH/mol de creatinina y en no fumadores de  $9.11 \pm 3.55$  mmol SH/mol de creatinina, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p=0.232$ ) se evidencia que los fumadores presentaron niveles de tioéteres mas elevados que los no fumadores.

**Palabras clave:** Tioéteres urinarios, Hábito Tabáquico.

## ABSTRACT

The determination of urinary thioethers has been used as an indicator of exposure to alkylating agents potentially, several studies have indicated the usefulness of this biomarker as a screening test to snuff smoke exposure, and therefore may contribute to the development of measures or programs that address smoking as a public health problem. Snuff smoke contains over 4000 chemicals as a product of combustion, and at least 40 of them are considered carcinogenic to humans, some of these alkylating agents can bind to proteins, RNA and DNA causing its modification. This study aimed to analyze the levels of urinary thioethers as smoking, in labor and administrative staff of the School of Bioanalysis, Valencia period 2010. The sample consisted of a total of 30 people, distributed as follows:

18 administrative staff and 12 staff workers. Thioethers concentration in urine is performed point by Ellman's method. The results show average values of thioethers in smokers  $7.76 \pm 13.56$  mmol SH / mol creatinine in nonsmokers of  $9.11 \pm 3.55$  mmol SH / mol creatinine, although there was no statistically significant difference between groups ( $p = 0.232$ ) was found that smokers had higher levels of thioethers more than nonsmokers.

**Keywords:** Urinary thioethers, smoking

## INTRODUCCIÓN

El humo del tabaco contiene más de 4000 sustancias químicas como producto de su combustión, y al menos 40 de ellas son consideradas cancerígenas para el hombre, algunas de estas sustancias o sus metabolitos reactivos, son electrofílicas y mediante reacciones de alquilación se pueden unir de forma covalente con macromoléculas celulares, tales como proteínas, ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxiribonucleico (ADN) mediante la reacción con los grupos nucleofílicos como hidroxilo (OH<sup>-</sup>), amino (NH<sub>2</sub>) y tiol (SH), lo que ocasionará la modificación del ADN. Sin embargo, los compuestos electrofílicos pueden ser inactivados por medio de la unión con el glutatión endógeno, evitándose así el daño en el ADN, siendo esto un mecanismo de detoxificación para el organismo. Las sustancias que son metabolizadas a compuestos electrofílicos, están en el medio ambiente o se pueden formar endógenamente, siendo consideradas potencialmente alquilantes (1- 4).

Al respecto, el glutatión es un tripéptido compuesto por tres aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina; el grupo SH<sup>-</sup> de esta molécula cumple un papel importante en la formación del enlace covalente con sustancias alquilantes y esta reacción depende de la actividad electrofílica del tóxico y de la acción catalítica de la glutatión S transferasa. De esta unión covalente resulta la formación de tioéteres que son excretados por la orina o bilis como conjugados de glutatión y de cisteína, ácidos premercaptúricos y mercaptúricos, siendo su determinación utilizada como biomarcador inespecífico a la exposición a compuestos electrofílicos (2, 5).

En la literatura internacional consultada no se encontraron valores referenciales de tioéteres urinarios, sin embargo, algunos autores establecen valores límites en una población de referencia de no fumadores y sin exposición ocupacional, encontrando

que oscilan entre 3.8 y 6.05 mmol SH/mol creatinina, pudiendo considerarse como límites seguros de exposición (6,7).

La determinación de los niveles de tioéteres urinarios ha sido señalada como un ensayo de screening a la exposición de compuestos electrofílicos en diversos ambientes ocupacionales, tales como la industria del caucho, incineradores, áreas de esterilización hospitalaria, así mismo para aquellos que manejan citostáticos y en el área no ocupacional se ha empleado para evaluar la exposición al humo de tabaco, por lo tanto es útil su estudio para el desarrollo de medidas preventivas de enfermedades como el cáncer (3, 8 - 13). En relación a esto, la excreción de tioéteres ha sido evaluada en sujetos según el hábito tabáquico, evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de los fumadores activos (6.45 mmol SH/mol de creatinina), fumadores pasivos (4.82 mmol SH/mol de creatinina) y no fumadores (1.87 mmol SH/mol de creatinina) (14).

