

TESIS DOCTORAL  
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la  
Universitat Autònoma de Barcelona,

**ESTUDIO CITOGENÉTICO  
EN AMNIOCITOS  
DE GESTANTES FUMADORAS**

**Rosana de la Chica Díaz**

noviembre de 2005

El Dr. Josep Egozcue Cuixart y la Dra. Carme Fuster Marqués del  
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la  
Universitat Autònoma de Barcelona,

**CERTIFICAN**

Que Rosana de la Chica Díaz ha realizado, bajo su dirección, el  
trabajo titulado “*Estudio citogenético en amniocitos de gestantes  
fumadoras*”

Este trabajo se ha realizado en la Unitat de Biologia Cel·lular i  
Genètica Mèdica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), noviembre de 2005

Dr. Josep Egozcue

Dra. Carme Fuster

*A Jordi*

¡Mira este día! Pues es la vida, la propia vida de la vida.  
Ayer no es más que un sueño y mañana es tan sólo una visión.

Kalidasa

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su contribución a mi doctorado, tanto por su aportación científica como humana. Mi agradecimiento especial a las siguientes:

A Josep Egozcue, a quién profeso una gran admiración, ya que confió en mí y en la idea de esta tesis, permitiendo que me integrase en su equipo de investigación. Por su interés, paciencia, comprensión, y por su aportación inestimable, tanto a nivel profesional como humana, sin cuya dirección no habría sido posible la realización de esta tesis.

A Carme Fuster, por ser la codirectora de esta tesis, por todo lo que he aprendido de ella, por su enorme paciencia y por su gran colaboración.

A Isabel Ribas, por facilitarme las muestras del estudio, por colaborar desde principio a fin de este trabajo y por estar siempre dispuesta a darme una mano.

A la Unidad de Biología Celular i Genètica Humana de la Facultat de Medicina de la UAB por acogerme y permitirme llevar a cabo este estudio. Y sobre todo a los profes de la Unidad, por su profesionalidad y afecto que me han demostrado en todos estos años: A Rosa Miró, a Joaquina Navarro por su gran amistad, a Jordi Benet, Cristina Templado, a Montse Garcíá por nuestras charlas sobre plantas y otras cosas....

Al Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal (CPC) por facilitar las muestras del presente estudio. Especialmente quiero agradecer la colaboración de la Secretaria: Elisabeth Miras, a Begoña Méndez y a Marta Carrera.

A la Generalitat de Catalunya por la financiación otorgada a nuestro grupo de investigación (2001, SGR-00201).

A Alberto Plaja, por confiar siempre en mí, y a todos los compañeros del Valle d'Hebron ya que en momentos difíciles para mí supieron apoyarme y animarme para seguir luchando en todos los ámbitos

A Jesús Giraldo, por su soporte estadístico, su ayuda en la elaboración de los resultados y por la constancia que ha mostrado en todo momento.

A los colegas del Departamento de Hematología de la Dra. Woessner y el Dr. Francesc Solé.

A los compañeros del laboratorio:

A los antiguos, aunque no tuvimos oportunidad de conocernos mejor: Pere Colls, Olga, Ricard, Maria Ribas.

Piedad, Merçe Durban, Merçe Bosh, Maria Oliver, Imma, Angels Rigola, Mónica Santos (por su regalo de cromosomas), Ariadna, Cristina Hernando (por todo su apoyo), Gemma, Ignasi (por sus palabras siempre comprensivas), Jordi Camps, Jorge, Cristina Gutiérrez (por su estimable ayuda en los

momentos finales de esta tesis), Elsa , Albert ( por su gran optimismo), Esther, Javier , Nuria Camats , Mery, Montse Codina (por sus ayudas con el Photoshop) , Bea, Pedro, Raquel , Vanesa, Ana , Yolanda (por sus consejos), Pere Puig, Angels Niubó (por todo su apoyo técnico y especialmente con el colorante Wright) y Anna Utrabo.

A los compañeros de Ciencias: Laura Latre, Nuria Arnedo, Marta Martí.

A mis compañeros de la reunión de bibliografía por sus enseñanzas y su sugerencias a lo largo de muchos y muchos años, ya desde la casa de Alberto con los zumos de Veneranda .

Al Dr. Costa-Jussa, quien me dio muchos ánimos para la realización de este proyecto.

A mis padres, sobre todo a mi padre por la confianza y porque fue él quién me animó a la realización de esta tesis.

A mis hermanos Javier y Marian, y a todos mis sobrinos: Ricard, por sus ayudas informáticas, Daniel, Julia, Gemma , Elisa y Berta.

Y sobre todo a Jordi, por su paciencia, por soportar y aguantar todas mis “neuras” y porque sin él no hubiese terminado mi tesis doctoral.

Supongo que hay gente que no he nombrado pero que merecen mi agradecimiento.

Muchas Gracias a todos

## INDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Consumo del tabaco: efecto sobre la salud.....	1
1.1.1 Componentes del humo del tabaco.....	6
1.2 Mutagénesis.....	10
1.2.1 Anomalías cromosómicas.....	11
1.2.1.1 Anomalías numéricas.....	12
1.2.1.2 Anomalías estructurales.....	12
1.2.1.2.1 tipo cromosoma.....	13
1.2.1.2.2 tipo cromátide.....	20
1.3 Lugares frágiles.....	27
<b>2.- OBJETIVOS</b> .....	29
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	31
3.1 Origen y características de la serie analizada.....	31
3.2 Material de laboratorio.....	36
3.3 Metodología experimental.....	37
3.3.1 Técnica de cultivo y obtención de preparaciones.....	37
3.3.2 Técnicas de identificación cromosómica.....	39
3.4 Análisis al microscopio.....	42
3.5 Análisis estadístico.....	43
3.5.1 Modelo de ecuaciones estimado generalizado (GEE).....	43
3.5.2 Método multinominal para el estudio de Lugares Frágiles (FSM)	44
3.5.3 Comprobación de las bandas más implicadas en cada grupo: análisis estadístico de las diferencias.....	45

<b>4.- RESULTADOS</b> .....	47
4.1 Puesta a punto de la técnica Uniforme-Bandas G a partir de extensiones de amniocitos realizadas previamente con fines diagnósticos.....	47
4.2 Resultados citogenéticos.....	50
4.2.1 Análisis de las metafases aberrantes.....	50
4.2.2 Análisis de la inestabilidad cromosómica.....	51
4.2.3 Análisis de los resultados citogenéticos obtenidos en relación a las características de las muestras.....	57
4.2.4 Frecuencia de roturas cromosómicas por banda.....	63
4.2.5 Bandas cromosómicas preferentemente afectadas.....	64
4.2.6 Relación entre las bandas cromosómicas preferentemente afectadas y bandas donde se localizan lugares frágiles.....	67
4.2.7 Regiones cromosómicas especialmente afectadas por el efecto genotóxico del tabaco.....	68
<b>5.- DISCUSIÓN</b> .....	71
5.1 Característica de la serie analizada.....	71
5.2 Efecto genotóxico del tabaco.....	73
5.2.1 Regiones cromosómicas especialmente afectadas por el consumo del tabaco.....	76
5.2.2 Relación entre el incremento de la inestabilidad cromosómica, las regiones cromosómicas especialmente afectadas por la exposición al tabaco y cáncer.....	79
<b>6.- CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	91
<b>8.- ANEXOS</b> .....	119
8.1 Encuesta.....	119
8.2 Artículo.....	120b
8.3 Índice de impacto del Journal Citation Report, 2004 .....	121

## *1.- INTRODUCCIÓN*

---

# 1- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Consumo del tabaco: efecto sobre la salud

El tabaco ("Nicotiana tabacum") es una planta originaria de América que crece en climas húmedos y con temperaturas que oscilan entre los 18 y los 22 °C (Fig.1).



**FIGURA 1.** Hojas de Nicotiana tabacum

Fue utilizada por los indios amazónicos dentro de un contexto cultural con fines mágico-religiosos y curativos. En 1492 al descubrir el Nuevo Mundo, Colón no le dio mucha importancia al tabaco. Sin embargo, algunos de sus acompañantes, empezando por Rodrigo de Jerez, cayeron rápidamente en el hábito de fumar. Este hábito más adelante fue adquirido por los conquistadores y después por los colonizadores y así, poco a poco, se fue introduciendo en España y Portugal, y después progresivamente en Europa.

Hasta el siglo XIX la mayor parte del tabaco consumido era masticado o fumado en forma de cigarrillos o en pipa. Por el contrario, el consumo de cigarrillos es la forma predominante de consumo de tabaco desde los inicios del siglo XX. Este incremento en el consumo de tabaco y el cambio en la forma de

consumo se deben, fundamentalmente, a la invención de máquinas manufactureras de cigarrillos a finales del siglo XIX, incluso de tipo doméstico, y la publicidad a gran escala de estos productos a partir de los primeros años del siglo XX. Estos cambios en los patrones de consumo han tenido importantes implicaciones sobre la salud.

Según el informe de la "European Actions on Smoking in Pregnancy" (<http://www.famp.es/famp/programas/euroscip/textospdf/INFORMEESP>) en la actualidad el 36% de la población adulta española es fumadora y un 13% exfumadora, lo cual da una idea de la magnitud del problema.

El cigarrillo es la forma de consumo de tabaco que goza de mayor popularidad y aceptación (emboquillados o sin filtro, rubios y negros, light, semilights o enteros). Le siguen, bastante por detrás, en cifras de consumo el cigarro puro, la pipa y dos modalidades conocidas como "tabaco sin humo": el rapé (tabaco en polvo que se inhala), el tabaco de mascar y actualmente el tabaco de hierbas (O'Connor y col., 2005; Soldz y Dorsey, 2005)

Aunque todo consumo de tabaco conlleva serios riesgos para la salud, cualquiera que sea el tipo que se consuma, es importante tener en cuenta que hay diferencias significativas entre un tipo y otro, tanto desde el punto de vista de la toxicidad como de la adicción. Si nos centramos en el tabaco fumado, el riesgo es mayor cuanto mayor sea el número de cigarrillos consumidos, más años se lleve fumando y más elevado sea el contenido de alquitranes y nicotina de cada cigarrillo. Este último factor depende, de la forma de cultivo, el momento de cosecha, el tipo de curado, la fermentación y la clase de aditivos.

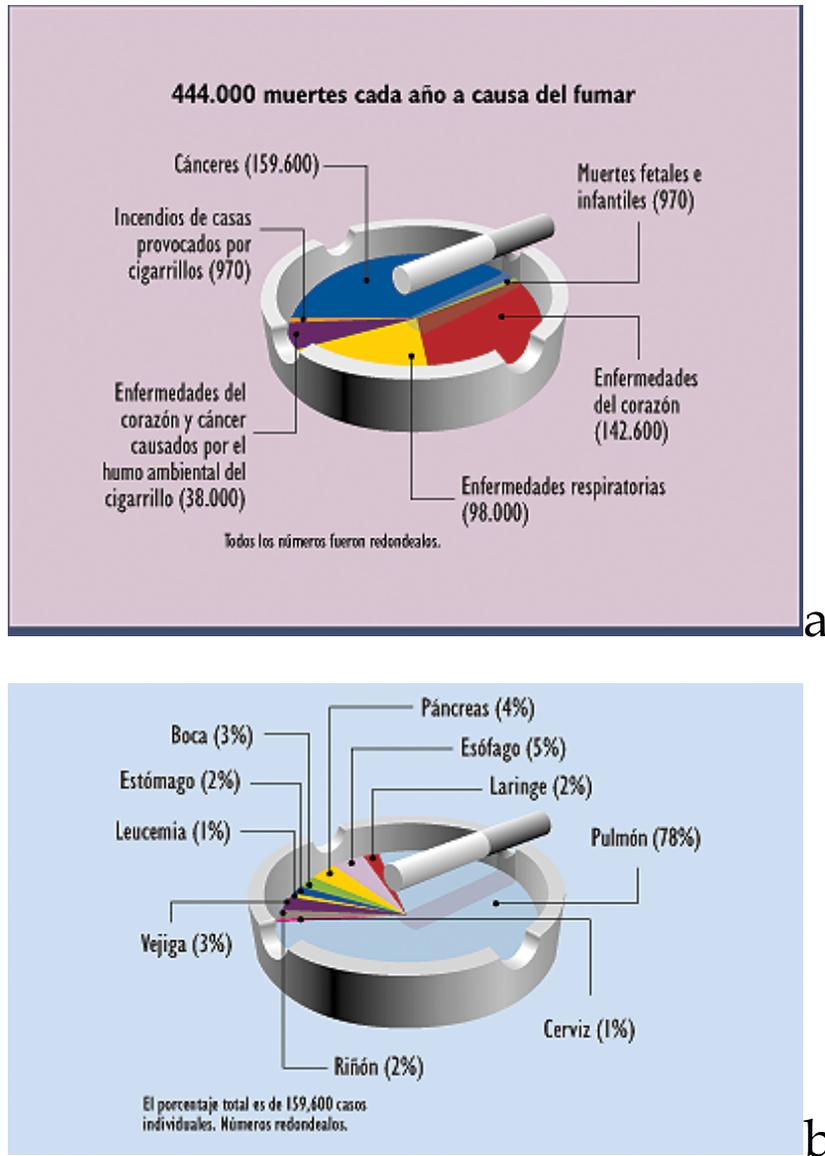
Según los datos que maneja la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tabaquismo es hoy la epidemia más peligrosa en la humanidad después del Sida ya que en todo el mundo se producen seis muertes por minuto por esta causa. Según la Organización mundial de la salud más de mil cien millones de

personas fuman, es decir, el 18,3% de la población y se estima que de ellos fallecerán 9 millones de aquí al año 2020, (de Seixas Correa, 2002)

Entre las principales consecuencias en la salud del individuo que consume regularmente tabaco, Fig.2, se encuentran: incremento del riesgo de problemas de coagulación, cardiovasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer y efectos adversos en el embarazo (Petersen, 2003; Zdravkovic y col., 2005;)

Otra consecuencia importante del hábito de fumar es que en los hombres se observa una reducción en el recuento espermático, que es proporcional al consumo de tabaco, y también se ha observado que es más probable encontrar espermatozoides anormales, con un cromosoma Y extra, en jóvenes de 18 años de edad (Rubes y col., 1998).

A pesar de la publicidad advirtiendo las consecuencias perjudiciales del consumo de tabaco en la salud existe un elevado porcentaje de **mujeres que fuman**. En general, el hábito de fumar ha sido siempre más común entre la población masculina. Sin embargo, la diferencia entre géneros empezó a disminuir hacia mediados de la década de los ochenta y se ha mantenido casi invariable hasta hoy. En 1998, dicho consumo alcanzó el 22% de la población femenina (Baumert y col., 2005). Según un estudio, reciente del Hospital Carlos III, en España el porcentaje de mujeres que continúan fumando durante el embarazo alcanza el 30% (Martínez-Frías y col. ,2005).



**FIGURA 2.** Principales consecuencias del consumo del tabaco en la salud: a) mortalidad debida al consumo de tabaco; b) diferentes tipos de cáncer que pueden padecer los individuos que fuman.

Department of Health & Human Services, USA, 2004

([http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr\\_2004/consumerpiece/SGRreportSpanish](http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr_2004/consumerpiece/SGRreportSpanish))

Mujeres y hombres comparten los mismos riesgos de padecer enfermedades respiratorias, circulatorias y cánceres a consecuencia del tabaco pero además, en las mujeres fumar constituye un riesgo añadido para su descendencia.

Las **mujeres embarazadas** que fuman cigarrillos tienen un mayor riesgo de tener problemas de coagulación, placenta previa, infertilidad, niños nacidos muertos (Desurmont, 2005), prematuros o con bajo peso al nacer (Wang y col., 2002). Además, existe un mayor riesgo de tener abortos espontáneos (Cnattingius, 2004). Dependiendo de la cantidad de cigarrillos, la disminución de peso del recién nacido puede llegar a alcanzar hasta los 500 gramos ya que el tabaco cambia las condiciones del desarrollo del feto (Vogler y Kozlowski, 2002).

El aumento del riesgo de alteraciones en el crecimiento físico no es lo único que puede afectar a estos niños ya que también se han descrito alteraciones en su desarrollo mental. Dichos trastornos pueden manifestarse tanto a medio como a largo plazo, pudiendo llegar a constituir trastornos graves de salud, ya que incluso pueden acabar en procesos cancerosos durante la infancia o la adolescencia. (Stjernfeldt y col., 1986; Sasco y Vainio, 1999). Recientemente, se ha descrito que estos niños pueden desarrollar trastornos de la conducta (Laucht y Schmidt, 2004; Gray y col., 2004).

Se conocen como **fumadores pasivos** aquellas personas, que a pesar de no consumir tabaco, están en contacto directo con el humo del cigarrillo. Cuando se fuma delante de otras personas se les está convirtiendo en “fumadores pasivos” al obligarles a respirar un aire contaminado con el humo que el fumador expulsa y el que genera el cigarrillo. A modo informativo, el humo de un cigarrillo emana dos veces más alquitrán y nicotina que lo inhalado por el fumador. Por ello el nivel de monóxido de carbono en la sangre de los no fumadores se eleva al compartir una habitación con fumadores (Husgafvel-Pursiainen, 2004).

En los últimos años se han llevado a cabo un elevado número de estudios en fumadores pasivos ( Diethelm y col., 2005 ;;Nazaire, 2005). Cerca del 65% de estos individuos evidencian trastornos directamente derivados del efecto nocivo del tabaco. Las investigaciones de la Agencia de Protección del Medio Ambiente en California (EPA) llevadas a cabo en 1997 avalaron la existencia de una relación entre tabaquismo pasivo y la aparición de cáncer o de enfermedades cardíacas. (Jinot y Bayard, 1994; Cardenas y col., 1997)

Resulta interesante mencionar la actitud contradictoria en la legislación incluso de los países más adelantados. Mientras existen leyes gubernamentales sobre el control alimentario que prohíben la utilización de aditivos carcinogénicos, tanto en los alimentos para personas como para animales, no existe una legislación similar con el cigarrillo. Sin embargo, afortunadamente se están realizando cambios, principalmente en la publicidad, encaminados a alertar al consumidor de los peligros que el tabaco produce en la salud.

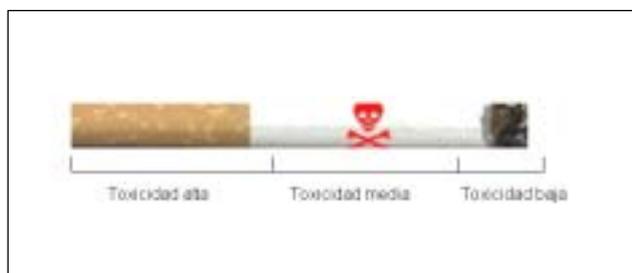
Por último indicar que los cigarrillos se fabrican para crear dependencia entre sus consumidores; el cigarrillo es la droga que con más asiduidad se consume. Nadie se droga cada 25 minutos; el fumador si.

### **1.1.1.-Componentes del humo del tabaco**

Los efectos nocivos del tabaco sobre el organismo dependen de las sustancias químicas contenidas en la hoja del tabaco, precursoras de los productos que aparecerán en el humo tras su combustión. Principalmente son: la nicotina, el monóxido de carbono, los gases irritantes, y las sustancias cancerígenas (Brunnemann y Hoffman, 1991; Jalili y col., 1998).

Prácticamente la totalidad del consumo actual se realiza mediante la inhalación de la combustión de los productos del tabaco. Las diferentes regiones del cigarrillo muestran distinta toxicidad (Fig.3). En el extremo del cigarrillo que se está quemando se alcanzan temperaturas próximas a los 1000°C, lo que transforma numerosos componentes originales de la planta y genera complejas

reacciones químicas que dificultan la identificación completa de todas las sustancias que existen o se generan en el proceso de fumar.



**FIGURA 3.** Relación entre regiones del cigarrillo y grado de toxicidad

La composición del humo de la calada depende del tipo de tabaco y de múltiples factores como la profundidad de la inhalación, la temperatura de combustión, la longitud del cigarrillo, la porosidad del papel y la presencia de aditivos y filtros (Simon y col., 2005 ; Torikaiu y col., 2005).

La concentración de sustancias tóxicas es mayor a medida que se dan pipadas al cigarrillo, hasta alcanzar en la última calada el doble que en la primera. Hasta ahora se han reconocido cerca de 4.000 elementos químicos presentes en la fase gaseosa y la sólida o en las partículas del humo del tabaco (Brunnemann y Hoffmann, 1991)

La composición de la corriente principal que aspira el fumador es bastante diferente de la secundaria que se escapa del cigarrillo al ambiente. Muchas sustancias nocivas presentes en el humo están más concentradas en esta corriente secundaria (monóxido y dióxido de carbono, amoníaco, benceno, benzopireno, anilina, acroleína y otros muchos), lo que incrementa la toxicidad de la atmósfera que genera (Hecht, 1999) (Tabla 1)

La mayoría de los efectos perjudiciales del humo de tabaco se deben a la presencia de monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, amoníaco, ácido

cianhídrico y acroleína, entre otras sustancias (Surgeon General of the US 1979) (Tabla 2).