Los mecanismos por los cuales el humo del tabaco induce la carcinogénesis son muy complejos, donde se observa una relación fundamental con nitrosaminas y alquitranes, los cuales después de una activación metabólica intracelular son capaces de modificar el ADN. Respecto a ello se realizó un estudio en el que evaluaron 94 personas (41 no fumadores y 53 fumadores), la concentración de tioéteres fue de  $2.62 \pm 1.87$  mmol SH/mol de creatinina y  $11.19 \pm 3.48$  mmol SH/mol de creatinina respectivamente, además se estudiaron aberraciones cromosómicas con el fin de establecer la relación entre estos dos métodos de dosimetría interna en los fumadores; de acuerdo con los resultados, los autores señalan que los tioéteres urinarios son excelentes biomarcadores para el control biológico del hábito tabáquico, pero no para predecir la frecuencia de daño cromosómico, probablemente por diferencias toxicocinéticas entre las personas con respecto a la actividad enzimática (15)

El consumo de tabaco está considerado como una de las principales causas de mortalidad en el mundo, existen evidencias de que puede producir cáncer de pulmón, laringe, riñón, vejiga, estómago, colon, cavidad oral y esófago, así como leucemia, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cardiopatía isquémica e infarto. Parte de la fisiopatología de las enfermedades mencionadas esta dada por el alto grado de estrés oxidativo generado por los radicales libres que se desprenden o son originados por el humo del tabaco (16, 17). Al respecto se han estudiado biomarcadores urinarios como cotinina, nicotina, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y tioéteres relacionándolos con la exposición a dicho contaminante, concluyendo que éstos son útiles en programas para prevención del cáncer oral (13).

Es importante señalar que además del hábito tabáquico existen otros factores como la dieta, medicamentos y la exposición a agentes electrofílicos en el ambiente ocupacional, que aumentan la excreción de tioéteres urinarios, por lo tanto estos factores deben ser tomados en cuenta para realizar investigaciones sobre el tema (18). En este sentido, se ha evaluado la influencia de la dieta en la excreción de tioéteres urinarios, en individuos que en primer lugar consumieron una dieta estandarizada (1.9 - 4.9 mmol SH/ mol creatinina), y luego una dieta sin restricción (1.9 -9.5 mmol SH/mol creatinina) los resultados señalan una mayor excreción del metabolito con el consumo de alimentos con azufre como el repollo, cebolla, piña y rábano picante (3).

Por todo lo antes expuesto, surgió la necesidad de abordar e investigar la concentración de tioéteres como biomarcador de exposición a compuestos electrofílicos del humo de tabaco en trabajadores de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, con el fin de que se puedan desarrollar medidas o programas que aborden el tabaquismo como problema de salud pública susceptible de prevención, especialmente en los ambientes laborales.

## MATERIALES Y METODOS

### Sujetos:

La muestra estuvo constituida por un total de 30 sujetos del personal obrero y administrativo de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, sin exposición laboral a compuestos electrofílicos quienes consintieron en participar voluntariamente en el presente estudio. En primera instancia, se solicitó una autorización a la dirección de Escuela de Bioanálisis sede Valencia, donde se especificó el tipo de estudio. Una vez que se obtuvo el permiso de la institución se informó a cada participantes sobre el mismo, y se les instruyó sobre la recolección de la muestra de orina, firmaron el consentimiento informado, y además se aplicó un cuestionario estructurado a fin de obtener datos personales, laborales y factores clínico-epidemiológicos.

### Procedimiento metodológico:

Para la recolección de las muestras (orina puntual, primera de la mañana) se recomendó a los participantes en estudio no consumir café 12 horas antes. La muestra se conservó a temperatura de -20 °C hasta el momento del procesamiento. Para el análisis de las muestras se siguió el procedimiento de extracción normalizado en la Unidad de Toxicología Molecular: la muestra se centrifugó a 3000 rpm, se transfirieron 5 ml en un tubo de ensayo donde se ajustó el pH de 1.5 a 2, utilizando ácido clorhídrico 4 N; se adicionaron 8 ml de Acetato de Etilo y se agitó vigorosamente durante 10 minutos en un agitador mecánico, para luego separar las capas por centrifugación a 2000 rpm por 5 min.; se removió la capa de Acetato de Etilo y se colocó en un balón

con tapa esmerilada, repitiendo la extracción 3 veces. Luego se evaporó y el residuo se retomó con 2.0 ml de agua destilada. El extracto se colocó en un frasco ámbar, se agregó 1 ml de hidróxido de sodio 4N, se procedió a saturarlo con nitrógeno, burbujeándolo por 10 segundos, se cerraron los tubos y se llevaron a un baño maría a 100 °C por 50 minutos. Se colocaron los tubos a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se enfriaron con hielo por 5 minutos; a esta mezcla se agregó 1 ml de ácido clorhídrico 4 N (11).