**TABLA 1.** Principales sustancias químicas cancerígenas del humo del tabaco

<b>Compuestos químicos genéricos</b>	<b>Cancerígeno</b>
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Benzo (a) pireno Benzo (b) fluoranteno Benzo (f) fluoranteno Benzo (k) fluoranteno Dibenzo (a,i) pireno Indeno (1,2,3-cd) Antraceno 5-metilcriseno
Aza-arenos	Dibenzo (a,h) acridina 7H- Dibenzo(c,f)carbazole
N- nitosaminas	N- nitrosodietilamina 4- Metilnitrosamino -1-(3-piridil-1-butanona)(NNK)
Compuestos orgánicos	1, 3,-Butadieno Etil-carbonato
Compuestos inorgánicos	Níquel Cromo Cadmio Polonio-210 Arsénico Hidracina

**TABLA 2. Cantidad de los principales componentes presentes en el humo de un cigarrillo**

Principales componentes presentes en las partículas del humo del cigarrillo	
Componente	Concentración media por cigarrillo
Alquitrán	1-40 mg
Nicotina	1-2.5 mg
Fenol	20-150 mg
Catecol	130-280 mg
Pireno	50-200 mg
Benzo (a) pireno	20-40 mg
2.4 Dimetilfenol	49 mg
m- y p-Cresol	20 mg
p-Etilfenol	18 mg
Sigmasterol	53 mg
Fitosteroles (total)	130 mg

**Alquitrán:** Este componente es el de mayor grado tóxico, y está constituido por más de 500 sustancias distintas. Es irritante y cancerígeno

**Nicotina:** Es un alcaloide que induce la liberación de adrenalina, noradrenalina y dopamina y a través de la acción sobre el Sistema Nervioso Central, es la causante de la dependencia psíquica produciendo adicción del fumador al consumo del tabaco. La cantidad que absorbe un individuo varía con la intensidad de la inhalación; generalmente solo absorbe un 30% del contenido de nicotina, y el resto pasa al ambiente. De manera que cuando se

fuma en espacios cerrados, los no fumadores se convierten en fumadores pasivos pues inhalan el humo presente en el ambiente.

También tiene un efecto vasoconstrictor, que afecta a distintos órganos centrales, especialmente el corazón, a través de las arterias coronarias. El tabaco también produce vasoconstricción de los vasos de la placenta de la mujer embarazada, cuya función principal es el intercambio de oxígeno y nutrientes con el feto, viéndose afectado éste en el desarrollo (peso y talla inferiores a lo normal), y también por la acción de metales pesados inhalados por la madre, que pasan al torrente circulatorio del feto (Gomolka y col., 2004)

**Monóxido de carbono:** Es un gas que procede de la combustión incompleta del tabaco. Este compuesto tiene la particularidad de competir con el oxígeno en su combinación con la hemoglobina, pero al tener una afinidad 300 veces superior, forma un compuesto, la carboxihemoglobina, que no es útil para la respiración celular al bloquear el transporte de oxígeno. Este efecto, sumado a la vasoconstricción coronaria que da la nicotina, justifica la relación del hábito de fumar y la aparición de accidentes coronarios.

**Sustancias cancerígenas:** En el humo del tabaco se han detectado diversas sustancias cancerígenas, como el benzopireno, que se forman durante la combustión del tabaco o del papel de los cigarrillos (IARC, 1986)

Recientemente, DeMarini (2004) ha publicado una revisión en la que se evidencia el efecto genotóxico del tabaco en distintos tejidos en fumadores.

## **1.2.- Mutagénesis**

El ADN es una molécula con una gran estabilidad que, mediante la replicación, es capaz de transmitir la información genética que contiene a las células hijas. Pero de forma espontánea, repentina, y con una frecuencia muy baja la molécula puede sufrir cambios. A estos cambios se les denomina

mutaciones, siendo hereditarios, ya que la célula los transmitirá a sus células hijas.

Muchos carcinógenos químicos pueden ser activados metabólicamente, al interaccionar con moléculas intracelulares, y producir daño genético. Recientemente, diversos autores han detectado la presencia de metabolitos específicos del tabaco en la orina de recién nacidos de gestantes fumadoras y de gestantes fumadoras pasivas (Lackmann y col., 1999; Jauniaux y col., 1999; Milunsky y col., 2000) lo que sugiere un posible efecto genotóxico en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Entre estas sustancias químicas se encuentran:

NNAL: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol

NNAL-Gluc: 4-[(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)but-1-yl]

$\beta$ -O-D- ácido glucosidurónico

### **1.2.1.-Anomalías cromosómicas**

La mayoría de los agentes mutagénicos y carcinogénicos (clastogénicos) producen daños en el ADN que conducen a roturas cromosómicas y por tanto a la aparición de aberraciones cromosómicas. Por tanto, las aberraciones cromosómicas que se llegan a observar mediante microscopía óptica son el producto final de una larga cadena de acontecimientos. Estos agentes clastogénicos son capaces de producir aberraciones cromosómicas a lo largo de diferentes fases del ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$ ) y difieren entre si por el daño ocasionado ya sea a nivel cuantitativo como cualitativo.

Cualquier variación en el número básico o en la morfología de los cromosomas de un individuo constituye una anomalía cromosómica. Las aberraciones cromosómicas pueden clasificarse en dos grandes grupos: Si el número total de cromosomas difiere de la dotación numérica normal (anomalías numéricas) o si la morfología, de uno o más cromosomas, ha sido afectada (anomalías estructurales)

### **1.2.1.1-Anomalías numéricas**

El número de cromosomas de una especie determinada se denomina ploidía. En la especie humana, las células somáticas son diploides ( $2n=46$ ) y las germinales haploides ( $n=23$ ). Las células euploides pueden presentar un número cromosómico que triplica la dotación haploide normal (triploides), la cuadruplica (tetraploides), quintuplica (pentaploides), etc.

Las células aneuploides pueden presentar una nulisomía (falta de un par completo de cromosomas homólogos), una monosomía (ausencia en una célula de un cromosoma), trisomía, tetrasomía, pentasomía etc. (existencia de uno, dos, tres, etc... cromosomas adicionales para un determinado par de homólogos).

### **1.2.1.2 Anomalías estructurales**

Existen dos teorías básicas que intentan responder a los posibles mecanismos de formación de las alteraciones cromosómicas estructurales: la teoría clásica (o teoría de rotura y reunión) y la teoría recombinante. La teoría más aceptada actualmente es la teoría clásica, es decir, que las roturas de cromátide constituyen lesiones primarias de las cuales derivan, por un proceso incorrecto de reparación los diferentes tipos de reordenamientos cromosómicos.

Para comprender mejor el mecanismo de origen de los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas estructurales es necesario tener en cuenta el momento del ciclo celular en que se produce el daño genético. Las alteraciones en los cromosomas que surgen durante el periodo G1 (o fase pre-S) de la interfase, o sea cuando el cromosoma aún no ha replicado, producen aberraciones tipo cromosoma porque afectan a las dos cromátides. En cambio, las aberraciones de tipo cromátide se producen en cromosomas ya replicados, es decir que se encuentran en el periodo G2 (o fase post-S) del ciclo celular.

Las alteraciones de uno u otro tipo (cromosoma o cromátide) pueden configurar cambios simétricos o asimétricos. Se denominan cambios simétricos

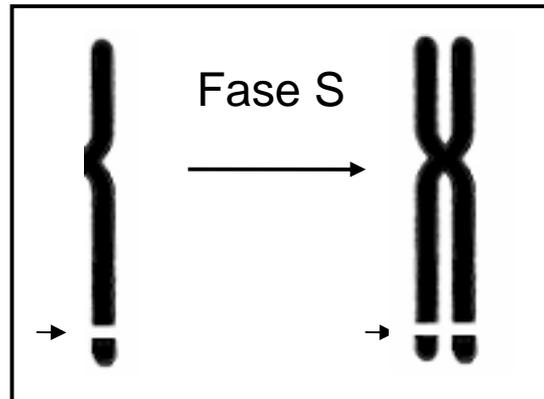
a aquellos que implican un reordenamiento del material genético capaz de mantenerse a través del ciclo celular. Los de tipo asimétrico, implican conformaciones con tendencia a la pérdida anafásica, o a la inestabilidad cromosómica.

Ambos tipos de aberraciones pueden dar lugar a discontinuidades o a reordenamientos. Estos últimos pueden, a su vez, ser clasificados como intracromosómicos, o sea reordenamientos dentro de un cromosoma, o intercromosómicos, correspondientes a reordenamientos entre dos o más cromosomas diferentes.

#### **1.2.1.2.1- Tipo Cromosoma**

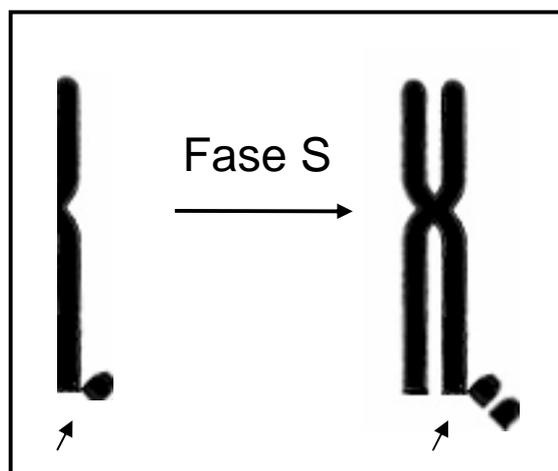
##### **a) Discontinuidades**

- Lesión acromática o “gap”: Corresponde a una región cromosómica que posee escasa o nula coloración que se origina por la producción de una rotura en un brazo cromosómico. Esta lesión inicial se amplifica como consecuencia del proceso de replicación del ADN (fase S) y en la mitosis subsiguiente se observa un cromosoma con ambas cromátidas afectadas. Debe clasificarse como “gap” toda lesión de este tipo cuyo ancho sea menor al de la cromátide. En algunos casos es posible observar un delgado filamento de cromatina que conecta los segmentos proximal y distal al “gap” y que confirma la existencia de una lesión acromática. (Fig.4).



**FIGURA 4.** Lesión tipo gap de cromosoma (chrg). A la izquierda se muestra un gap de cromosoma en fase G1 y a la derecha en fase G2.

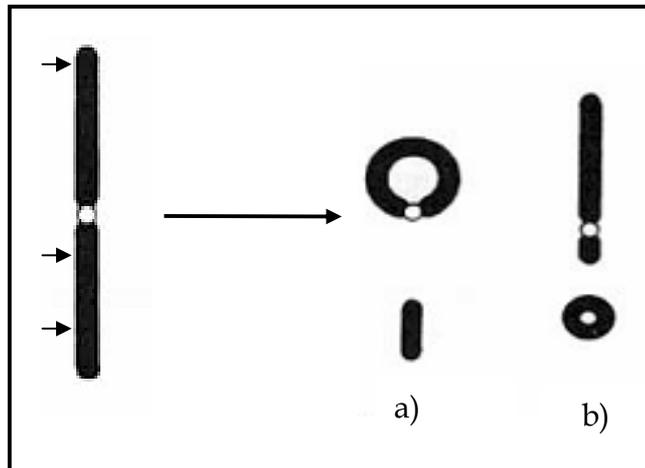
Rotura cromosómica: se origina por la producción de una rotura en un brazo cromosómico (Fig.5). Esta lesión inicial se amplifica como consecuencia del proceso de replicación del ADN (fase S) y en la mitosis subsiguiente se observa un cromosoma con ambas cromátidas rotas, dando lugar a un cromosoma de tamaño inferior al normal y un fragmento acéntrico (sin centrómero). Ocasionalmente puede ser confundida con una *delección terminal*



**FIGURA 5.** Lesión tipo rotura de cromosoma (chrb). A la izquierda en fase G1 y a la derecha en fase G2

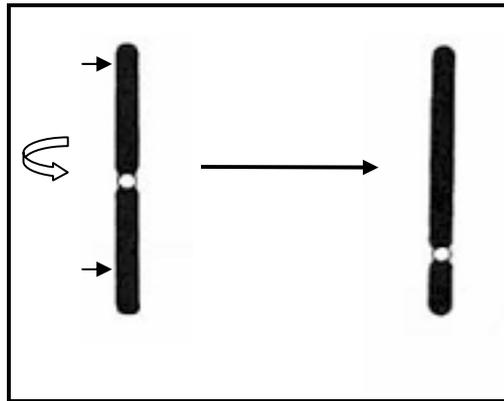
**b) Cambios Intracromosómicos Interbraquiales (afectan a ambos brazos de un mismo cromosoma)**

- *Cromosomas en anillo*: Se originan por un proceso de doble rotura que involucra ambos brazos del cromosoma (Fig.6). Subsiguientemente se produce la reasociación de los extremos proximales del cromosoma con formación de un anillo céntrico (con centrómero) y los correspondientes fragmentos acéntricos que pueden o no fusionarse. O bien dando lugar a un fragmento céntrico más un anillo acéntrico.



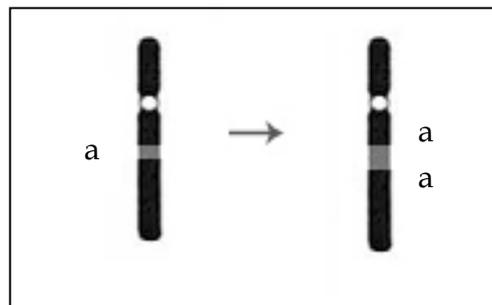
**FIGURA 6.** Formación de un cromosoma en anillo (r): a) anillo céntrico con su correspondiente fragmento acéntrico; y b) anillo acéntrico y fragmento céntrico.

- *Inversión pericéntrica*: Surge como resultado de un mecanismo que se inicia con la producción de dos roturas (una en cada brazo cromosómico). El segmento intercalar céntrico intercambia los fragmentos de sus extremos (Fig.7).



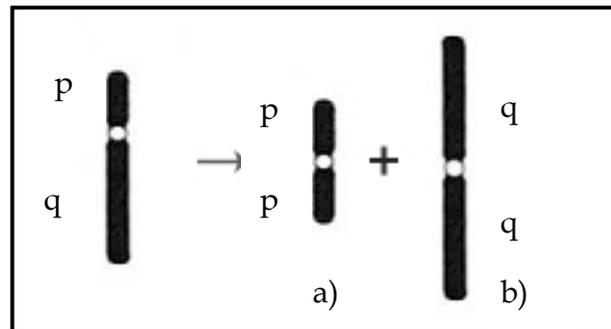
**FIGURA 7.** Inversión pericéntrica (inv)

- Duplicaciones: Consisten en la adición de un fragmento del mismo cromosoma. Se produce generalmente en tándem, como resultado de un intercambio asimétrico entre cromosomas homólogos, o de un intercambio asimétrico entre las cromátides de un cromosoma. Si las zonas duplicadas se hallan dispuestas en el mismo sentido, se habla de duplicación en tándem, si en sentido opuesto, de tándem invertido (Fig.8).



**FIGURA 8.** Duplicación (dup)

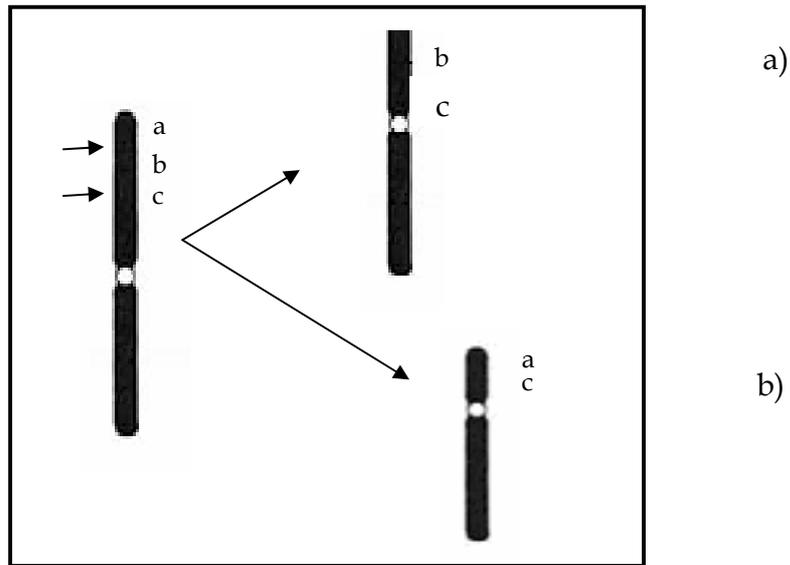
- Isocromosomas: Son un tipo especial de anomalía en la que se combina duplicaciones y deficiencias de un brazo cromosómico (Fig.9). Se forman por rotura transversal del centrómero, dicha rotura puede producirse tanto en mitosis como en meiosis, y constituye el fenómeno opuesto (fisión) a la translocación o fusión Robertsoniana.



**FIGURA 9.** Isocromosoma (iso): a) de brazos cortos; y b) isocromosoma de brazos largos

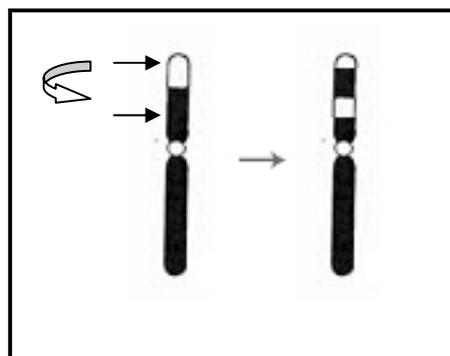
**c) Cambios Intracromosómicos Intrabraquiales (afectan a un único brazo de un mismo cromosoma)**

- ***Delección intersticial:*** Se produce por la aparición de una doble lesión en un mismo brazo cromosómico con posterior eliminación del segmento intercalar y reasociación de los extremos próximal y distal del cromosoma (Fig.10b). Se debe a un intercambio simétrico entre cromosomas homólogos con lesiones situadas a distinto nivel (con lo que el homólogo presentará una duplicación) o a un intercambio simétrico entre los brazos de un mismo cromosoma. Si el segmento intercalar tiene un gran tamaño puede formar un anillo acéntrico.
- ***Delección terminal.*** Este tipo de delección consiste en la pérdida de un fragmento terminal del cromosoma (Fig.10a). Las delecciones terminales se producen por una simple rotura.



**FIGURA 10.** Deleción cromosómica (del): deleción terminal (a); deleción intersticial (b)

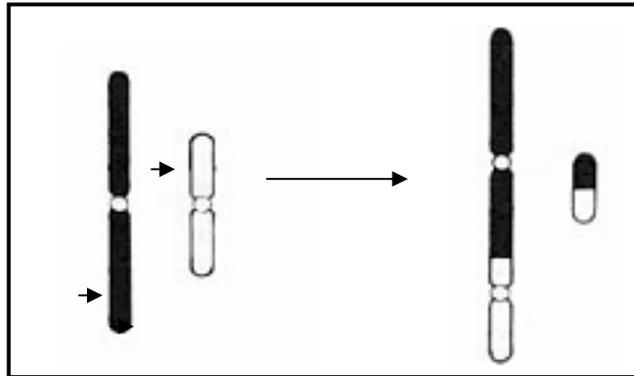
- *Inversión paracéntrica:* Comparte con la inversión pericéntrica del grupo anterior el mecanismo de producción pero se diferencia del mismo en que los dos sitios de rotura del cromosoma se hallan localizados en el mismo brazo (Fig.11). Al no hallarse involucrado el centrómero en este tipo de reordenamiento, la posición del mismo nunca cambia y por tanto se conserva también su morfología.



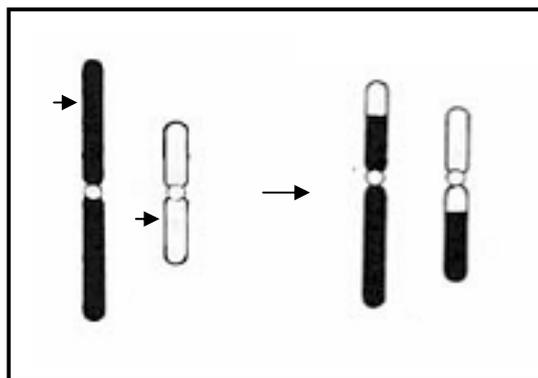
**FIGURA 11.** Inversión paracéntrica (inv)

**d) Cambios Intercromosómicos**

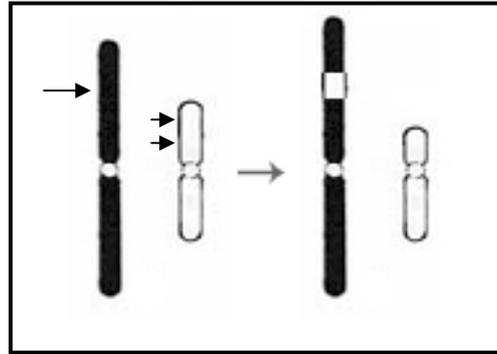
- *Cromosomas dicéntricos*: Como su nombre lo indica, poseen dos centrómeros y se originan por la unión de dos cromosomas, homólogos o no, que han sufrido una rotura cada uno. Los fragmentos originados pueden o no unirse (Fig. 12).

**FIGURA 12.** Cromosomas dicéntricos (dic)

- *Translocaciones*: Constituyen alteraciones estructurales caracterizadas por el traslado de un segmento cromosómico a otra región del otro cromosoma no homólogos (Fig.13).

**FIGURA 13.** Translocación recíproca (t).

- Inserciones: Constituyen alteraciones estructurales caracterizadas por el traslado de un segmento cromosómico intersticial a otra región del otro cromosoma no homólogo (Fig.14).

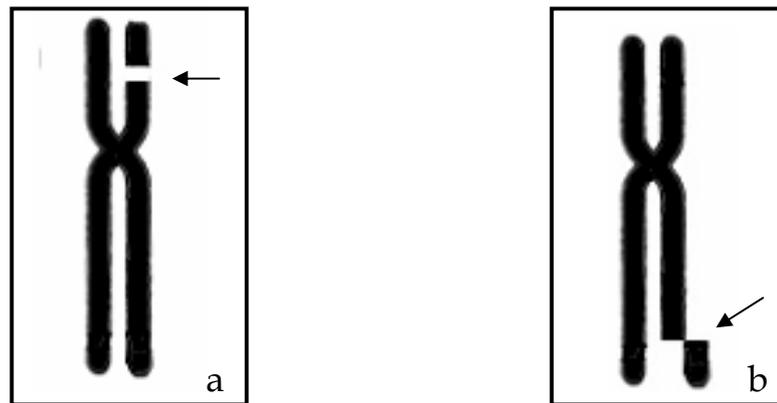


**FIGURA 14.** Inserción ( ins)

#### 1.2.1.2.2- Tipo Cromátide

##### a) Discontinuidades

- Lesión acromática o "gap": Corresponde a una región cromosómica que posee escasa o nula coloración que se originan por la producción de una rotura en una sola cromátide. Como en el caso de gap de cromosoma debe clasificarse como "gap" toda lesión cuyo ancho sea menor que el de la cromátide (Fig.15a).
- Rotura de cromátide: se origina por la producción de una rotura en una sola cromátide (Fig.15b).



**FIGURA 15.** Lesión cromosómica tipo cromátide: a) Gap de cromátide (chtg), y b) Rotura de cromátide (chtb).

#### **b) Cambios Intracromosómicos**

- Anillo acéntrico de cromátide: se originan por un proceso de doble fractura de cromátide que involucra ambos brazos del cromosoma.

#### **c) Cambios Intercromosómicos**

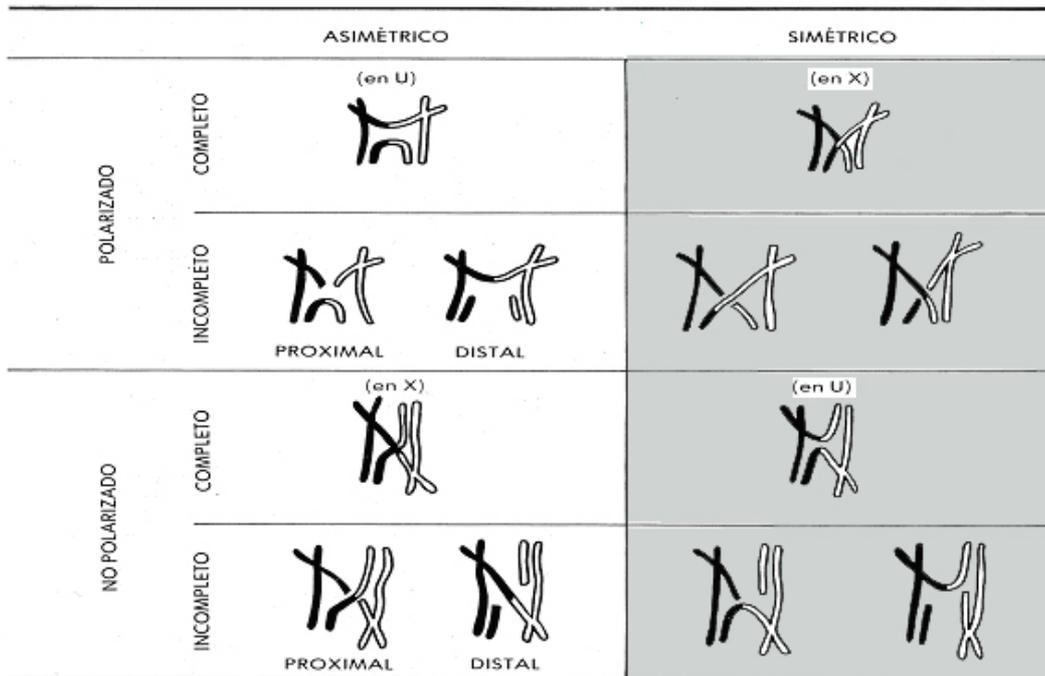
- Translocación de cromátide: De la misma manera que ocurre con la formación del anillo de cromátide, la translocación de cromátide implica dos roturas de cromátide en dos cromosomas distintos y posterior intercambio de los fragmentos de cromátide generados.

#### **d) Intercambios de cromátide**

- Cuadrirradial Simétrico. La existencia de cromátides fracturadas en dos cromosomas diferentes propicia la producción de una translocación recíproca entre cromátides, observándose en la metafase siguiente una configuración característica de este proceso que se denomina cuadrirradial o quiasma mitótico.

- Cuadrirradial Asimétrico. En este tipo de configuración las lesiones de cromátide son similares, y la forma de reasociación de los segmentos determina la formación de un cuadrirradial que contiene un dicéntrico y un fragmento acéntrico.
- Trirradial: Se origina por la interacción producida entre un cromosoma que posee una deleción de cromátide y uno que tiene una rotura de isocromátide. La recombinación de los segmentos fracturados puede producir un trirradial con dos centrómeros y un fragmento acéntrico doble o bien un trirradial simple y un cromosoma de tamaño inferior al original.

Cuando se producen intercambios de cromátide entre cromosomas distintos, homólogos o no, el producto resultante puede hallarse polarizado si ambos centrómeros se hallan situados en un mismo lado del intercambio, o no polarizados en caso contrario. La disposición del producto del intercambio puede ser en *U* o en *X* (Fig. 16)



**FIGURA 16.** Intercambios de cromátides simples (Egozcue y col. ,1978).

En los intercambios complejos de cromátide, el intercambio se denomina obligado cuando una misma lesión participa en más de un intercambio, y no obligado cuando cada lesión interviene en tan sólo un intercambio (Fig. 17).

	ASIMÉTRICO	SIMÉTRICO	MIXTO
OBLIGADO			
NO OBLIGADO			

**FIGURA 17.** Intercambios de cromátides complejos (Egozcue y col., 1978)

Por último, dado que las lesiones de cromosoma se originan antes de la fase S y las de cromátida después de esta etapa, la clasificación de las distintas alteraciones estructurales pueden realizarse según la etapa del ciclo celular donde se originan (Tabla 3).

En la figura 18 se resumen los tipos de aberraciones cromosómicas.

**TABLA 3.** Clasificación de las alteraciones cromosómicas estructurales según la fase del ciclo celular y el número de roturas requeridas.

**Alteraciones cromosómicas según el ciclo celular**

**G1:**

1 rotura	delección terminal
2 roturas intrabrazo	doble anillo acéntrico inversión paracéntrica
2 roturas interbrazo	inversión pericéntrica anillo céntrico
2 roturas intercromosoma	translocación recíproca dicéntrico

**G2:**

1 rotura	delección terminal
2 roturas	intrabrazo intercromátide duplicación o deficiencia cromátide dicéntrica
2 roturas intrabrazo intracromátide	anillo acéntrico simple inversión paracéntrica
2 roturas interbrazo intracromátide	anillo céntrico simple inversión pericéntrica
2 roturas interbrazo intercromátide	duplicación o deficiencia doble cromátide dicéntrica
2 roturas intercromosoma	translocación recíproca (cuadrirradial) dicéntrico + acéntrico (cuadrirradial)

<i>Tipo de Aberración</i>	<i>Esquema</i>	<i>Tipo de Aberración</i>	<i>Esquema</i>
<b>TIPO CROMOSOMA</b>			
(1) Lesión acromática o gap		(2) Fractura de cromátide	 Fragmento desplazado
(2) Fractura cromosómica o deleción terminal		(3) Fractura de isocromátide	 Unión proximal y distal Unión proximal  Unión distal 
(3) Reordenamientos cromosómicos		(4) Reordenamientos de cromátide	
(a) Intercambio	 Dicéntrico con fragmento	(a) Intercambio	 Cuadrirradial Asimétrico
(b) Intracambio			 Cuadrirradial Simétrico
Inter-braquial	 Anillo céntrico con fragmento	(b) Intracambio	
Intra-braquial	 Anillo acéntrico deleción intesrticial	Inter-braquial	 Asimétrico Anillo de cromátide
		Intra-braquial	 Simétrico Translocación de cromátide
<b>TIPO CROMÁTIDE</b>		Intra-braquial	 Deleción intersticial de cromátide
(1) Gap de cromátide		(c) Intercambio de cromátide / isocromátide	
(2) Fractura de cromátide	 Fragmento alineado		 Trirradial dicéntrico
			 Trirradial monocéntrico

**Clasificación de las aberraciones cromosómicas estructurales**

**FIGURA 18.** Clasificación de las aberraciones cromosómicas estructurales, de tipo cromosoma y de tipo cromátide.

### **1.3.- Lugares frágiles**

Después de la descripción del primer lugar frágil en el brazo largo del cromosoma 9 en una mujer afecta de una dermatitis eczematosa, (Dekaban, 1965) transcurrieron muchos años hasta que los lugares frágiles fueron reconocidos como características comunes de los cromosomas humanos. Actualmente, los lugares frágiles se consideran como una característica universal e inherente al genoma de los mamíferos (Sutherland y Richards, 1999)

Los lugares frágiles se pueden definir como puntos específicos de los cromosomas, no distribuidos al azar, que son especialmente propensos a formar discontinuidades (gaps), roturas y figuras tri o cuadrirradiales cuando las células se cultivan bajo condiciones que inhiben la replicación o la reparación del ADN (Sutherland, 1979; HMG, 1981). Estas características son heredables. Hasta el momento, se han descrito 110 lugares frágiles en el genoma humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/list.cgi>).

Actualmente se desconoce el mecanismo de expresión citogenética de los lugares frágiles. Sutherland, (1979) sugirió que dicha expresión podía ser una consecuencia directa de la secuencia de nucleótidos y de la estructura que adopta el ADN en estos loci. Hoy en día se considera que la expresión de un lugar frágil es la manifestación de su inestabilidad genética que a su vez depende de las características de la secuencia de ADN en estos loci (Sutherland y Richards, 1999). El análisis de las características estructurales de los lugares frágiles ha revelado que estas regiones podrían formar estructuras de ADN con una alta flexibilidad e inestabilidad que podrían interferir en la correcta replicación y condensación-organización de la cromatina en estas regiones del cromosoma (Mangelsdorf y col., 2000; Morelli y col., 2002; Limomgi y col., 2003). Esto causaría una condensación incompleta de la cromatina que podría expresarse a nivel citogenético como gap o rotura.

A excepción de tres lugares frágiles directamente relacionados con enfermedades humanas: FRAXA (asociado al síndrome del X frágil); FRAXE (asociado a un retraso mental ligado al cromosoma X no específico); y al FRA11B (asociado al síndrome de Jacobsen) el resto parece que no están directamente implicados en procesos patológicos humanos. El significado biológico de los lugares frágiles sigue siendo por tanto una incógnita.

La expresión del lugar frágil a menudo, si no siempre, parece estar acompañada por la fractura del ADN y por lo tanto parece predisponer a las reorganizaciones inter e intracromosómicas. La expresión de lugares frágiles se ha relacionado además con el incremento de intercambio de cromátidas hermanas (Glover y Stein, 1987), con procesos de amplificación génica que caracteriza algunos oncogenes (Coquelle y col., 1997) y con puntos de integración del genoma viral (Thorland y col., 2000).

Recientemente han ido apareciendo distintos trabajos que relacionan la inestabilidad genómica que caracteriza a los lugares frágiles, reflejo a su vez del daño genómico, con la predisposición a desarrollar distintos tipos de cáncer (Richards, 2001). Es decir la expresión de lugares frágiles es un factor que incrementa la probabilidad de iniciación y progresión de procesos tumorales (Ribas y col., 1999; Ried y col., 2000).

Como conclusión, podríamos decir que los lugares frágiles pueden intervenir en el proceso de oncogénesis mediante dos rutas diferentes (Sutherland y col., 1998), no excluyentes:

- a) Acción locus-específica. El lugar frágil estaría ubicado dentro o cerca de un protooncogen o un gen supresor de tumor. Alteraciones en el lugar frágil podrían dar lugar a deleciones en dicha región (pérdida de un gen supresor de tumor) o una alteración génica (activación de un oncogen).
- b) Inducción de alteraciones cromosómicas estructurales como resultado de las roturas inducidas por agentes clastogénicos. En este caso el lugar frágil predispondría también a procesos de amplificación génica.

## *2.- OBJETIVOS*

---

## 2- OBJETIVOS

El tabaco incrementa el riesgo de contraer distintas patologías y se sabe que también tiene efectos adversos en el desarrollo embrionario. Sin embargo, sólo se han publicado datos indirectos de su posible efecto genotóxico en el feto.

En este trabajo nos proponemos determinar si el hábito de fumar durante la gestación tiene un efecto genotóxico, expresado como un incremento de inestabilidad cromosómica, en las propias células fetales.

Para ello nos hemos planteado los siguientes **objetivos concretos**:

1. Puesta a punto de la técnica uniforme- bandas G para la identificación de lesiones y anomalías cromosómicas a partir de extensiones de amniocitos realizadas previamente con fines diagnósticos.
2. Análisis lesiones cromosómicas (roturas o gaps) y de anomalías cromosómicas estructurales en células del líquido amniótico procedentes de mujeres que fuman durante la gestación y de no fumadoras. Comparación de los resultados citogenéticos obtenidos de ambos grupos para detectar si existe, o no, aumento de inestabilidad cromosómica debida al tabaco.
3. Analizar los puntos de rotura implicados en las lesiones y anomalías cromosómicas para determinar si existen, o no, regiones cromosómicas (bandas o subbandas) que se encuentran especialmente afectadas por el tabaco.



### *3.- MATERIAL Y MÉTODOS*

---

### **3- MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1.- Origen y características de la serie analizada**

Para el presente estudio se han analizado un total de 50 muestras distintas de líquido amniótico procedentes de mujeres que se encontraban entre las 13 y las 26 semanas de gestación. Las parejas que han colaborado en este estudio habían acudido a realizar un diagnóstico prenatal al Departamento de Obstetricia y Ginecología del Instituto Universitario Dexeus de Barcelona.

Dichas muestras se subdividieron en dos grupos según el hábito de fumar de las gestantes:

- 25 muestras procedentes de gestantes fumadoras (10-20 cigarrillos/día al menos durante 10 años y que continuaban fumando durante el embarazo) y
- 25 muestras procedentes de gestantes no fumadoras y no expuestas a humo de cigarrillos ni en su hogar ni en el lugar de trabajo (no fumadoras pasivas).

Para conseguir estos dos grupos tan diferenciados fue necesario entrevistar a 800 mujeres. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de las participantes, aprobado por el Comité Ético Institucional.

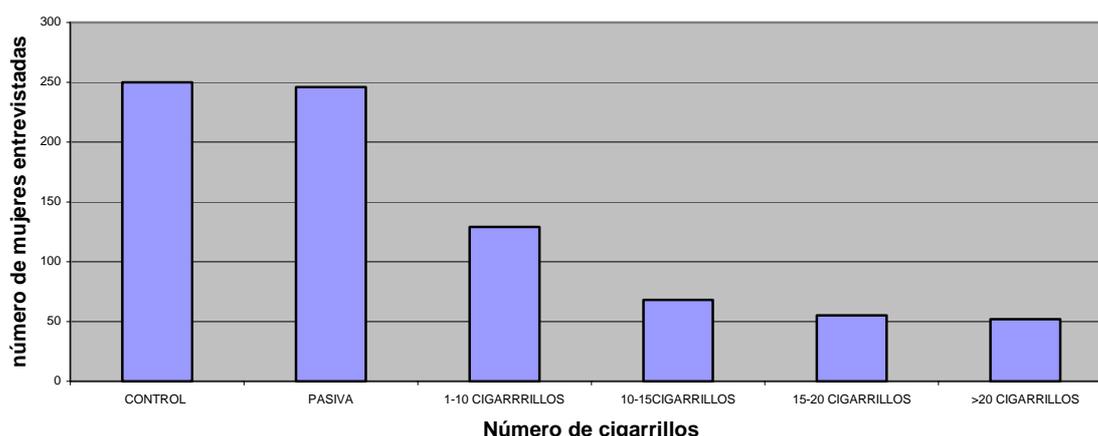
El número de mujeres no fumadoras (control), fumadoras pasivas, y de mujeres que fumaban de 1 a más de 20 cigarrillos por día se muestra en las Figura 19. La incidencia de mujeres que fuman diferente número de cigarrillos por día se indica en la figura 20.

En primer lugar, tras aceptar participar en el estudio, durante la entrevista se preguntaba a la gestante por su hábito de consumo de alcohol, café y té. Únicamente si las respuestas eran negativas se procedía a realizar un cuestionario referente a su hábito tabáquico actual y previo a su embarazo, al hábito de fumar de su marido y de su lugar de trabajo (la encuesta empleada se

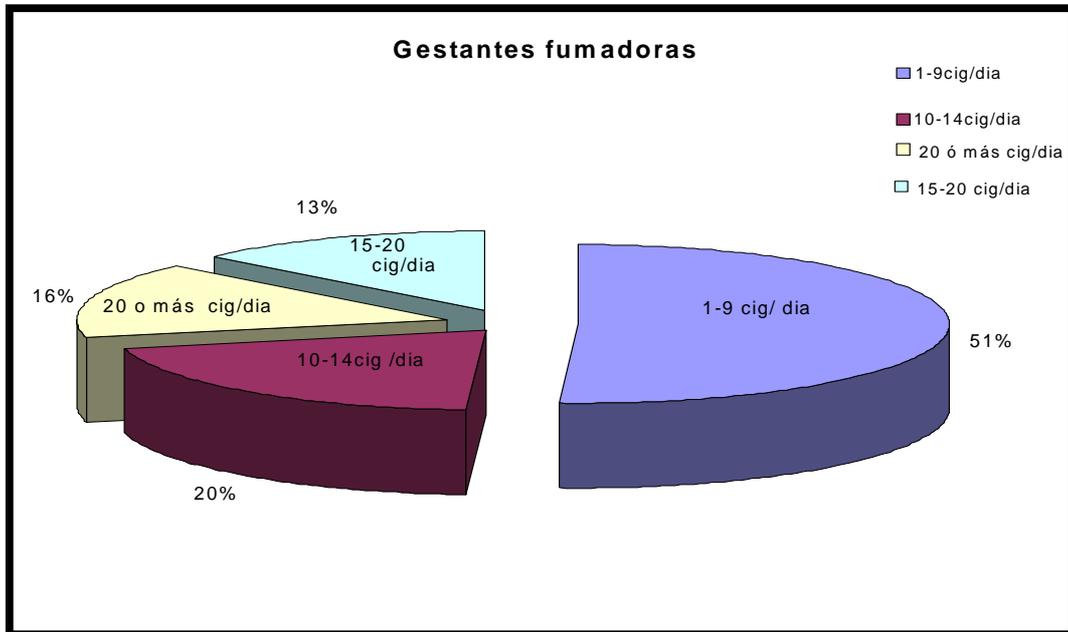
incluye en el anexo). Las primeras 25 mujeres que reunían estas condiciones y estaban bien de salud fueron incluidas en cada grupo.

Se escogieron dos grupos bien diferenciados de gestantes: las no fumadoras o control (no expuestas al humo del tabaco) y las fumadoras (que fumaban 10 o más cigarrillos/día desde al menos 10 años y que continuaban fumando durante la gestación). En el grupo de fumadoras, encontramos cinco casos en que sus maridos también fumaban de 5 a 20 cigarrillos/día (F2, F5, F7, F8, y F17), diez casos en que sus maridos no eran fumadores (F1, F3, F12, F13, F15, F16, F18, F20, F23, y F25), desconociéndose los hábitos tabáquicos del resto de los maridos.

Es interesante destacar que se requirieron 496 entrevistas para encontrar 25 gestantes no fumadoras que cumplieran los criterios establecidos en nuestro protocolo. Mientras para conseguir las 25 gestantes fumadoras según los criterios establecidos se requirieron 175 entrevistas. Las 129 entrevistas restantes correspondieron a mujeres que fumaban menos de 10 cigarrillos/día o que llevaban fumando menos de 10 años y las mujeres que habían dejado de fumar cuando conocieron que estaban embarazadas.



**FIGURA 19.** Número de encuestas realizadas para conseguir los dos grupos de estudio.



**FIGURA 20.** Porcentaje de mujeres en relación al número de cigarrillos por día que fuman.

En la Tabla 4 y 5 se indican las características principales de las muestras analizadas: edad de los progenitores, número de embarazos previos, años y cantidad de tabaco que ingiere la embarazada, semanas de gestación y indicación diagnóstica.