La Reacción de Ellman se fundamenta en la medición a 412 nm, del producto coloreado debido a la conjugación de los tioles con el ácido 5, 5 diitiobis 2-nitrobenzoico. Se realizó la lectura de la absorbancia en un Espectrofotómetro UV visible marca spectronic Genesys 2 modelo 33 6002. Con el fin de corregir la concentración de tioéteres en orina, se relacionó la concentración del analito con la concentración de creatinina urinaria, y se expresó en moles/L (19), la creatinina urinaria se hizo a través del método de Jaffé modificado. La OMS ha recomendado un rango de concentraciones urinarias de creatinina (0.5 g/l - 3.0 g/l) a fin de seleccionar las muestras que son válidas para evaluar la exposición a químicos, sin que la dilución y la masa muscular individual afecten los resultados. La concentración de SH- es expresada en mmol SH/mol de creatinina (20).

### Análisis de los datos

Se realizó un análisis estadístico descriptivo, la caracterización de la muestra se realizó con frecuencias y medidas de tendencia central. Debido a que los datos no se comportan siguiendo una distribución normal, la cual se comprobó utilizando la prueba de Kolmogorov-smirnov se aplicaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney y Test de Kruskal Wallis) y correlación de Pearson con un nivel de confianza de 95%. Se utilizó el programa SPSS versión 18.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biomonitorización de la exposición a compuestos electrofílicos es de gran trascendencia pues permite la evaluación de la dosis interna y por tanto delimitar grupos de riesgo. Entre los biomarcadores propuestos para ello se encuentran los Tioéteres, que pueden estar modulados por factores endógenos y exógenos (21).

**Tabla 1.** Características demográficas de la población en estudio

Total	Edad			Género		
	(n)	28-36	37-46	47-56	Femenino	Masculino
36	46	56				
Frecuencia						
30	10	12	8	15	15	
%	100	33.3	40.0	26.6	50	50

En esta investigación participaron 30 trabajadores voluntarios con un promedio de edad de  $40,60 \pm 8,04$  años, cuyas características se presentan en la tabla 1.

La concentración de los tioéteres se observó sin diferencias con respecto al género ( $10,25 \pm 3,09$  y  $10,355 \pm 6,913$  mmol SH/mol de creatinina femenino y masculino respectivamente), de igual manera respecto a la edad, sin correlación estadísticamente significativa con dicha variable ( $p=0,198$ ). Estos resultados indican una excreción elevada de este metabolito, al compararlo con estudios previos en poblaciones no expuestas ocupacionalmente que oscilan entre 3.8 y 6.05 mmol SH/mol de creatinina (7).

**Tabla 2.** Niveles de Tioéteres Urinarios y hábito tabáquico de la muestra en estudio.

GRUPOS	Tioéteres (mmoles SH/mol creatinina)		
	n	x	DS
<b>Fumadores</b>			
	8	13,56	7,76
<b>No Fumadores</b>	22	9,11	3,55
<b>Total</b>	30	10,30	5,26

U de Mann Whitney ( $p=0,232$ )

Con respecto al hábito tabáquico, se pudo evidenciar que la concentración de tioéteres fue mayor en fumadores que en no fumadores (tabla 2). Esta diferencia coincide con lo referido por otros investigadores (3, 14, 15). Es importante resaltar que los niveles del metabolito en ambos grupos son considerablemente más altos que los descritos en las investigaciones antes citadas, el aumento en estos valores pudiera estar influenciado por diversos factores, tales como la dieta, ingesta de medicamentos y exposición pasiva al humo del tabaco (condición no evaluada en la presente investigación).

**Tabla 3.**

Niveles de Tioéteres urinarios según el número de cigarrillos fumados diariamente.

Número de cigarrillos diarios	Tioéteres (mmol/mol creatinina)		
	n	X	DS
0	2	9,11	3,55
1-10	4	11,62	9,42
11-20	4	15,50	6,47
<b>Total</b>	30	10,30	5,26

Kruskal Wallis ( $p= 0,564$ )

Al asociar la concentración de los tioéteres urinarios con el número de cigarrillos fumados diariamente (tabla 3) no se observó diferencia estadísticamente significativa entre

los grupos, sin embargo los niveles de este biomarcador fueron aumentando con la cantidad de cigarrillos consumidos diariamente, al igual que investigaciones previas (21).

Por otra parte, cuando se asoció la concentración del metabolito con la ingesta de alimentos en fumadores (datos no mostrados), se observaron mayores niveles en el grupo que consumía alimentos azufrados, esto pone en evidencia la influencia de la dieta en los niveles de tioéteres. Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones que evalúan este efecto (3). Sin embargo en el grupo de no fumadores no se observa la misma relación, demostrando que el hábito tabáquico ejerce mayor influencia que la dieta en la concentración de los tioéteres.

En resumen, el hábito tabáquico en la muestra estudiada, evidencia una exposición importante a compuestos electrofilicos, muchos de los cuales representan un gran riesgo para la salud, debido a su comprobada carcinogenicidad. En este sentido, la importancia de la determinación de tioéteres urinarios está relacionada con la exposición a esos compuestos y, pudiera considerarse como un indicador del riesgo en personas expuestas, pues si el individuo posee un buen sistema de detoxificación (GSH), presentará niveles urinarios elevados; por otra parte cifras bajas de tioéteres pueden estar relacionadas con una escasa exposición o capacidad disminuida en los mecanismos de detoxificación.