**TABLA 4.** Características generales de las muestras analizadas en gestantes no fumadoras (controles).

MADRES CONTROLES	EDAD MATERNA	EDAD PATERNA	NUMERO DE EMBARAZOS PREVIOS	SEMANAS DE GESTACIÓN	INDICACIONES PARA EL DIAGNOSTICO PRENATAL
C1	34	36	0	17	FIV(ICSI)
C2	36	36	2	16	Edad /abortos espontáneos
C3	34	37	0	15	Ansiedad
C4	34	35	3	16	Abortos espontáneos
C5	37	34	1	15	Edad / abortos espontáneos
C6	34	32	1	16	Anomalías ecográficas fetales
C7	34	42	0	16	Triple screening (1/77)+FIV(ICSI)
C8	37	37	4	14	Edad
C9	33	36	2	13	Triple screening(1/151)
C10	29	29	0	16	FIV(ICSI)
C11	37	36	1	16	Edad
C12	35	44	2	17	Edad
C13	28	30	0	16	Triple screening (1/250)
C14	34	30	1	15	Triple screening (1/64)
C15	33	35	1	14	Ansiedad
C16	35	?	0	15	FIV(ICSI)
C17	35	35	1	14	Triple screening (1/60)/ abortos
C18	26	28	0	26	Infección (citomegalovirus)
C19	30	33	2	16	Abortos espontáneos /FIV
C20	39	41	3	17	Edad/ abortos espontáneos
C21	37	38	2	16	Edad/ abortos espontáneos
C22	31	31	2	16	Triple screening (1/188)/ abortos espontáneos
C23	36	38	1	15	Edad/triple screening (1/85)
C24	31	31	0	23	Signos ecográficos/ FIV
C25	36	36	0	?	Edad /triple screening (1/41)

**TABLA 5.** Características generales de las muestras analizadas en gestantes fumadoras

<b>MADRES FUMADORAS</b>	<b>EDAD MATERNA</b>	<b>EDAD PATERNA</b>	<b>NUMERO DE EMBARAZOS PREVIOS</b>	<b>AÑOS FUMANDO</b>	<b>CIGARRILLOS/DIA</b>	<b>SEMANAS DE GESTACIÓN</b>	<b>INDICACIONES PARA EL DIAGNOSTICO PRENATAL</b>
F1	35	36	1	16	>20	16	Abortos espontáneos/ FIV
F2	33	36	2	13	20	19	Abortos espontáneos
F3	28	37	1	10	20	18	Toxoplasmosis
F4	35	35	4	19	>20	16	Abortos espontáneos
F5	40	34	0	24	20	14	Edad
F6	33	32	1	18	>20	15	Ansiedad
F7	37	42	1	22	20	14	Edad
F8	37	37	3	21	20	15	Edad
F9	37	36	2	22	>20	14	Edad
F10	37	29	3	24	>20	15	Abortos espontáneos
F11	37	36	0	11	10 - 15	15	Edad
F12	41	44	2	20	20	15	Edad
F13	41	30	2	20	>20	15	Edad
F14	36	30	1	12	15-20	16	Edad
F15	39	35	1	21	15-20	16	Feto previo con alteración cromosómica de “novo” /FIV
F16	39	?	1	21	15-20	16	Feto previo con alteración cromosómica de “novo” /FIV
F17	38	35	2	23	15-20	15	Edad

F18	34	28	1	16	>20	17	Ansiedad
F19	37	33	1	22	15-20	16	Edad/ sobrino con S de Klinefelter
F20	37	41	1	19	>20	15	Edad
F21	32	38	0	18	15-20	16	Edad/ansiedad
F22	41	31	0	21	10-15	14	Edad/FIV
F23	37	38	0	22	15-20	15	Edad/triple screening (1/40)/ FIV
F24	35	31	3	21	10-15	15	Antecedente de Síndrome de Potter.
F25	43	36	0	25	15-20	16	Edad

### **3.2.-Material de laboratorio**

#### **Material desechable**

- Tubo truncado tipo Leighton
- Placas de Petri

#### **Productos**

En el procesado de las muestras se ha empleado:

- Medio Chang (Irvine Scientisic, Santa Ana, California), con 1% de penicilina-estreptomina (Invitrogen Corp, Calsbad, Calif) cuando el cultivo se realizaba en las placas de Petri
- Medio RPMI: HAM-F10 (1:1) (Invitrogen) con 5.5% de suero fetal (Invitrogen); 2,5% ultroser G, que es un sustituto del suero fetal bovino (Cipphergen Biosystems Inc, Fremonyd, Calif), 2% L-glutamina (Invitrogen) y 1% penicilina-estreptomina (Invitrogen) cuando los cultivos se llevaban a cabo en tubos Leighton Colcemid
- Tripsina-EDTA 0.25%
- Metanol

- Ácido Acético
- Citrato sódico

En las técnicas de identificación cromosómica se ha utilizado:

- Leishman al 20% en tampón Leishman pH 6,8 (Merck)
- Wright al 25% en tampón Sørensen pH 6,8 (Sigma) (1:4 en Leishman buffer)
- Metanol (Merck) para desteñir los portaobjetos
- Solución de 2xSSC (NaCl 0,3M) (Merck) y Citrato trisódico (0,3M) (Merck)

### **Aparatos**

Estufa de CO<sub>2</sub> (Heraus)

Baños termostáticos (Selecta)

Microscopio óptico Olympus Ax70

Cytovision (Applied Imaging)

## **3.3. Metodología experimental**

### **3.3.1-Técnica de cultivo de líquido amniótico y obtención de preparaciones**

Cada muestra de líquido amniótico es recogida en un tubo estéril con medio RPMI 1640 base suplementado con antibióticos (penicilina 10.000 IU/ml y estreptomicina 10.000 IU/ml). Para la realización del cultivo es necesaria la obtención, en condiciones estériles, de una cantidad entre 10-20ml de líquido amniótico. Se reparte la muestra entre 2 o 3 tubos truncados tipo Leighton (según la cantidad recibida y las semanas de gestación).

Se centrifugan a 800 r.p.m. durante 5 minutos, a temperatura ambiente, con el fin de recuperar en el botón aquellas células fetales viables para cultivarlas. Se añaden 2,5 ml de medio de cultivo al botón.

Se deja el tubo en la estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en posición horizontal sobre la superficie plana y con el tapón a medio cerrar. Durante este proceso de incubación debe llevarse a cabo un control del crecimiento celular con el microscopio invertido. Al 5º día si ya se aprecia suficiente crecimiento celular se procede a cambiar el medio de cultivo. Si no se devuelve el tubo hasta el 7º día en que se cambia el medio.

Para cambiar el medio, se retira el medio viejo por decantación y se reintroducen 2.5 ml de medio fresco con una pipeta estéril sin tocar las paredes. A partir del primer cambio, se sustituye el medio de cultivo 3 veces a la semana y se va observando al microscopio invertido hasta observar un crecimiento celular adecuado (2 colonias grandes o 5 pequeñas)

Se pasa a tripsinizar el cultivo, al menos 2 frascos por muestra. Se vacía el tubo, se añade 1.5 ml de Tripsina -EDTA (0,25%) y se deja 30 segundos plano. Posteriormente, se dan unos golpes secos y fuertes sobre una superficie dura para desprender las células. Luego se añade 1ml de medio fresco para inactivar la tripsina. Se deposita la muestra sobre una o más placa de Petri con 5 ml de medio de cultivo Chang. Se incuba durante 24 h en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, pH 7,3 y con un 100% de humedad.

Llegado el momento óptimo de crecimiento celular se añade a la placa 50 µl de Colcemid a una concentración final de 0,1 ng /ml y se mantiene dentro de la estufa de CO<sub>2</sub> a 37 ° C durante unos 45 minutos. Con la pipeta Pasteur se recoge el líquido y se deposita sobre el cubre de la placa de Petri, en condiciones de esterilidad, evitando que se derrame fuera del cubre.

A partir de aquí el proceso se realiza fuera de la zona estéril, a poder ser en un ambiente cerrado, estable y con la humedad ambiental entre 48 y 52%

Se extrae el medio de cultivo y se añade solución hipotónica, citrato sódico al 1%, gota a gota e incubando a 37° C durante 15 min. Se centrifuga 5 min. a 1000rpm y se decanta. A continuación, se añaden 600µl de fijador Carnoy (metanol:acético 3:1) recién preparado y a -20°C, con la ayuda de una

micropipeta. Pasado este tiempo, tras centrifugar, se vuelve añadir, 20 ml de fijador fresco a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

Finalmente, la suspensión celular fijada se extiende sobre un portaobjetos, previamente desengrasado, en metanol al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. para proceder posteriormente a la tinción cromosómica y análisis.

### **3.3.2. Técnicas de identificación cromosómica**

#### **Tinción Uniforme**

La coloración uniforme fue la primera en utilizarse en citogenética ya que permite la observación de ambas cromátides, posibilita el estudio del número de cromosomas, tamaño, morfología, posición del centrómero y constricciones secundarias de los mismos. Hoy en día, esta técnica ha sido relegada pero sigue siendo extraordinariamente útil para la detección de lesiones (gaps y roturas) tanto de cromosoma como de cromátide.

El procedimiento seguido para obtener las preparaciones con este tipo de tinción ha sido el siguiente. Sobre cada extensión en posición horizontal se añade, aproximadamente 5 ml de solución colorante Leishman (4:1 en tampón Leishman), dejando que actúe durante 5 minutos. Posteriormente, se lava con agua corriente y se deja secar al aire.

La Figura 21 muestra la obtención de una metafase con esta técnica, gracias a la cuál se visualizan rápidamente los gaps y roturas.



**FIGURA 21.** Metafase con tinción uniforme en la que se observan diferentes lesiones cromosómicas (flechas).

### **Tinción secuencial: Uniforme - Bandas G**

Con esta técnica de bandas G, descrita por Gallimore y Richardson (1973), se consigue un patrón de bandas, gracias al cual se pueden caracterizar y diferenciar cada una de las parejas de cromosomas homólogos, permitiendo identificar cada una de las zonas y regiones de los mismos. Con este tipo de tinción se pueden identificar, tanto anomalías cromosómicas numéricas como estructurales así como determinar el punto exacto de rotura implicado en dicha alteración estructural o en lesiones cromosómicas. En el caso de analizar lesiones cromosómicas, el empleo de la técnica de bandas G da una información parcial ya que en muchas ocasiones se enmascara tanto gaps como roturas.

La tinción secuencial permite la caracterización de las lesiones cromosómicas (tinción uniforme) y su localización exacta en el cromosoma (bandas G).

El procedimiento seguido ha consistido en teñir las preparaciones con tinción uniforme (ver apartado anterior). Realizar el análisis al microscopio localizando y fotografiando (o capturando las imágenes) que nos interesaban.

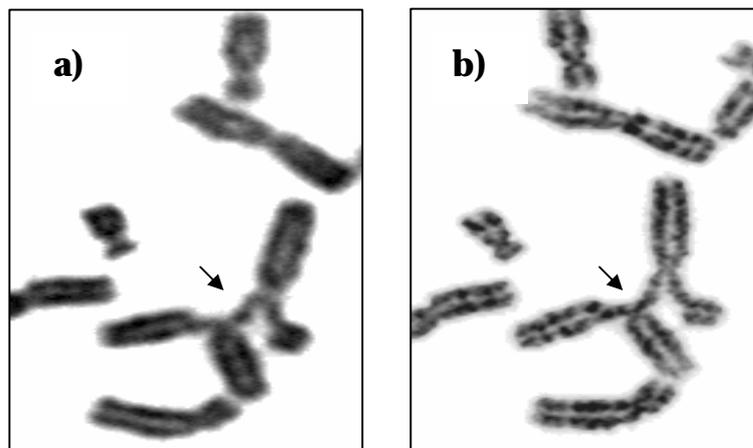
A continuación se procede a desteñir las preparaciones con metanol durante 1 minuto, se lavan con agua del grifo y se dejan secar. Posteriormente se procede al bandeo cromosómico incubando las preparaciones durante 10-30 minutos, e incluso en algunas ocasiones 1 hora, en una solución salina de 2x SSC (cloruro de sodio-citrato de sodio tampón) a 65°C. Se lavan las extensiones con agua corriente e inmediatamente se tiñen con colorante Wright en tampón de Sorensen (en proporción 1:3) durante 1-3 minutos. Los tiempos se establecen en función de las características de la muestra. Se lavan con agua corriente y se secan al aire.

### 3.4- Análisis al microscopio

Las preparaciones se analizan con un microscopio óptico (Olympus BX50) con oculares de 10x y objetivos de 10x y 100x. Se analizan un mínimo de 100 metafases por muestra con tinción uniforme. Se graban todas las metafases con el soporte informático del programa Cytovision (Applied Imaging) y se imprimen. El análisis se realiza primero al microscopio y posteriormente en el papel.

Después de desteñir la preparación, se realizan bandas G (apartado 3.4.2) para localizar el punto exacto en el que se produce la lesión cromosómica detectada con tinción uniforme (Fig. 21).

Para analizar si se han producido alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales se ha realizado el cariotipo de un mínimo de 25 metafases por muestra.



**FIGURA 21.** Metafases parciales obtenidas mediante tinción secuencial uniforme-bandas G en las que se muestra como se puede identificar exactamente el punto de la rotura implicado en una lesión cromosómica: a) tinción uniforme; y b) bandas G.

### **3.5-Análisis estadístico**

#### **3.5.1- Modelo de ecuaciones estimado generalizado (GEE)**

Para ver si existen diferencias en el grado de inestabilidad cromosómica entre los dos grupos estudiados (muestras procedentes de gestantes fumadoras y de no fumadoras) se ha empleado el modelo de ecuaciones estimado generalizado (GEE).

Dicho método estadístico ha sido elegido porque los resultados seguían referencias de modelos lineales generalizados, considerándose como una regresión binomial (Liang y Zeger, 1986) ya que los datos se recogen en las mismas unidades a través de puntos sucesivos en el tiempo, y por tanto estas observaciones repetidas se correlacionan en un cierto plazo. En el modelo GEE se ha empleado el estado REPEATED y el procedimiento GENMOD, con la puntuación conservativa tipo 3 con el fin de observar si existía alguna variabilidad interindividual.

Los análisis de la regresión con la metodología de GEE generalmente se emplea cuando la medida del resultado de interés es discreta en vez de continua, (Ej., binario o recuento de datos, posiblemente de una distribución binomial o de Poisson). En nuestro análisis la función variable para la distribución binomial y la función “logit link” ha sido especificada para este modelo. La respuesta variable ha sido definida como número de anomalías cromosómicas dividido número de metafases analizadas para cada feto

Por último, indicar que se han utilizado dos modelos GEE: uno reducido y otro extendido. En este último se han incluido variables adicionales explicativas y covariables (Ej edad de las gestantes, semanas de gestación, etc.).

### **3.5.2.- Método multinomial para el estudio de Lugares Frágiles (FSM)**

Este programa (FSM, versión 995) permite determinar si un suceso cromosómico, rotura, que se observa un número de veces en una banda cromosómica, es fruto del azar o no (Böhm y col., 1995; Greenbaum y col., 1997). Este programa efectúa de forma automatizada el análisis descrito y puede ser usado como máximo para 30 individuos.

Con el fin de averiguar si existen bandas especialmente afectadas, en ambos grupos, por las roturas cromosómicas (implicadas tanto en lesiones como en alteraciones estructurales) hemos aplicado este modelo estadístico.

Dado que el programa requiere la existencia de al menos 200 roturas por individuo (si se utiliza niveles de resolución de 400 bandas) y que en nuestros dos grupos existían individuos sin ninguna rotura (ver apartado de Resultados; Tablas 8 y 9) este método se ha utilizado como una aproximación. En el presente análisis cada grupo (muestras procedentes de gestantes fumadoras y de no fumadoras) se consideró como un individuo.

El programa "FSM. Exe" se debe ejecutar desde MS-DOS, introduciendo la línea de comandos FSM\*. dat (es el nombre de un fichero de texto con nuestros datos en el que se introduce el individuo y el punto de rotura que se ha encontrado en el cromosoma ), ej :

Paciente 1                      3q13

El programa FSM. Exe lee el fichero de nuestros datos y genera un documento; *out.doc*. El fichero out. doc es un documento de texto en el que se detallan los datos de entrada y los resultados de los cálculos realizados por el programa.

1. El número de bandas consideradas en el análisis.
2. El número de roturas por banda en cada individuo.
3. Media de roturas por banda en cada individuo

4. Distribuciones observada y esperada de las roturas bajo el supuesto de que no exista lugares frágiles.
5. Resultados del test de homogeneidad.
6. Resultados de la aplicación de los métodos estadísticos de la chi cuadrado estandarizada de Morris ( $G^2$ )
7. Los valores críticos (mínimo número de roturas necesario para considerar que una determinada banda cromosómica se rompe con frecuencia superior al azar) de ambos métodos.

Este mismo programa utiliza el test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y el test  $G^2$  para determinar el grado de significancia estadística de las bandas que presentan gaps, roturas o reorganizaciones en cada uno de los dos grupos.

Este programa, ha sido cedido por la Dra. Greenbaum ([IRA@BIO.TAMU.EDU](mailto:IRA@BIO.TAMU.EDU))

### **3.5.3. – Comparación de las bandas más implicadas en cada grupo: Análisis estadístico de las diferencias**

Para identificar aquellas bandas que tienen mayor tendencia a romperse (anomalías estructurales y lesiones cromosómicas) en el grupo de gestantes fumadoras y respecto al de no fumadoras se han generado para cada banda una variable. Dicha variable queda definida para cada banda como el número de roturas observadas en muestras procedentes de gestantes fumadoras menos el número encontradas en el grupo de controles (diferencia)

Variable diferencia = N° de roturas en el grupo de muestras de gestantes fumadoras – N° de roturas en el grupo de gestantes control

Las bandas con valores positivos indican una mayor tendencia a romperse en el grupo de las gestantes fumadoras; mientras que las que presentan valores negativos sugieren un fenómeno opuesto. Aquellas bandas que presentan valores de las diferencias mayores que 3 son consideradas como bandas extremas es decir extraordinariamente afectadas (3 SDs).

Para realizar este análisis se ha utilizado el programa estadístico SAS/STAT versión 8.01 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

Además, para confirmar los resultados obtenidos con este método estadístico se han empleado para las bandas más afectadas el test exacto de Fisher y el test no paramétrico de Wilcoxon Rank Sum.

## ***4.- RESULTADOS***

---

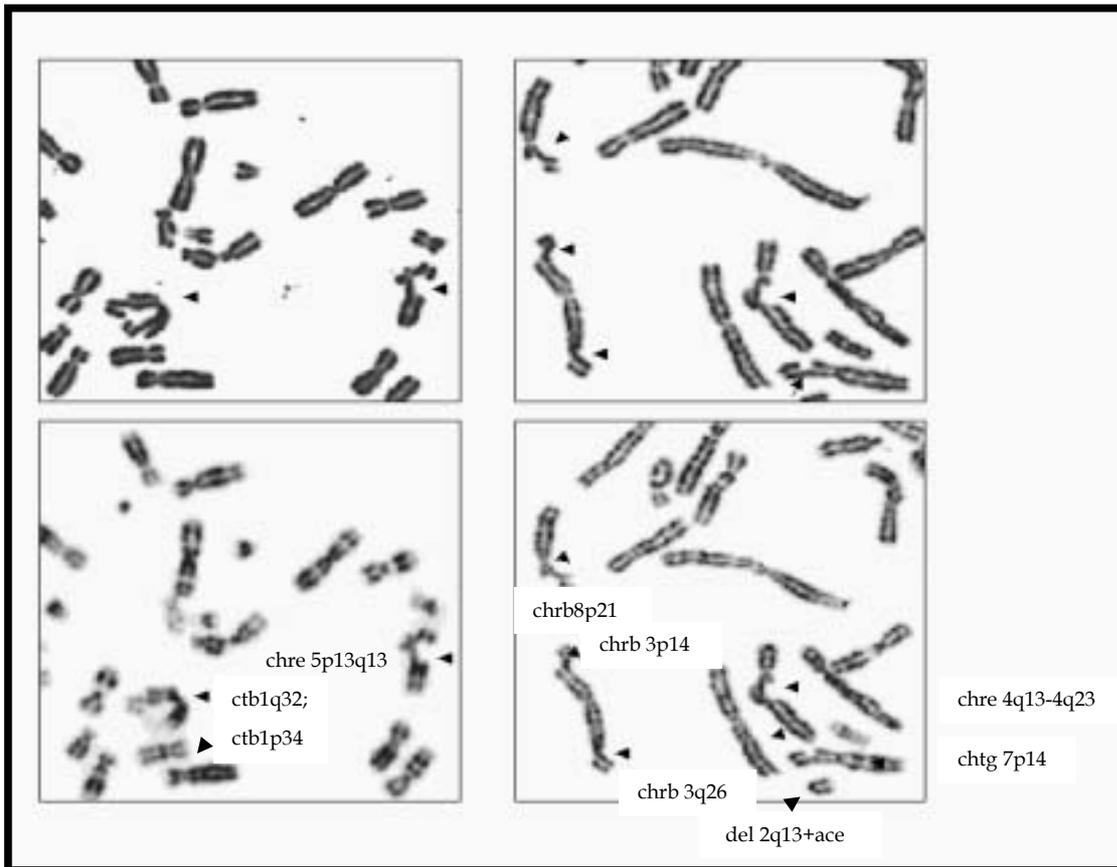
## **4- RESULTADOS**

### **4.1.-Puesta a punto de la técnica Uniforme-Bandas G a partir de extensiones de amniocitos realizadas previamente con fines diagnósticos**

Dado que la finalidad de la obtención de las muestras era el diagnóstico prenatal, el presente estudio se ha realizado a partir de un número limitado de preparaciones cromosómicas. Para la detección de lesiones cromosómicas mediante tinción uniforme sólo se pudieron utilizar las extensiones “sobrantes”. Por otra parte, las preparaciones disponibles para el análisis tenían un estado de conservación no homogéneo. En algunos momentos podían tener más de cuatro a seis meses o bien podían no haberse guardado en nevera. Estos dos aspectos han obligado a la puesta de una metodología de tinción secuencial Uniforme - Bandas G eficaz.

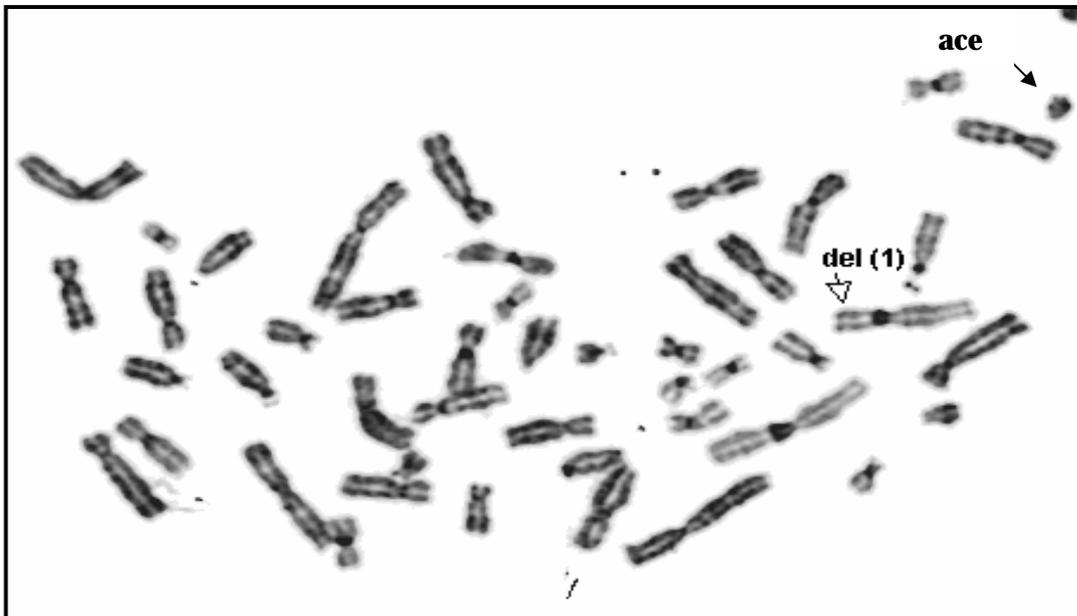
Las modificaciones más relevantes se han realizado para conseguir el bandeado secuencial y consisten en alargar los tiempos de incubación en 2xSSC y en colorante Wright. Las preparaciones una vez desteñidas con metanol se han incubado en solución 2xSSC (cloruro de sodio-citrato de sodio) a 65° C durante 10-30 minutos e incluso 60 minutos según el tiempo de envejecimiento de las preparaciones. Las extensiones frescas o guardadas en neveras se sumergen por un periodo mucho más corto (5-10 minutos). Después de lavar dichas extensiones con agua corriente, se han teñido inmediatamente con colorante Wright en tampón de Sorensen (1:3) durante 3-4 minutos. El tiempo para preparaciones bien conservadas oscila de 1-2 minutos. Una vez lavadas con agua corriente y secadas al aire se procede al análisis de inestabilidad cromosómica.

En la Figura 22 se muestra la utilidad de esta metodología al permitir identificar exactamente los distintos puntos de rotura implicados en aberraciones cromosómicas.

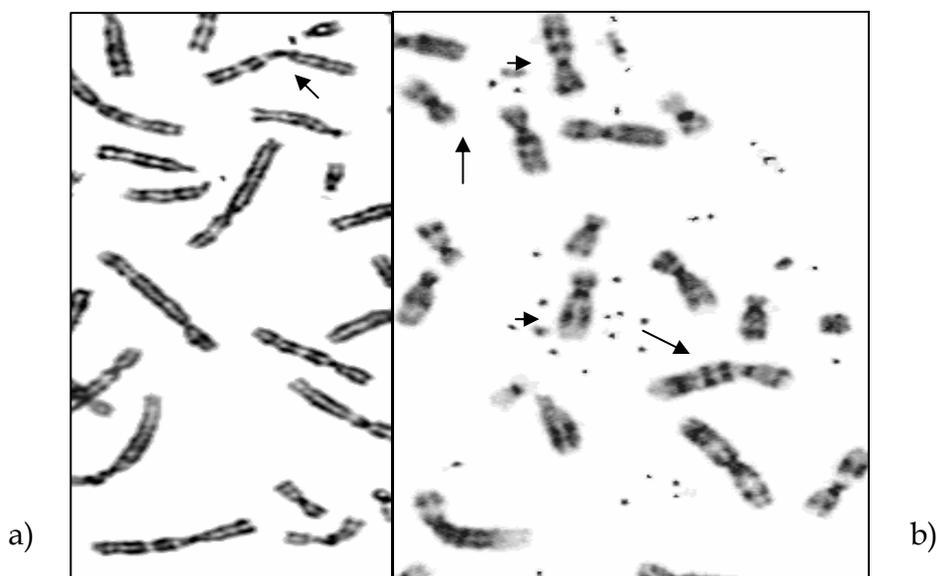


**FIGURA 22.** Metafasas parciales obtenidas mediante tinción secuencial uniforme-bandas G. Mediante la tinción uniforme (imágenes de arriba de la figura) se visualizan rápidamente las lesiones; y mediante la tinción secuencial Bandas G se identifican las bandas implicadas (abajo)

En las figuras 23 y 24 se observan diferentes tipos de alteraciones cromosómicas estructurales detectadas en este estudio mediante bandas G.



**FIGURA 23.** Metafase en la que se observa una  $del(1)(q32)$  y el correspondiente fragmento acéntrico perteneciente al feto F19.



**FIGURA 24.** Metafases parciales en que se observan alteraciones cromosómicas estructurales a) la  $inv (7)(p15.1;q31.2)$  pertenecientes al feto F15 ; y b) la  $t(7:12)(q36;q15)$  perteneciente en el feto F6.

## 4.2.- Resultados citogenéticos

### 4.2.1. Análisis de las metafases aberrantes

Para analizar si existe una inestabilidad cromosómica diferente entre las células del líquido amniótico procedentes de gestantes que fuman y de no fumadoras, se han analizado un mínimo de 100 metafases por feto.

En la Tabla 6 se muestra el número de metafases con lesiones o alteraciones cromosómicas estructurales y el número total de metafases analizado en cada grupo. Observándose diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2=9,668$   $P=0.04$ ) entre ambos grupos (fumadoras: 10.5% (262/2492); controles: 8,0% (210/2637))

La distribución de metafases aberrantes en cada grupo en relación a la edad de la gestante (distinguiendo a su vez si las mujeres han sido tratadas con técnicas de reproducción asistida o no) se muestran en la Figura 27

**TABLA 6. Metafases aberrantes en ambos grupos**

<b>Análisis de las metafases aberrantes</b>			
	Total metafases analizadas	Metafases aberrantes	Frecuencia
Control	2637	210	8%
Fumadoras	2492	262	10.5%
TOTAL	5129	472	9.2%

#### **4.2.2.- Análisis de la inestabilidad cromosómica en amniocitos**

La inestabilidad cromosómica ha sido evaluada por el número de lesiones cromosómicas (roturas y gaps) y de anomalías cromosómicas estructurales.

Para determinar el número y tipo de lesiones cromosómicas se han analizado un mínimo de 100 metafase con tinción uniforme-bandas G en cada feto. Mientras que para analizar el número y tipo de anomalías cromosómicas estructurales se han cariotipado un mínimo de 25 metafases por muestra.

El número total de metafases analizadas, cariotipadas, aberrantes así como el número y tipo de lesiones y alteraciones estructurales observadas en ambos grupos se indica en la Tabla 7 . El porcentaje de lesiones cromosómicas detectadas en ambos grupos muestran diferencias estadísticamente significativas (fumadoras: 15.7% (391/2492) y controles: 10.1%(267/2637)  $P=0.045$ ). La comparación del número de alteraciones cromosómicas estructurales observadas en ambos grupos, muestra una diferencia estadísticamente muy significativas (fumadoras: 12.1% (96/793); controles: 3.5% (26/752) ( $P=0.002$ ). En ambos grupos la alteración más frecuente fueron las deleciones y las translocaciones. Los porcentajes de deleciones (fumadoras: 7.2% (57/793) y controles: 2.5% (19/752) y de translocaciones (fumadoras 2.1% (17/793) y controles 0.5% (4/752) muestran también diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $P=0.006$  y  $P=0.01$  respectivamente).

En ambos grupos hemos encontraron metafases aneuploides (trisomías y monosomías) tanto en el grupo de gestantes fumadoras (12.5%; 99/793) como en el de controles (10.8%; 81/752), sin que se aprecien diferencias estadísticamente significativas.

**TABLA 7. FRECUENCIA Y TIPO DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN FETOS DE MADRES FUMADORAS Y CONTROLES**

	<b>FUMADORAS</b>	<b>CONTROLES</b>
Total de metafases analizadas (tinción uniforme)	2492	2637
Total metafases cariotipadas (bandas G)	793	752
Total metafases con inestabilidad cromosómica *	10.5% (262/2492)	8.0% (210/2637)
Gaps and breaks *	15.7% (391/2492)	10.1% (267/2637)
Gaps	7.3% (183/2492)	5.5% (144/2637)
Breaks	8,3% (208/2492)	4,7% (123/2637)
Anomalías cromosómicas estructurales	12.1% (96/793)	3.5% (26/752)
Deleciones	28	6
Deleciones + fragmentos acéntricos	29	13
Fragmentos acéntricos	7	1
Translocaciones (+2der)	12	2
Translocaciones dicéntricas	5	2
Inversiones	2	0
Duplicaciones	1	0
Marcadores	11	2
Reorganizaciones intracromosómicas	1	0
Anomalías cromosómicas numéricas	99	81
Trisomías	6	2
Monosomías	93	79

Los resultados citogenéticos de cada feto se muestran en las Tablas 8 y 9. En todos ellos el cariotipo constitucional ha sido normal (46, XX o 46, XY). En un solo caso, F16, se detectó un pseudomosaicismo (46, XY, 83% /46,XY, t(X; 1)(p22.2; q25) 17%), aunque no se confirmó después del nacimiento.

**TABLA 8:** Resultados citogenéticos de los fetos procedentes de las madres control**TABLA 8: RESULTADOS CITOGENÉTICOS OBTENIDOS EN AMNIOCITOS DE FETOS DE MADRES CONTROL**

Controles	Cariotipo del Feto	% metafases aberrantes	% de células con gaps y breaks *	Trirradiales y cuadrirradiales	% anomalías estructurales	Tipo de anomalía estructural
C1	46,XX	5.3%(5/95)	5.3% (5/95)	--	0% (0/28)	--
C2	46,XX	7%(7/100)	7% (7/100)	--	7.4% (2/27)	del(1)(q11.2)+ace,del(12)(q11)+ace
C3	46, XY	3.3%(3/91)	4.4% (4/91)	--	0% (0/27)	--
C4	46,XY	7.8%(8/102)	5.9% (6/102)	--	6.5% (2/31)	del(11)(q11), tdc(5;10) (q23;q21)+ace(10)(q21-qter)
C5	46, XY	5.6%(5/90)	7.8% (7/90)	--	0% (0/27)	--
C6	46,XX	5.1%(5/98)	6.1% (6/98)	--	3.1% (1/32)	del(7)(p21)+ace
C7	46,XX	8.5%(8/94)	13.8% (13/94)	--	3.4% (1/29)	t(1;7)(p22 ;p15)
C8	46XY	9.5%(9/95)	23.2% (22/95)	--	4.2% (1/24)	t(7;11)(q31;q24)
C9	46, XX	6.5%(6/92)	10.9% (10/92)	--	3.8% (1/26)	del(11)(p11.1)+ace
C10	46, XX	17.4%(16/92)	29.3% (27/92)	--	6.8% (2/29)	del(3)(p14)+ace,del (11)(q14)+ace
C11	46, XY	8%(8/100)	16% (16/100)	--	0% (0/30)	--
C12	46, XX	5.7%(7/123)	4.9% (6/123)	--	3% (1/33)	del(10)(q22)
C13	46, XY	10.9%(12/110)	14.5% (16/110)	--	6.5% (2/31)	del(15)(q15)+ace,del(5)( p15.1)
C14	46, XX	7.5%(8/107)	6.5% (7/107)	--	3.6% (1/28)	del(9)(q21)
C15	46, XX	11.1%(13/117)	15.4% (18/117)	--	2.6% (1/39)	del(7)(p14)
C16	46, XY	11.2%(12/107)	12.1% (13/107)	--	3% (1/33)	t(X;1) (p22.2;q25)
C17	46, XX	6.6%(8/122)	6.6% (8/122)	--	5.9% (2/34)	der(14)t(14;17)(q32;q21),ace
C18	46, XX	4.5%(5/110)	3.6% (4/110)	--	3.4% (1/29)	del(11)(p12)
C19	46, XX	7.4%(9/121)	10.7% (13/121)	--	0% (0/27)	--
C20	46, XY	5.4%(6/112)	7.1% (8/112)	--	0% (0/27)	--
C21	46, XX	10.1%(12/119)	10.1% (12/119)	--	2.9% (1/34)	mar
C22	46, XX	8.3%(9/109)	8.3% (9/109)	--	0% (0/27)	--
C23	46, XX	2.8%(3/106)	1.9% (2/106)	--	4% (1/25)	del(10)(p11.1)+ace
C24	46, XY	14.3%(15/105)	13.3% (14/105)	qr (4; 15) (q12; q15)	13.9% (5/36)	del(5)(q11.2)+ace,del(5)(q11.2)+ace, del(12)(q11)+ace,del(6)(q23)+ace, del(17)(q22)+ace
C25	46, XY	9.2%(11/120)	11.7% (14/120)	--	0% (0/39)	--

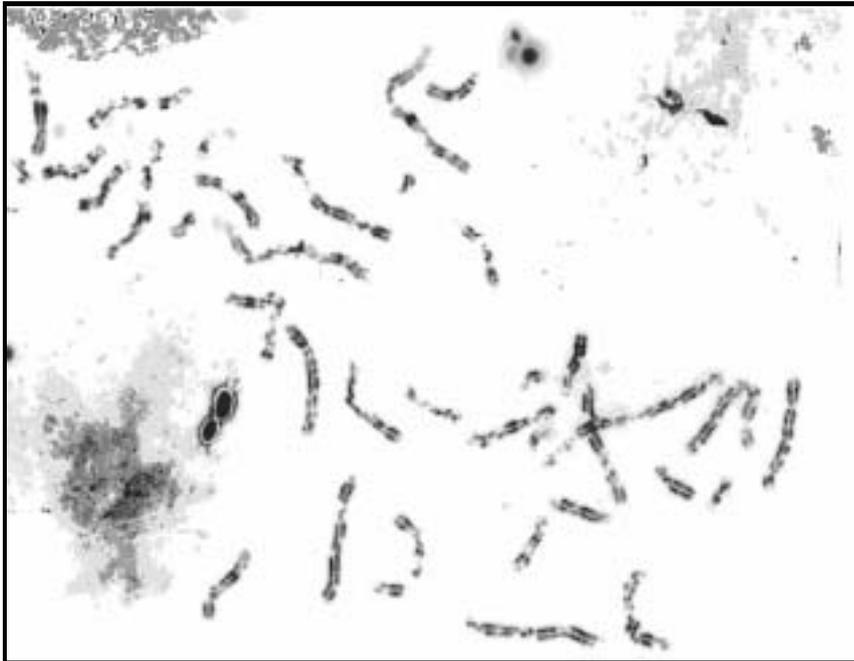
**TABLA 9:** Resultados citogenéticos de los fetos procedentes de las madres fumadoras

<b>Tabla 9 :RESULTADOS CITOGENÉTICOS OBTENIDOS EN AMNIOCITOS DE FETOS DE MADRES FUMADORAS</b>						
<b>Fumadoras</b>	<b>Cariotipo del Feto</b>	<b>%metafases aberrantes</b>	<b>% de células con gaps y breaks*</b>	<b>Trirradiales y cuadrirradiales</b>	<b>% anomalías estructurales</b>	<b>Tipo de anomalías estructurales</b>
F1	46,XY	8.7%(9/103)	7.8% (8/103)		7% (3/43)	del (2)(q24); del(2)(q24.3);del (11)(q13)+ace
F2	46,XY	7.4%(8/108)	11.1% (12/108)	tr(1;2)(q12;p16) qr(2;13)(p23;q13) qr(1;19)(q24;q13.1) tr(11;18)(q23;q11.2)	4.2% (2/48)	del (5)(q31)+ace, der(1)(p32,q22)
F3	46,XX	8%(8/100)	7% (7/100)		20.9% (9/43)	t(X;6)(p11.3;q16), del(5)(5q15)+ace, del(6)(q13)+ace,del(1)(q12)+ace,del(2)(p13) +ace,del(5)(q31),del(11)(q21)+ace,del(12)(q15) ,del(5)(q14)
F4	46,XY	5.3%(5/94)	3.2% (3/94)		7.7% (2/26)	del(3)(p14)+ ace ,del(14)(q21)+ace
F5	46,XX	15.5%(13/84)	47.6% (40/84)	tr(7;13)(q21,q13)	17.9% (5/28)	del(1)(q24)+ace,del (7)(q21),t(5;17)(q22;q25),19q+
F6	46,XX	6%(6/100)	4% (4/100)		47.1% (8/17)	del(2)(p23;q23)del(5)(q22),+ ace, del(4)(q28),t(1;6)(p34;q36)+t(7;12)(q36;q15), del(1)(p34),del(12)(q15)+ace+ace+ace
F7	46,XY	8.3%(7/84)	16.7% (14/84)		2.6% (1/39)	del(1)(q42)+ace
F8	46,XX	8.2%(9/110)	16.4% (18/110)		25% (6/24)	del (6)(p21.3-q16) +ace,ace (6)(q16q24) ace(6q24-qter), del(13)(q21) + ace,del(14)(q22), del(7q11.1)+ ace
F9	46,XY	21%(13/62)	29% (18/62)	tr(5;7)(q13;p22)	5% (1/20)	del (12)(q24.1)+ace
F10	46,XX	10%(10/100)	17% (17/100)	tr(1;2)(p36;q32)+ 2ace, cx(2;6;7) (p16;p21;q21)	7.7% (2/26)	del(16)(q12.1); t(7;16)(p15;p12)
F11	46,XX	22.2%(24/108)	41.7% (45/108)	tr(1;2)( ?;q ?) tr(13 ;18)(q12;q11.2) tr(2;17)(p12;q23)	12.1% (4/33)	del(7)(q21)+ace,del(8)(q11.1)+ace , t dic(7;10)(q34;q23),del(3)(q21)+ace
F12	46,XY	5.1%(5/99)	4% (4/99)		15.6% (5/32)	t(10;12)(q23;p13),tdic(6;10)(q24;p12), del(15)(q15),del(17)(q23)+ace, tdic(?)

## Resultados

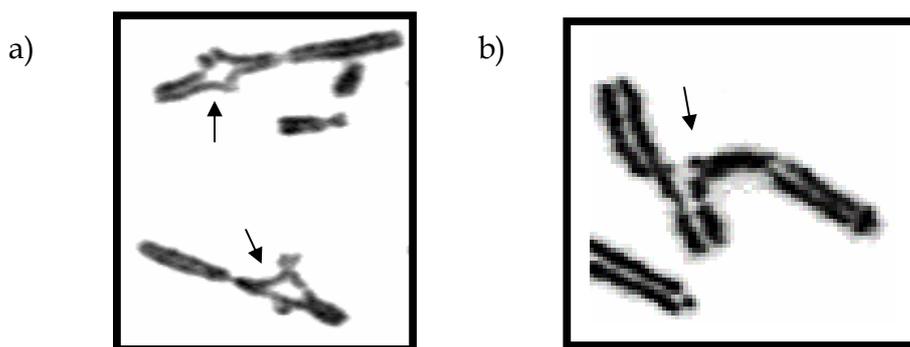
F13	46,XY	18.3%(21/115)	34.8% (40/115)	tr(17;19)(q25;p13.2)	35.2% (19/54)	del(2)(p22)+ace, del(2)(q33)+ace, del(3)(p14)+ace, del(3)(p21)+ace+ace, mar, mar, del(7)(p13), del(7)(p11.2)+ace, del(7)(q11.2), del(9)(q22), del(9)(q31)+ace, del(10)(q11.2)+ace, t(?;16)(?; p12), der(4)(4;17)(p11;p11.1), der(17)(4;17)(q11.1, q11.1 +ace, del(17)(p12),+mar,+mar,+mar, ace(17)(q21qter), mar,mar,mar,del(3)(p14)+ace, del(7)(p11.2),del(10)(q11.2)+ace, del(2)(p22)+ace,del(17)(p12)+ace, del(10)(q11.2)+ace,del(9)(q31)+ace, del(2)p22+ace,del(2)(q33)+ace, del(17)(p12)
F14	46,XY	6.9%(7/102)	3.9% (4/102)		8.3% (3/36)	del(3)(p11),del(11)(p13),del(18)(p11.3)
F15	46,XY	16.1%(18/112)	20.5% (23/112)	tr(12;17)(q13;q21)	19.2% (5/26)	del(18)(p11.2), del(18)(q21.3)+mar, inv(7)(p15.1;q31.2), inv(7)(p15.1;q31.2),del(18)(q21.3)+mar
F16	46,XX	9.4%(10/106)	34% (36/106)		2.6% (1/39)	47,XX,+mar
F17	46,XX	7.1%(7/99)	4% (4/99)		13.9% (5/36)	del(5)(p11.1),del(6)(q14), ace(15q22-qter),+mar, tdic(9;9)(q22;q32)
F18	46,XX	11.4%(14/123)	13% (16/123)		0% (0/30)	--
F19	46,XY	12.8%(14/109)	16.5% (18/109)	tr(?)	19.4% (6/31)	del(1)(q32)+ace,del(10)(q24)+ace,mar,mar,ace,tdic(3;?)
F20	46,XY	15.4%(10/65)	16.9% (11/65)	tr(13;2)(q21;?)	7.7% (2/26)	del(11)(q13.19) + mar
F21	46,XY	7.3%(8/109)	11% (12/109)		0% (0/29)	--
F22	46,XY	15%(18/120)	13.3% (16/120)		12.1% (4/33)	del(4)(p15.2),del(6)(q21),del(21)(q21),t(1;11)(p36;q11.1)
F23	46,XY	7%(7/100)	10% (10/100)		0% (0/28)	--
F24	46,XY	3.1%(3/97)	3.1% (3/97)		0% (0/26)	--
F25	46,XY	9.6%(8/83)	9.6% (8/83)		15% (3/20)	del(20)(p11.2)+ace,der(17p+),+ace

En el grupo de fetos procedentes de gestantes fumadoras se han encontrado dos casos (F9 y F11) que presentaban metafases con múltiples lesiones cromosómicas o células totalmente pulverizadas (Figura 25). Es de destacar que estas metafases no han sido incluidas en la estimación del número de lesiones.