Es importante también, establecer valores de referencias de este biomarcador en la población venezolana, ya que las diferencias en cuanto a condiciones geográficas, culturales (dieta) y susceptibilidad genética, son determinantes en la excreción del metabolito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ladero L, Lizasoain. Drogodependencias. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España 1998.
2. Henderson P, van Doorn R, Leijdekkers C, Bos R. Excretion of thioethers in urine after exposure to Electrophilic Chemical. IARC Sci Publ 1984; 59:173-87.
3. Leif A, Vitauts I. Influence of diet and other factors on urinary levels of thioethers. Ocup Environ Health 1988;61:123-30
4. Scherer G, Urban M, Hagedorn H, Serafin R, Feng S, Kapur S y col. Determination of methyl-, 2-hydroxyethyl- and 2-cyanoethylmercapturic acids as biomarkers of exposure to alkylating agents in cigarette smoke. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010;878(27):2520-28.
5. Manahan S. Toxicological Chemistry. Second edition: Editorial Lewis Publishers. London 1992: 101-12.
6. Henderson P, Dorn R van, Leijdekkers C, Vanhonen,

Vertin P. Determination of thio compounds in urine of workers exposed to carbon disulfide. Arch Environ Health 1981; 36(6): 289-97.

7. van Welie R, van Dijck R, Vermeulen N, van Sittert N. Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. Crit Rev Toxicol. 1992; 22(5-6):271-06.

8. Laffon B, Paulo J, Silva S, Roma J, Pépez B, Mendez J. Assessment of occupational genotoxic risk in the production of rubber tyres. Ann Occup Hyg, 2006; 50 (6): 583-92.

9. Ardévol E, Minguillón C, Garcia G, Serra ME, González CA, Alvarez L, Eritja R y Col. Environmental tobacco smoke interference in the assessment of the health impact of a municipal waste incinerator on children through urinary thioether assay. Public Health 1999; 133: 295-98

10. Rivero E, Piñero S, González S, Sousa L, Rodríguez M, Barrio E. Aductos de hemoglobina y micronúcleos en trabajadores hospitalarios expuestos a óxido de etileno. Saud trab 2009; 17 (1): 7-22

11. Rivero E, Piñero S, De Sousa L, González S, Bello M, Marrero S y Col. Correlación entre la concentración de tioéteres en la orina y la exposición al óxido de etileno, en trabajadores del área de esterilización de un centro asistencial público. Informe Médico 2005; 7 (10): 475- 80

12. Thiringer G, Granung G, Holmen A, Hogstedt B, Jarvholm B, Jonsson D y col. Comparison of methods for the biomonitoring of nurses handling antitumor drugs. Scand J Work Environ Health 1991; (17):133-8

13. Patel J, Shukla S, Patel H, Kothari K, Shah P, Patel P y col. Utility of urinary biomarkers in oral cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2007; 8(2): 229-35.

14. Ghosh S, Bhatnagar V, Doctor P, Shah M, Amin R, Kulkarni P y Col. Cotinine, thioether, and glucuronide excretion among active and passive bidi smokers in India. Arch Environ Health 2003; 58(6):368-72.

15. Sinues B, Izquierdo M, Pérez J. Chromosome and urinary thioethers in smokers. Mutat Res 1990; 24(2): 289-93

16. OMS. Un plan de medidas para hacer retroceder la epidemia de tabaquismo. Disponible en: [http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower\\_spanish.pdf](http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_spanish.pdf). Consultado: 27/05/10

17. Gutiérrez A. Oxidantes en el humo del cigarro y

enfermedades cardiopulmonares. Rev. Cubana 2003; 42 (5): 215-26

18. Kambara N. Comparative electron impact, chemical ionization and Field desorption mass spectra of some thioether metabolites of acetaminofen. Biomedical Mass Spectrometry 1981; 8(6):244-51.

19. Barr D, Wilder L, Caudill S, Gonzalez A, Needham L, Pirkle J. Urinary Creatinine Concentrations in the U.S Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements. Environ Health Pers. 2005. 113(3) 192-00

20. Van Doorn R, Leijdekkers CP, Henderson PT, Vanhoorne M, Vertin PG. Determination of thio compounds in urine of workers exposed to carbon disulfide. Arch Environ Health. 1981;36(6):289-97.

21. Saénz MA. Biomarcadores de exposición a mutágenos y determinismo genético en pacientes con cáncer broncopulmonar. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. 1992. Disponible en <http://zaguan.unizar.es>