**FIGURA 25.** Metafase con múltiples roturas perteneciente al feto F9

En nuestro estudio se han observado trirradiales o cuadrirradiales en 9 fetos procedentes de gestantes fumadoras (F2, F5, F9, F10, F11, F12, F15, F19 y F20) lo que representa un 36%, (9/25) (Fig. 26); mientras que solo en un caso (C24) de las controles se ha encontrado un cuadrirradial



**FIGURA 26.** Metafases parciales pertenecientes fetos de gestantes fumadoras. a) mostrando cuadrirradiales (feto F2); y b) un trirradial de tipo II (feto F9)(Egozcue y Forteza ,1969).

### **4.2.3- Análisis de los resultados citogenéticos obtenidos en relación a las características de las muestras**

Hemos analizado los resultados citogenéticos obtenidos con las distintas características de las muestras descritas en la Tablas 4 y 5 de material y métodos.

En primer lugar hemos procedido a comprobar si las diferencias en el grado de inestabilidad cromosómica podían ser atribuidas al **sexo** de feto ya que el sexo predominante era distinto en los dos grupos (fumadoras: 9 casos 46, XX y 16 casos 46, XY; controles: 15 casos XX y 10 casos XY). El análisis estadístico ha revelado que no existen diferencias significativas ( $P=0.09$ )

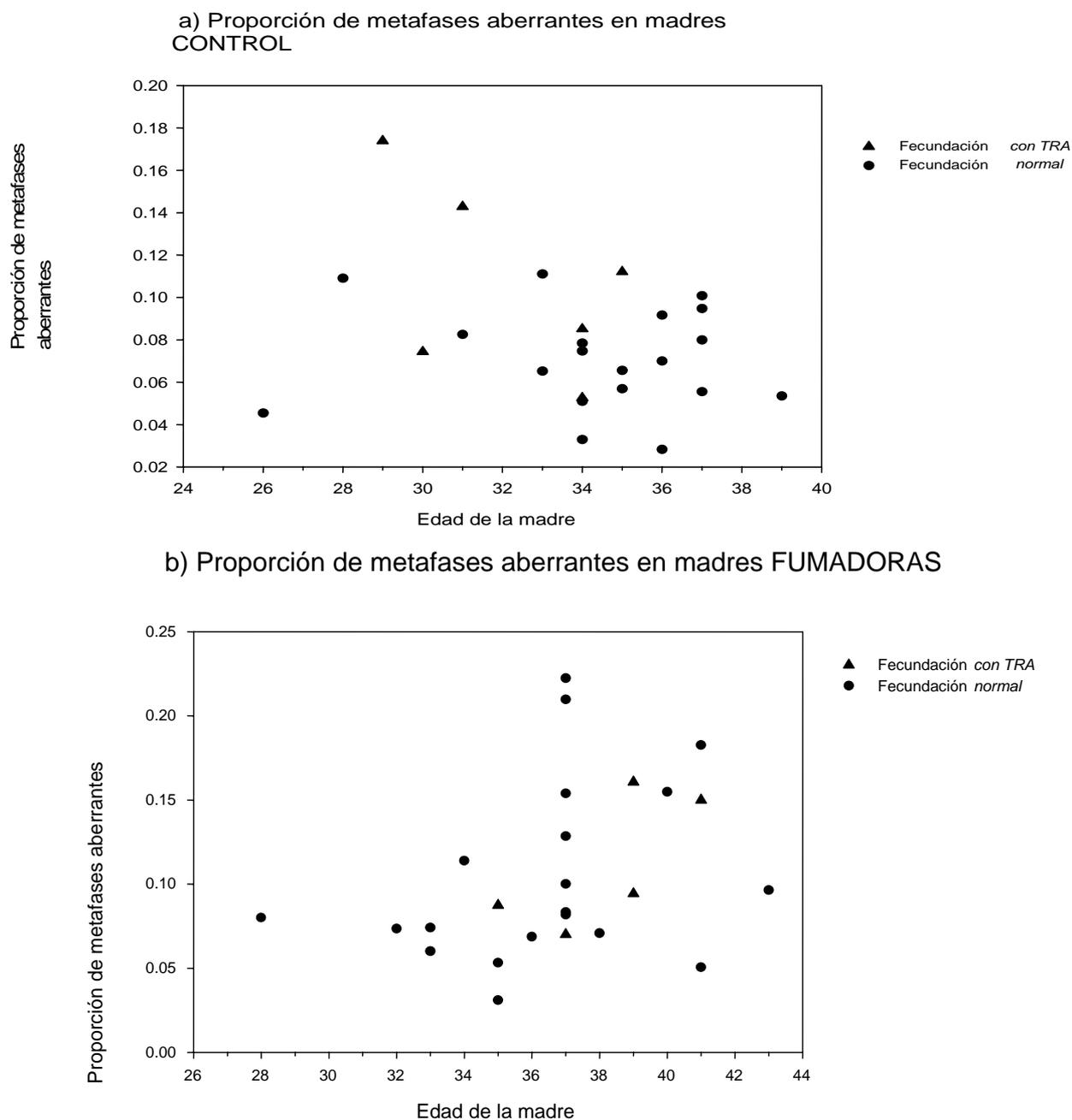
Tampoco hemos encontrado diferencias en relación a las **semanas de gestación** en el grupo control y el grupo de fumadoras.

Al observar las características de las muestras detectamos que la media de **edad de las gestantes** era más elevada en el grupo de las mujeres fumadoras (tres años de edad). Para analizar si la edad podía influir en los resultados obtenidos se han excluido del análisis GEE los fetos de mujeres con edad avanzada (modelo reducido). No se ha observado ninguna diferencia significativa debida a la edad en ninguno de los datos comparados la inestabilidad cromosómica ( $P=0.40$ ), y las lesiones cromosómicas ( $P=0.16$ ), las anomalías cromosómicas estructurales ( $P=0.64$ ), las deleciones ( $P=0.40$ ), ni las translocaciones ( $P=0.10$ ). Los valores de obtenidos de P tan elevados evidencian que el factor de la edad materna no influye y sugiere que este parámetro se podría descartar del modelo. Sin embargo, si en el modelo GEE se incluía la edad gestacional como covariable (modelo extendido) el valor de P para las metafases con inestabilidad cromosómica paso a ser significativo ( $P=0.05$ ) y para lesiones cromosómicas el valor estaba próximo a la marginalidad ( $P=0.045$ ). Sin embargo, para las anomalías cromosómicas estructurales el valor de P seguía siendo marcadamente significativo ( $P=0.01$ ) igual que en el modelo

reducido. Estos resultados muestran que efectivamente las diferencias detectadas no son debidas a la edad de las gestantes sino al hábito de fumar.

Finalmente, cinco fetos del grupo de gestantes fumadoras (F1, F15; F16, F22, F23) y seis del grupo control (C1, C7, C10, C16, C19, C24) se obtuvieron mediante **técnicas de reproducción asistida** (TRA). Para descartar un posible efecto del tratamiento hormonal en la evaluación del efecto genotóxico del tabaco, repetimos los análisis estadísticos excluyendo estos individuos, es decir utilizando un modelo GEE reducido. En este caso, tampoco se ha observado ninguna diferencia debida al tratamiento hormonal, previo a las técnicas de reproducción asistida, en ninguno de los parámetros analizados ya que los valores de P fueron elevados. Para la inestabilidad cromosómica se ha obtenido un valor de  $P=0.3$ , para las lesiones cromosómicas un valor marginal ( $P=0.08$ ) y para las anomalías estructurales un valor significativo ( $P=0.01$ ). Para seguir el mismo criterio que en el análisis del efecto de la edad materna, también en este caso, se procedió al análisis incluyendo los casos tratados con técnicas de reproducción asistida (modelo GEE extendido). En este caso todos los valores de P fueron significativos: inestabilidad cromosómica ( $P=0.02$ ), lesiones cromosómicas ( $P=0.05$ ), anomalías cromosómicas estructurales ( $P=0.002$ ). Estos resultados muestran que efectivamente las diferencias detectadas no son debidas al tratamiento hormonal en las gestantes sometidas a TRA sino al consumo de tabaco.

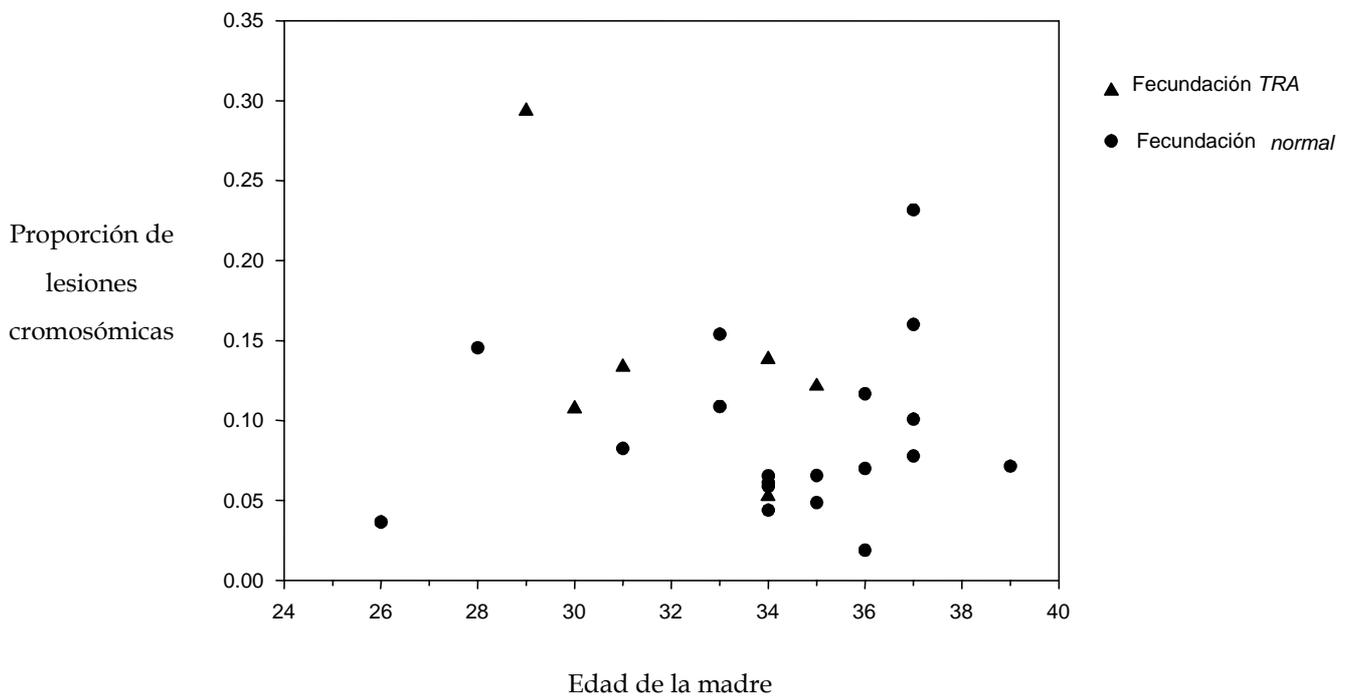
La distribución de metafases con inestabilidad cromosómicas en cada grupo en relación a la edad de la gestante (distinguiendo a su vez si las mujeres han sido tratadas con técnicas de reproducción asistida o no) se muestran en la Figura 27.



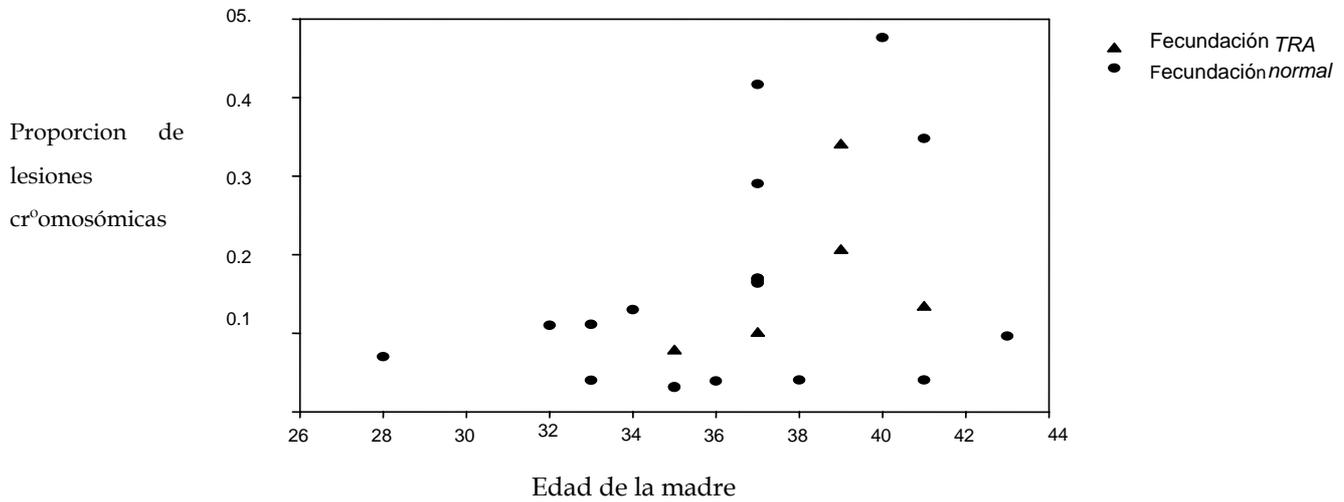
**FIGURA 27.** Proporción de metafases aberrantes encontradas en fetos de: a) madres control y b) en madres gestantes fumadoras en relación con la edad de la madre. En ambos gráficos se indican las madres tratadas con técnicas de reproducción asistida (TRA) y no tratadas.

La distribución de lesiones cromosómicas en cada grupo en relación a la edad de la gestante (distinguiendo a su vez si las mujeres han sido tratadas con técnicas de reproducción asistida o no) se muestran en la Figura 28 y la de anomalías estructurales en la Figura 29.

a) Proporción de lesiones cromosómicas en madres CONTROL

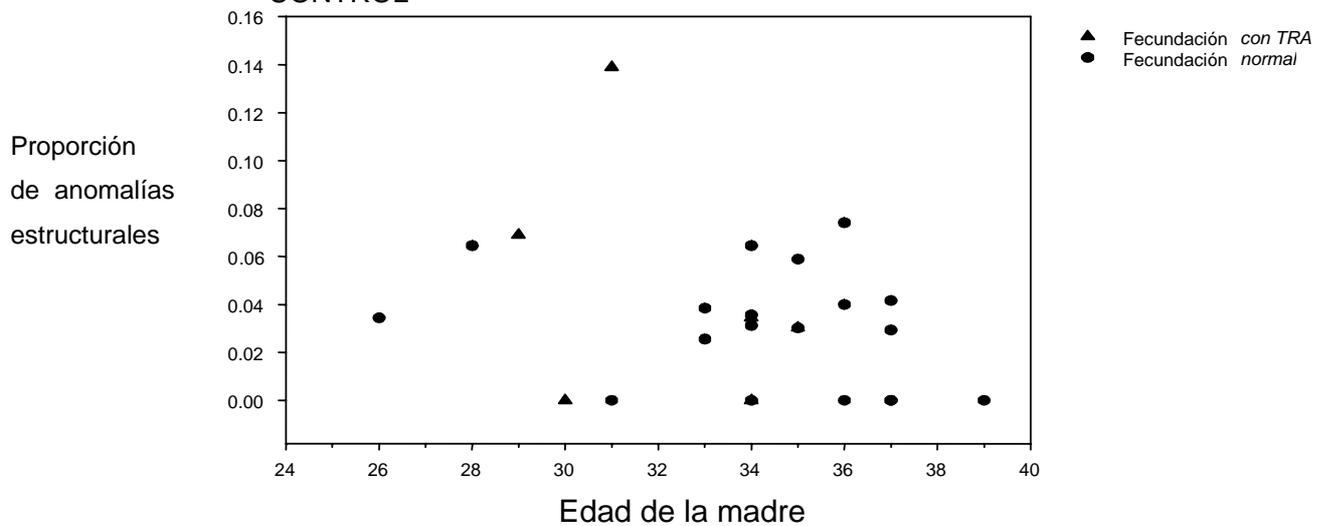


b) Proporción de lesiones cromosómicas en madres FUMADORAS

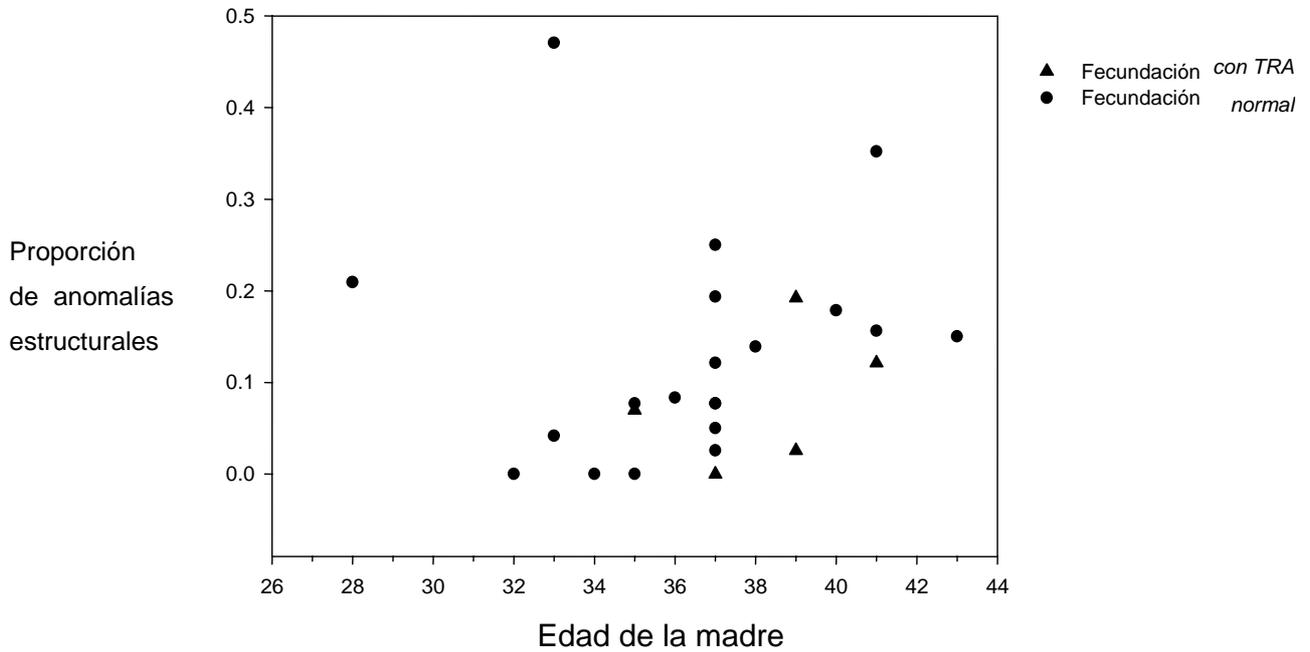


**FIGURA 28.** Proporción de lesiones cromosómicas en fetos: a) de madres control y b) madres fumadoras en función de la edad. En ambos gráficos se indican las madres tratadas con técnicas de reproducción asistida (TRA) y no tratadas.

a) Proporción de anomalías estructurales en madres CONTROL



b) Proporción de anomalías estructurales en madres FUMADORAS



**FIGURA 29.** Proporción de anomalías cromosómicas estructurales en fetos: a) de madres control y b) madres fumadoras en función de la edad. En ambos gráficos se indican las madres tratadas con técnicas de reproducción asistida (TRA) y no tratadas.

#### 4.2.4 –Frecuencia de roturas cromosómicas por banda

El total se han analizado 2637 metafases en el grupo control y 2492 en el grupo gestantes fumadoras. Si consideramos que hemos utilizado un nivel de resolución de 400 bandas por genoma haploide; el total de bandas cromosómicas analizadas ha sido de 1054800 (2637x400) para controles y de 996800 (2492x400) para fumadoras. El número de bandas afectadas por roturas en el grupo control ha sido de 259 y en el grupo fumadoras de 430 (Tabla 10)

**TABLA 10.** Distribución de frecuencias de las roturas por banda según pertenezcan a control o fumadoras

<b>Análisis de las roturas de las bandas</b>			
	Total bandas	bandas rotas	Frecuencia
Control	1054800	259	0.025%
Fumadoras	996800	430	0.043%

La “probabilidad” de rotura de una banda en el **grupo de gestantes control** es  $2.5 \times 10^{-4}$  (259/1054800). Si lo expresamos en porcentaje es de 0.025%; es decir, en el grupo control un 0.025% de las bandas se rompen. Si lo expresamos como un porcentaje respecto al total de las metafases analizadas nos da un porcentaje del 9.82% (259 bandas rotas/2637 metafases x100 metafases). Es decir, tenemos 9.8 bandas rotas (aproximadamente 10) por cada 100 metafases.

La “probabilidad” de rotura de una banda en el **grupo de fumadoras** es  $4.3 \times 10^{-4}$  (430/996800). Si lo expresamos en porcentajes es de 0.043%; es decir, en

el grupo de fumadoras se rompen un 0.043% de las bandas. Si lo expresamos como un porcentaje respecto al total de metafases analizadas, nos da un porcentaje del 17.25%. (430 bandas rotas/2492 metafases x100 metafases). Es decir, tenemos 17.25 bandas rotas (aproximadamente 17) por cada 100 metafases.

#### **4.2.5 -Bandas cromosómicas preferentemente afectadas**

Con el empleo de la técnica de tinción secuencial Uniforme-Bandas G se ha podido localizar de forma precisa diferentes puntos de rotura implicados en lesiones cromosómicas y alteraciones estructurales. En total se han identificado 430 puntos de rotura en el grupo de fetos procedentes de gestantes fumadoras y 250 del grupo control.

La distribución de los puntos de rotura, identificados en ambos grupos, no ha sido al azar (Figura 30). Con excepción del cromosoma 22 en el grupo de fumadoras y de los cromosomas 21, 22 e Y en el grupo control, todos los demás cromosomas estaban implicados en lesiones cromosómicas o alteraciones estructurales.



**FIGURA 30.** Distribución de las roturas (implicadas en lesiones o alteraciones cromosómicas estructurales) en un idiograma del cariotipo humano haploide. A la derecha del idiograma se indican las roturas detectadas en fetos de gestantes fumadoras y a la izquierda las de controles.

Para identificar las bandas cromosómicas más significativamente afectadas por los puntos de rotura en los dos grupos se ha utilizado el programa FSM. Este programa determinó que el número de roturas necesario para considerar que una banda no está afectada por azar en ambos grupos era de cuatro o más.

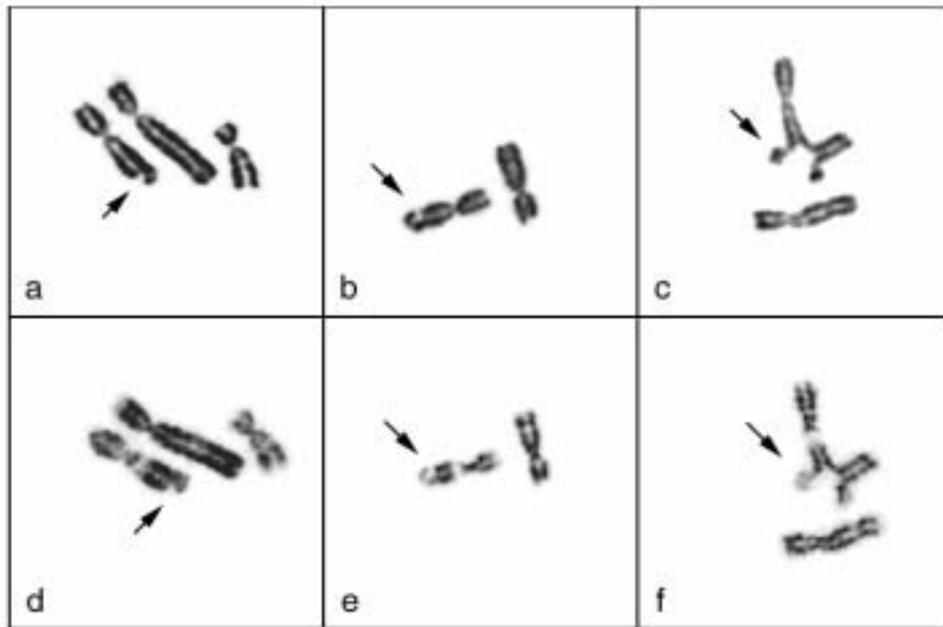
Los resultados indican que en el grupo control existen 12 bandas más afectadas, es decir donde preferentemente se localizan las roturas, y sin que este hecho se deba al azar. Estas bandas cromosómicas son:

- Cuatro veces cada una: 2q35, 7p15, 10q22, 11q13 y 14q24
- Cinco veces cada una: 1p34, 1p22, 4q31, 6q21 y 12q13
- Seis veces cada una: 1q32 y 17q21

Los resultados en el grupo de fetos procedentes de gestantes fumadoras mostraron un total de 30 bandas especialmente afectadas. Entre ellas se encuentran:

- Cuatro veces cada una : 1p34, 1q42, 2p13, 2p16, 2p23, 2q21, 3q21, 5q15, 6q22, 7p15, 15q24, 16q22, 16q23 y 17q23
- Cinco veces cada una: 1q23, 2p21, 4q31, 6p21, 11q13 y 12q15.
- Seis veces cada una: 1p36, 1q11.2, 1q32, 3p14, 7q11.2, 7q32 y 9q22.
- Nueve veces: 11q23
- Diez veces: 5q31
- Trece veces: 17q21

Es interesante destacar que la banda 11q23 sólo se presentó afectada por roturas en fetos de gestantes fumadoras (Fig. 31).



**FIGURA 31.** Metafasas parciales mostrando lesiones cromosómicas en 11q23 procedente de los fetos F19 (a,d), F5 (b,e) y F2 (c,f) respectivamente.

#### **4.2.6. Relación entre las bandas cromosómicas preferentemente afectadas y bandas donde se localizan lugares frágiles**

Para determinar si existe una posible asociación entre los puntos de rotura encontrados (con un nivel de resolución de 400 bandas) y las bandas que contienen lugares frágiles (de acuerdo con el Human Gene Mapping 11) se ha utilizado el test de la t-Student. Los resultados obtenidos al aplicar dicho test han mostrado la existencia de una localización preferente de puntos de rotura

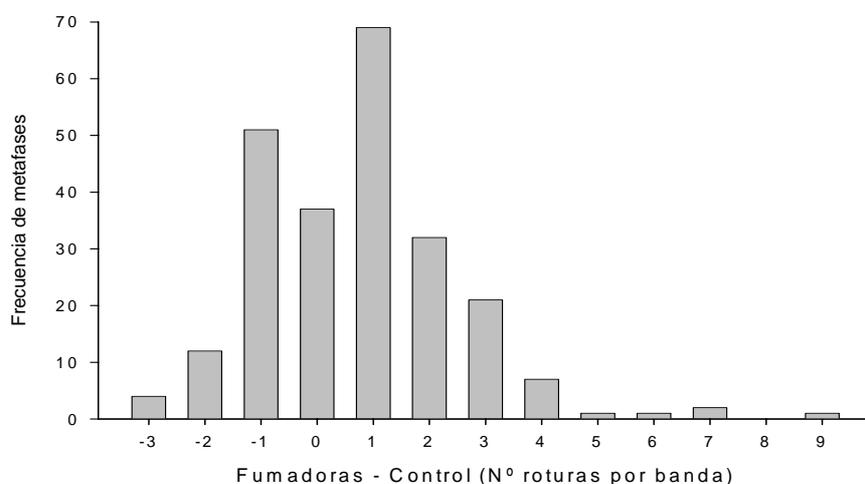
en las bandas que contienen lugares frágiles tanto en fumadoras como en el grupo control con una  $P=0.0004$  y una  $P=0.0019$  respectivamente.

#### **4.2.7. Regiones cromosómicas especialmente afectadas por el efecto genotóxico del tabaco**

Para identificar las bandas con mayor propensión a romperse en el grupo de fetos de gestantes fumadoras respecto al grupo control se ha utilizado el análisis estadístico de las diferencias (apartado 3.5.3).

Para ello se ha generado una variable para cada banda (**variable** =  $N^{\circ}$  de roturas en fumadoras -  $N^{\circ}$  de roturas en control), calculando su valor para cada una de las bandas que presentaban al menos una rotura en el grupo control o en el de fumadoras. En total hemos detectado un total de 238 bandas afectadas entre ambos grupos.

La Figura 32 muestra la distribución de valores de la variable. Se observa que el centro de la distribución de la variable está desplazado hacia valores positivos (la media es 0.72 y la mediana y la moda son ambas 1). Además, la media de la variable es estadísticamente diferente de 0 (usando tanto una t-Student como un test no paramétrico). El valor más negativo es -3. La frecuencia del valor +3 (21 bandas) es aproximadamente 5 veces mayor que la frecuencia del valor -3 (4 bandas). El valor más positivo es 9.



**FIGURA 32.** Distribución de frecuencias de la variable

Para identificar aquellas bandas que presentan valores extremos de la variable (tanto positivos como negativos), tomamos un valor de 3 desviaciones estándar respecto de la media como distancia clasificatoria. Agrupamos a las bandas en 3 grupos:

- 1, si la variable está más de 3 unidades de desviación estándar a la derecha de la media (bandas que se rompen mucho más en fumadoras que en control)
- -1, si la variable está más de 3 unidades de desviación estándar a la izquierda de la media (bandas que se rompen mucho más en control que en fumadoras) y
- 0, si la variable está dentro del intervalo comprendido entre 3 unidades de desviación estándar a la derecha y a la izquierda de la media (bandas que se rompen por igual en un grupo que en otro).

Aplicando este criterio, no hemos observado ninguna banda con valor -1. Sin embargo, hemos detectado tres bandas con valor +1. Estas bandas han sido: **11q23** (variable=9, intervalo de 9 en el grupo de fumadoras y de 0 en el grupo

control), **17q21** (variable=7, intervalo de 13 en el grupo de fumadoras y de 6 en el grupo control) y **5q31** (variable=7, intervalo de 10 en fumadoras y de 3 en controles). En la Tabla 11 se detallan las roturas o gaps producidas en ambos grupos.

**TABLA 11.** Expresión de los roturas (implicadas en lesiones o alteraciones estructurales) localizadas en las bandas cromosómicas 5q31, 11q23, 17q21 en ambos grupos.

<b>BANDA</b>	<b>FUMADORAS</b>	<b>CONTROLES</b>
5q31	F2(1), F3(1), F5(1), F8(1), F11(2), F13(2), F16(1), F19(1)	C9(1), C16(1), C19 (1)
<b>11q23</b>	F2(3), F5(1), F14(1), F15(2), F19(1), F22(1)	
17q21	F3(1), F5(1), F13(2), F15(1), F17(1), F18(2), F19(1), F21(2), F22(1), F25(1)	C8(2), C10(1), C15(1), C23(1), C25(1)

Para cada una de estas tres bandas hemos analizamos, con el test exacto de Fisher, si la diferencia entre las frecuencias de roturas en control y en fumadoras era estadísticamente significativa. Sólo la banda **11q23** ha mostrado dicha significación estadística (P bilateral=0.0162) ya que de un total de 430 roturas en el grupo de gestantes fumadoras, 9 se localizaron en dicha banda mientras que ninguna rotura de las 259 detectadas en el grupo control se localizó en dicha banda.

## *5.- DISCUSIÓN*

---

---

## **5.-DISCUSIÓN**

### **5.1.- Características de la serie analizada**

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar si existe, o no, un efecto genotóxico del tabaco en fetos de gestantes fumadoras. Para ello, decidimos escoger dos grupos muy diferenciados: gestantes muy fumadoras que continuaran haciéndolo durante el embarazo y gestantes no fumadoras y que no hubiesen estado (ni estuviesen) expuestas al humo del tabaco. Se descartaron, por tanto, las gestantes fumadoras pasivas. Estos criterios han reducido considerablemente el número de casos en los que poder analizar la inestabilidad cromosómica. La mayor dificultad de este trabajo ha sido encontrar gestantes que hubiesen fumado más de 10 cigarrillos al día (independientemente del tipo: light, con filtro,...), al menos en los últimos 10 años, y que continuaran fumando durante el embarazo. Sin embargo, también ha costado encontrar mujeres no expuestas al humo del tabaco en casa ni en el trabajo (control).

Diferentes publicaciones realizadas hasta el momento parecían sugerir que el consumo de tabaco, combinado con el de café, té o alcohol podía tener un efecto distinto sobre el retraso de crecimiento fetal (Peacock y col., 1991; Infante-Rivard y col., 1993; Wang y col., 2002) o la expresión de fragilidad cromosómica (Chen y col., 1989). Con el fin de reducir al máximo el número de variables que podían influir en nuestros resultados introdujimos un nuevo requisito en la selección de muestras: todas estas mujeres (fumadoras y controles) no debían estar expuestas a otros agentes clastogénicos, ni consumir alcohol, té o café.

En total se han necesitado 800 entrevistas para seleccionar las 25 gestantes fumadoras y los 25 controles. De estas encuestas se desprende que aproximadamente un 20% (62/309) de las mujeres que habitualmente fuman dejan de hacerlo al decidir quedarse embarazada o al saber que lo están. Los datos publicados, hasta el momento, coinciden con nuestros resultados (Martínez-Frías y col. , 2005 ; Contal y col., 2005)

En el presente estudio hemos observado que, bajo estas condiciones, los fetos de gestantes que fuman presentan un elevado aumento de la inestabilidad cromosómica (evaluada por la presencia de anomalías cromosómicas estructurales y lesiones cromosómicas). Dicho incremento de inestabilidad cromosómica no puede ser atribuido ni al sexo, ni a las semanas de gestación del feto, ni tampoco al tratamiento hormonal en caso de que la gestante haya seguido un programa de reproducción asistida.

Dado que, de todas estas variables, la **edad materna** era la única que era más alta en el grupo de fetos procedentes de gestantes fumadoras que en el grupo control hemos analizado con cuidado su posible efecto en el incremento de inestabilidad detectado. Es bien conocido que la edad materna se asocia a un incremento en anomalías cromosómicas numéricas (especialmente trisomías), pero no hay estudios que relacionan la edad materna de la madre con un incremento de lesiones o anomalías cromosómicas estructurales. Con el fin de averiguar (o descartar) si la edad influye en el incremento de inestabilidad cromosómica observado, hemos utilizado los dos modelos GEE (incluyendo o no la edad como covariable). Los valores de P tan elevados obtenidos al excluir los casos con edad avanzada evidencian que el factor de la edad materna no influye y sugieren que esta variable podría descartarse del análisis. Estos resultados muestran que efectivamente las diferencias detectadas en la

---

inestabilidad cromosómica, las lesiones y las anomalías estructurales no son debidas a la edad de las gestantes sino al hábito del consumo tabaco.

Al analizar el posible efecto hormonal en mujeres sometidas a reproducción asistida aplicando el modelo GEE reducido, es decir, descartando las mujeres tratadas hormonalmente, obtuvimos dos subgrupos (el de fumadoras y el de control). En este análisis obtuvimos resultados concordantes ya que las edades de las gestantes no mostraban diferencias estadísticamente significativas respecto a la inestabilidad cromosómica, las lesiones cromosómicas y las anomalías estructurales, confirmando que la edad de las mujeres no influye en los resultados.

## **5.2.-Efecto genotóxico del tabaco**

Es bien conocido que el consumo del tabaco tiene repercusiones sobre la propia salud del fumador y los individuos que conviven con el (fumadores pasivos). El humo ambiental del tabaco contiene más de medio centenar de sustancias químicas cancerígenas (Hoffman y Hoffman, 1997; Hecht, 1999) que son responsables de los cánceres del tracto respiratorio, urinario, digestivo (Shields, 2000; Koh y col., 2001; Stewart y Kleihues, 2003).

El creciente interés sanitario ha llevado a estudiar ampliamente diferentes implicaciones del tabaco, una de ellas sobre la salud de la descendencia. Existen diferentes estudios que muestran una fuerte asociación entre gestantes fumadoras y la presencia de retraso del crecimiento fetal, el incremento de la presión sanguínea en recién nacidos, la frecuencia y duración de apneas obstructivas, los problemas gastrointestinales, el incremento de cólicos y de muerte súbita en recién nacidos (Kahn y col.,1994; Beratis y col., 1996; Horta y col.,1997; Wisborg y col., 2000; Bernstein y col., 2000; Hrubá y Kachlik, 2000; Habek y col., 2002; Shenassa y Brown, 2004).

Hoy en día, para analizar el efecto genotóxico de un determinado agente químico o físico y cuantificar su efecto adverso sobre la salud, en particular cáncer, se utilizan distintos biomarcadores. Entre los principales biomarcadores citogenéticos en linfocitos procedentes de sangre periférica se encuentran: los intercambio de cromátides hermanas, las alteraciones cromosómicas, y la presencia de micronúcleos (Mushap y col., 2004; Norpa , 2004).

Diferentes estudios realizados en linfocitos de individuos sanos muy fumadores (>30 cigarrillos/día) han mostrado la existencia de un incremento de intercambio de cromátides hermanas, alteraciones estructurales (principalmente translocaciones y dicéntricos), de micronúcleos y de lugares frágiles (Littlefield y Joiner, 1986; Chen y col., 1989, Stephan y Pressl, 1999; Tawn y Whitehouse, 2001). Parece que la nicotina y la nitrosaminocetona contribuyen a la carcinogénesis al inhibir la apoptosis, es decir, la destrucción de células con mutaciones, permitiendo que éstas persistan y incrementando las posibilidades de nuevas lesiones sobre el ADN (Hecht, 2002; Shields, 2002)

Nuestros resultados evidencian que la exposición al tabaco *in utero* produce un incremento de alteraciones estructurales, especialmente translocaciones, deleciones y cromosomas marcadores. Pluth y col., (2000), encontraron resultados similares al analizar sangre del cordón umbilical de recién nacidos de mujeres que fumaban durante la gestación. Sin embargo, no todos los resultados obtenidos, hasta el momento, son coincidentes; así por ejemplo los trabajos realizados por Rowland y Harding (1999) en linfocitos de mujeres fumadores jóvenes (>20 cigarrillos/día) evidencian un incremento significativo, respecto al grupo control, en el número de intercambio de cromátides hermanas pero no en relación a las alteraciones cromosómicas estructurales.

Actualmente, los datos citogenéticos encaminados a detectar el posible efecto transplacentar del tabaco durante la gestación son controvertidos. Existen únicamente dos estudios indirectos que utilizan vellosidades coriales (Shulman y col., 1991; Salonen y Lähdetie, 1993). Mientras en uno de ellos, se detectó un incremento significativo en el número de intercambio de cromátides hermanas en vellosidades coriales de gestantes que fumaban (Salonen y Lähdetie, 1993); en el otro, no se observó ningún incremento en lesiones cromosómicas (Shulman y col., 1991).

Al comparar los resultados citogenéticos obtenidos en los dos grupos (fetos de gestantes fumadoras y de no fumadoras), hemos observado diferencias importantes en la proporción de anomalías estructurales y en ,menor grado, en la proporción de metafases con inestabilidad cromosómica y en la de lesiones cromosómicas. Esta propensión de fetos de gestantes fumadoras a sufrir roturas cromosómicas indica la existencia de un fuerte efecto genotóxico del tabaco detectándose una mayor incidencia de las anomalías consideradas como más severas (estructurales vs lesiones y roturas vs gaps). En nuestro caso, todos los estudios citogenéticos se hicieron después de realizar cultivos celulares; por lo que podría aceptarse que las lesiones cromosómicas (que presentaban una menor diferencia estadística) podían haberse originado en el cultivo; mientras que las alteraciones cromosómicas estructurales, en las que observamos más significación probablemente ocurren *in vivo*. De todas formas, nuestro estudio, pone en evidencia que los fetos expuestos al tabaco en el útero presentan un incremento de inestabilidad cromosómica y que este incremento no está influenciado por la edad materna.

En los últimos años, se han detectado aductos de aminobifenil hemoglobina en fetos expuestos al tabaco *in utero* (Coghlin y col., 1991).

También se ha descrito una acumulación de nicotina y de carcinógenos específicos del tabaco en el feto en gestantes fumadoras durante las fases más tempranas del desarrollo (Ruhle y col., 1995; Milunsky y col., 2000). En este trabajo no hemos podido medir los niveles de componentes específicos (p ej. nicotina) en el líquido amniótico ni en el suero materno debido a que las muestras se obtenían con fines diagnósticos. Esto ha impedido que hayamos podido demostrar, ni analizar, si existen relaciones directas entre los niveles de componentes genotóxicos y aumento de inestabilidad cromosómica en el feto. Sin embargo, el hecho de que varios trabajos hayan descrito la presencia de estos componentes en la sangre de fetos de mujeres fumadoras (Lackmann y col., 1999; Jauniaux y col., 1999; Millunsky y col., 2000) apoyaría nuestro hallazgo, sugiriendo un posible efecto genotóxico del tabaco durante la gestación.

En nuestro estudio, la inestabilidad cromosómica detectada podría deberse al fuerte hábito de fumar (promedio de 18 cigarrillos por día) o al largo tiempo de exposición al tabaco (promedio de 19 años). Este último aspecto no ha sido analizado previamente y probablemente podría relacionarse con la larga exposición al tabaco de los oocitos de los que procede el feto. Los componentes del tabaco afectan a todas las células del organismo y, por tanto, también podrían ocasionar lesiones genéticas prezigóticas en células germinales, de forma que cuanto más tiempo expuesto (oocito) más riesgo de que se produzcan daños en el ADN.

### **5.2.1.- Regiones cromosómicas especialmente afectadas por el consumo del tabaco**

Para determinar si, en el feto, existen regiones cromosómicas la exposición al tabaco da lugar a regiones cromosómicas especialmente afectadas

por la exposición del tabaco se han analizado los puntos de rotura implicados tanto en las lesiones cromosómicas como en las anomalías estructurales.

Hemos observado, en ambos grupos de fetos de fumadoras y de no fumadoras, una distribución aparentemente no al azar de estos puntos de rotura. Además hemos encontrado una coincidencia con bandas donde se han descrito **lugares frágiles** (HGM, 1991) ( $\chi^2=3,841$   $P<0.001$ ). Diferentes trabajos habían descrito, previamente, en preparaciones cromosómicas de vellosidades coriales la existencia de una localización preferencial de los puntos de rotura espontáneos en este tipo de bandas (Miguez y col., 1991; Caparossi y col., 1995). Esta misma coincidencia también había sido observada en linfocitos de fumadores (Ban y col., 1995; Stein y col., 2002).

Los lugares frágiles se expresan como gaps o roturas en los cromosomas de las células que crecen bajo condiciones de cultivo específicas. Los estudios llevados a cabo en linfocitos procedente de sangre periférica muestran una frecuencia de expresión de lugares frágiles mucho mayor en fumadores que en controles (Chen y col., 1989; Kao-Shan y col., 1987). En nuestro estudio también hemos detectado en amniocitos de gestantes fumadoras un incremento de lesiones cromosómicas (gaps y roturas) que denominamos “espontáneas” ya que aparecen sin utilizar un medio inductor de fragilidad cromosómica.

Para identificar las bandas con mayor propensión a romperse utilizamos el programa FSM. En el grupo control detectamos 12 bandas cromosómicas más afectadas por la exposición al tabaco y en el grupo de fetos procedentes de gestantes fumadoras 30. De estas últimas, tres bandas resultaban especialmente afectadas por la exposición al tabaco: la 5q31, la 17q21 y sobretodo la 11q23 (con roturas observadas únicamente en fumadoras).

Dos de estas bandas, la 5q31.1 y la 11q23.3, corresponden a regiones donde se localizan los lugares frágiles: FRA5C, FRA 11B y FRA11G (HGM,1991). El FRA5C y el FRA11G se consideran: “fragile sites aphidicolin-type common”; es decir inducibles por afidicolina que es un inhibidor de la ADN polimerasa  $\alpha$  y  $\gamma$ . Mientras que el FRA11B se define como un “fragile site folic acid-type, rare”; es decir que se expresa bajo deficiencia de ácido fólico (HGM,1991). En este sentido es de destacar que los fumadores presentan una baja concentración de ácido fólico en su suero (Chen y col., 1989). De confirmarse también esta deficiencia en el feto podría explicar la alta incidencia de puntos de rotura en 11q23 observado en nuestro estudio.

Diferentes autores han descrito que la expresión de lugares frágiles es significativamente mayor en fumadores que en controles, pero la mayoría no detallan de qué lugares frágiles se trata. Dentro de los trabajos publicados que los detallan se encuentra los de Kao-Shan y col., (1987) y Chen y col., (1989). Al comparar nuestros resultados con los de estos autores hemos observado que ninguno de los 30 lugares frágiles descritos por Kao-Shan y col.,(1987) coincide con los observados en nuestro estudio. Sin embargo, el artículo de Chen y col., (1989) se describe el 5q31 como uno de los cinco lugares frágiles más expresados si bien no encuentran al 11q23.

Más recientemente, se ha establecido que, en fumadores, la exposición al tabaco incrementa la fragilidad cromosómica debido a una adaptación de los mecanismos de reparación del ADN, que provoca una acumulación de daño genético (Stein y col., 2002; Spitz y col., 2003). Estos mismos autores indican que esta reparación ineficaz es transitoria y reversible. Todos estos datos sugieren que la exposición al tabaco induce la expresión de lugares frágiles “in vivo” pudiendo contribuir a la aparición de células neoplásicas (Glover, 1998; Richards, 2001).

De acuerdo con los estudios anteriores, nuestros resultados muestran que la exposición al tabaco incrementa la inestabilidad cromosómica debido a la existencia de una replicación del ADN (tardía o incompleta) o a la existencia de errores en los mecanismos de reparación (pobre inducción a la reparación o respuesta ineficaz). Ambos mecanismos pueden afectar la integridad de la estructura del cromosoma en estas regiones, favoreciendo la aparición de lesiones y anomalías cromosómicas estructurales. Además estas rotura podrían dar lugar a deleciones o interrupciones de genes funcionales que ha su vez podrían originar defectos en el desarrollo o alteraciones genéticas, incluyendo cáncer.

### **5.2.2.- Relación entre incremento de inestabilidad cromosómica, las regiones cromosómicas especialmente afectadas por la exposición al tabaco y cáncer**

Se ha sugerido que el incremento de alteraciones cromosómicas resultantes de la exposición a un agente genotóxico sería indicativo del riesgo aumentado de padecer cáncer (Anderson y Zeiger, 1997) y que la propia inestabilidad cromosómica, por si misma, podría ser considerada como un factor de riesgo de cáncer (Bakshi y col.,1999). Por otro lado diferentes autores consideran que la expresión de lugares frágiles en células cancerosas podrían ser responsables de la inestabilidad cromosómica que presentan (Yunis y Soreng., 1984; Glover,1998; Sutherland y Richards, 1999; Richards, 2001). Por último, también se ha asociado la susceptibilidad a contraer cáncer con la deficiencia de los mecanismos de reparación (Au y col.,1996) Heim y Mitelman (1987) sugirieron que el incremento de inestabilidad cromosómica, detectado en

linfocitos de fumadores, podía reflejar el incremento del riesgo de padecer cáncer, especialmente de pulmón.

El benzopireno, componente mayoritario del tabaco, es un carcinógeno. Se sabe que induce la expresión de lugares frágiles (Yunis y Soreng, 1987) y la aparición de mutaciones en el ADN fetal como pérdida de la función del gen supresor del tumor p53 (Zenzes y col., 1999). La nicotina y la nitrosaminocetona presentes en el tabaco contribuyen a la carcinogénesis al inhibir la apoptosis incrementando así las posibilidades de nuevas lesiones sobre el ADN o alterando los sistemas de reparación (Hecht, 2002; Shields, 2002).

Desde hace más de 30 años el consumo de tabaco activo y pasivo está considerado como agente cancerígeno seguro para distintos tipos de tumores en adultos (Shields, 2000; Koh y col. 2001; Stewart y Kleihues, 2003). Sin embargo, la asociación con cánceres pediátricos ha sido más difícil de determinar debido a su baja incidencia. Se estima que la frecuencia de cánceres pediátricos es considerablemente baja de 11 a 15 por cada 100.000 individuos menores de 14 años; siendo la época fetal e infantil las más susceptibles al inicio de la oncogénesis (Saad y Aldrich, 2004). Es interesante destacar que mientras en adulto la mayoría de los cánceres son carcinomas (que se desarrollan a partir de tejidos epiteliales cutáneos o mucosos) en niños, el 90% de los cánceres se desarrollan principalmente en el sistema hematológico, sistema nervioso central y tejidos mesenquimatosos (Muñoz, 1997; Smith y Ries, 2002).

Se ha comprobado que existe una asociación estrecha entre la presencia de un padre fumador (madre no fumadora) durante el periodo preconcepcional (5 años) y gestacional y el aumento del riesgo de cáncer infantil durante los primeros cinco años de vida sobre todo leucemias agudas y linfomas (Ji y col. 1997; Finette y col. 1998). Sin embargo, hasta el momento, no se ha podido

---

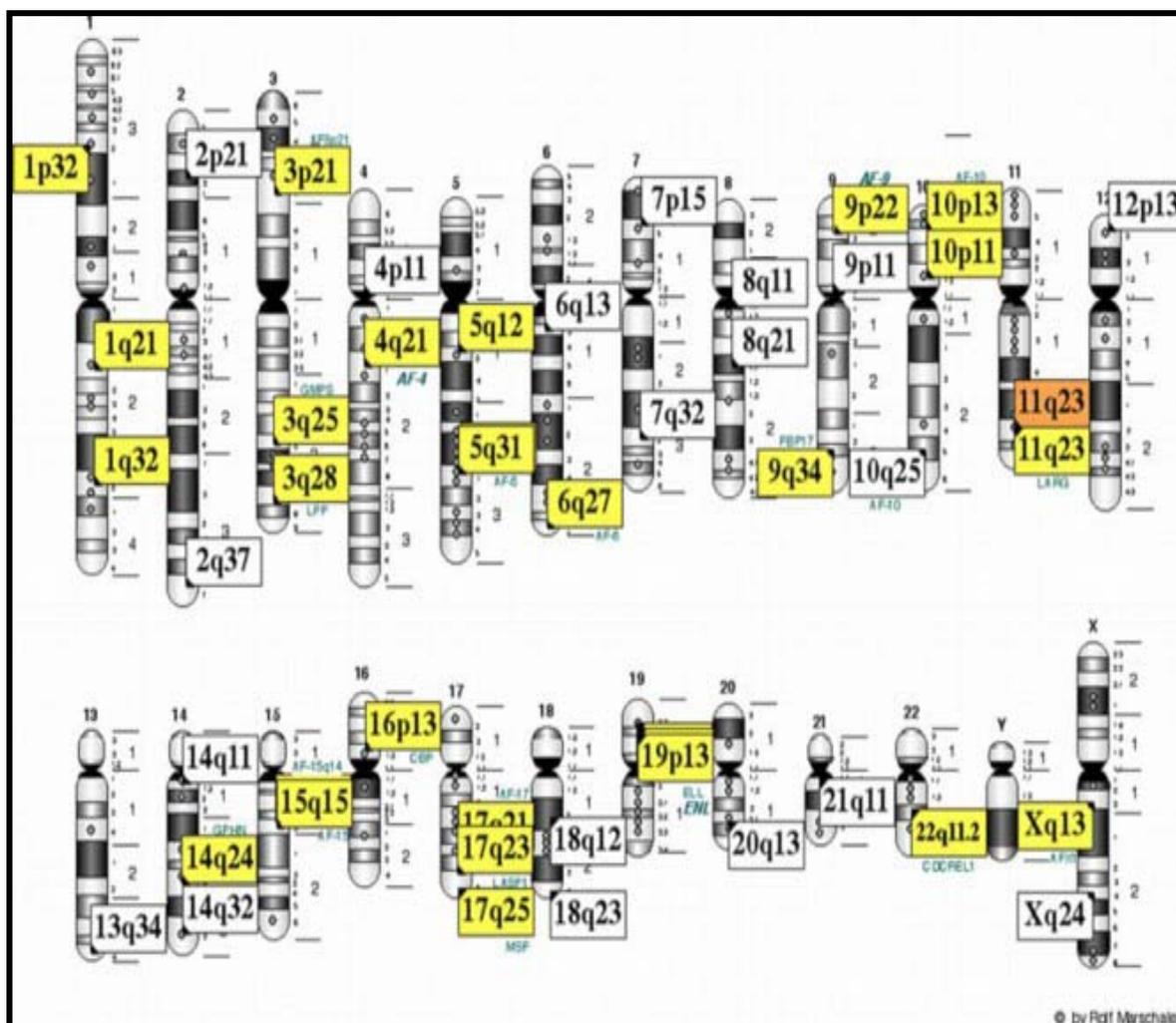
confirmar esta asociación si quien fuma es sólo la madre (Sasco y Vainio, 1999). Sin embargo, diferentes autores han descrito la existencia de una fuerte asociación entre el consumo de tabaco materno y la presencia en la descendencia de: linfomas no-Hodgking, leucemia linfocítica aguda (ALL) y tumores de Wilms (Stjernfeldt y col., 1986). A pesar de las dificultades y limitaciones epidemiológicas, el consumo adictivo del tabaco parental (maternal o paternal) se asocia a un mayor riesgo de cáncer pediátrico global.

Una alta proporción (60-70%) de niños con ALL presentan reorganizaciones cromosómicas en **11q23**, no siempre detectables a nivel citogenético (Chen y col., 1993; Ford y col., 1993; Moorman y col., 2005). También los niños con leucemia mieloide aguda (AML) tienen una elevada incidencia de alteraciones en 11q23 (Hall, 2001). Las reorganizaciones en 11q23 son particularmente frecuentes en niños menores de un año (lactantes) alcanzando una incidencia del 40% al 70%. En niños menores de 5 años esta frecuencia disminuye hasta un 18% y en adultos se observa en un 3-7% de los casos (Cox y col., 2004). Estos hallazgos evidencian la importancia de la existencia de roturas en 11q23 en los cánceres hematopoyéticos infantiles y sugieren la posibilidad que niños con alteraciones en 11q23 podrían haber estado expuestos a agentes exógeno "in utero" o en el momento de nacer (Ford y col., 1993; Chen y col., 1993; Hall, 2001; Cox y col., 2004). Nuestros resultados apoyarían esta idea, siendo imprescindible, en un futuro, realizar estudios epidemiológicos que confirmen la existencia de una asociación entre madres fumadoras y niños con cáncer infantil.

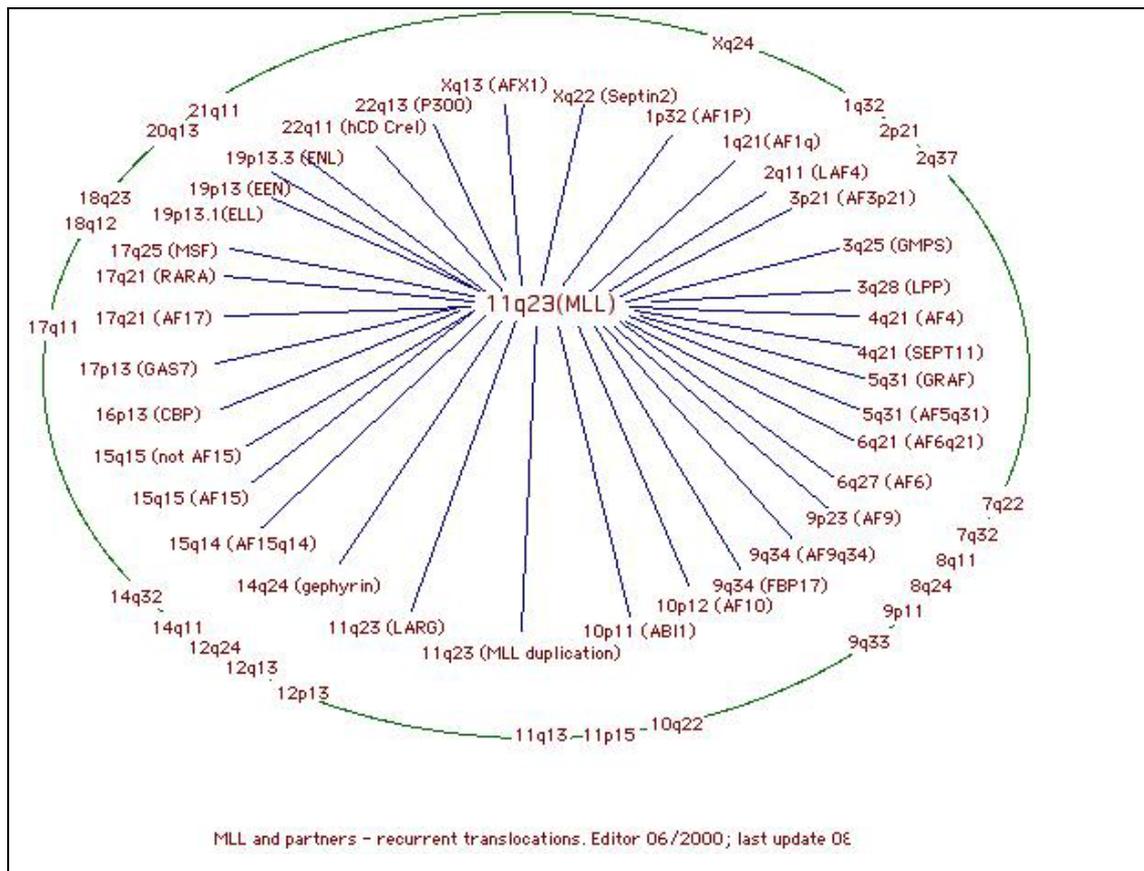
Aproximadamente la mitad de todos los niños con AML tienen reordenamientos en el **gen MLL** (*myeloid-lymphoid leukemia o mix-lineage-leukemia*) (Jaffe y col., 2001). El gen MLL codifica una proteína de 431 kD, que es un factor de transcripción. Este factor se encuentra activo durante el período

embrionario estando involucrado en la regulación de los genes Hox, los cuales están implicados tanto en el patrón de desarrollo como en la diferenciación hematopoyética (Yagi y col., 1998; Cimino y col., 1993). La alteración de este gen es un evento patogénico recurrente en leucemias con aberraciones en la banda cromosómica 11q23, detectándose en la leucemia mieloide aguda (AML), la leucemia linfocítica aguda (ALL), la leucemia mieloide crónica en crisis blástica (CMLcb), las leucemias agudas (AL) secundarias inducidas por tratamiento con inhibidores de la enzima topoisomerasa II y otras entidades como enfermedad de Hodgkin, los linfomas no hodgkinianos y los síndromes mielodisplásicos (SMD).

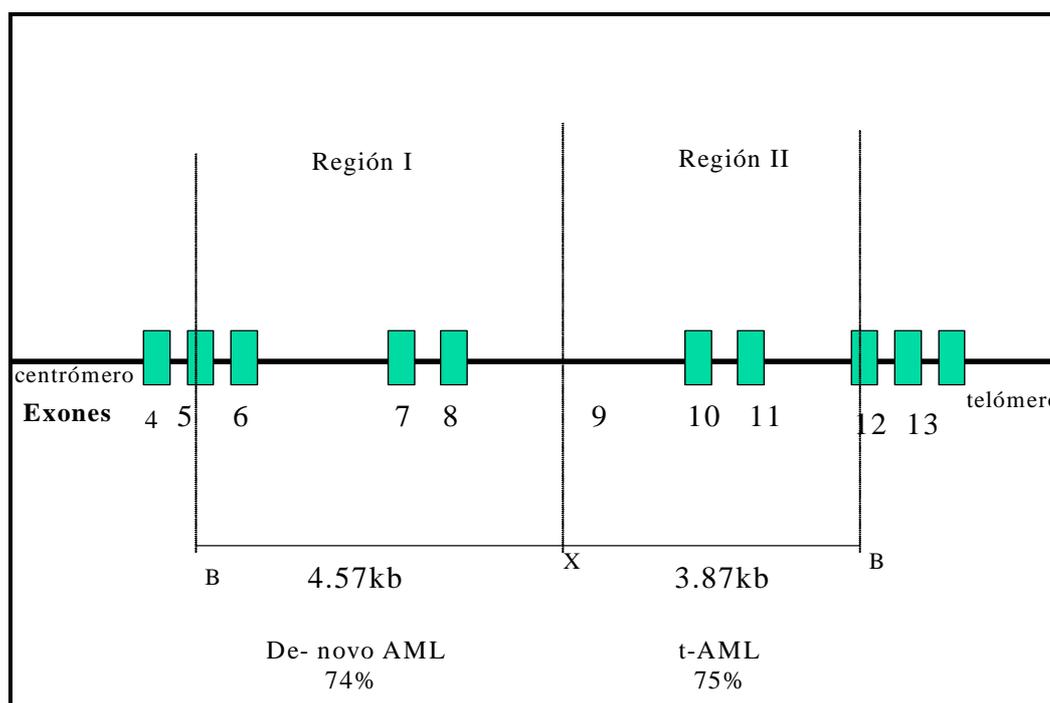
En total en estas patologías se han descrito 54 translocaciones cromosómicas diferentes en las que se encuentra implicado el 11q23 (Marschalek , 2005) (Fig. 33). En estas translocaciones el gen MLL se puede unir a uno de los 31 genes distintos (Meyer y col., 2005) (Fig. 34) originando un nuevo gen híbrido o quimérico. (Hall, 2001) (Fig. 35)



**FIGURA 33.** Distribución en un idiograma del cariotipo humano haploide de los puntos de rotura asociados a MLL (Marschalek, 2002)



**FIGURA 34.** Bandas cromosómicas y genes implicados con reorganizaciones de la banda 11q23 (Huret y col., 2004).



**FIGURA 35.** Gen híbrido (5' MLL- 3'). Algunos pacientes con AML de novo tienen puntos de rotura en la región I centromérica (4,57kb). Algunos de los pacientes con t-AML tienen los puntos de rotura en la región II telomérica (4.87 kb) (Hall, 2001).

Otro gen localizado en esta misma banda es el **ATM** (cell prolymphocytic leukemia), localizado concretamente en 11q22-q23 (Gatti y col., 1988; Sanal y col., 1990). El gen ATM, es responsable de la ataxia-telangiectasia, una patología neurológica hereditaria que puede cursar con procesos cancerosos y está implicado en el daño genómico que caracteriza a los linfomas de las células del manto.

En esta región se ha localizado también el gen **PLZF** (leukemia acute, promyelocytic, PLZF/RARA type) (Chen y col., 1994) que se expresa en tejidos embrionarios, dando lugar a células progenitoras hematopoyéticas. PLZF se expresa en células CD34+ y en hematopoyéticas multipotentes primitivas

observándose que los niveles de PLZF disminuyen progresivamente con la maduración de la célula.

Respecto a las otras dos bandas más afectadas por el tabaco, en nuestro estudio están también relacionadas con procesos leucémicos en niños: la **5q31** (Frestedt y col., 1996; Hu y col., 2001) y la **17q21** (Hall, 2001). Es interesante destacar que en adultos (47-76 años) con leucemia linfática crónica (CLL) el lugar frágil más expresado es el 5q31 pero no el 11q23 (Fundia y col., 2000). Esto sugiere que la banda 11q23 estaría más bien asociada a un incremento de riesgo de cáncer hematológico infantil.

Por último, si bien la banda **3p14.2**, donde se ubica el lugar frágil (FRA3B) más frecuentemente expresado en la población, no está entre las tres bandas especialmente afectadas por el tabaco en nuestro estudio, constituye una de las bandas más afectadas por el tabaco (presentando seis roturas). Dicha banda no se ha encontrado afectada en controles, indicando que la expresión de FRA3B está directamente relacionada con el tabaco tal como se habían descrito previamente (Stein y col., 2002).

En resumen, el hábito de fumar en mujeres en cantidades de 10 o más cigarrillos al día, durante un largo periodo (10 años o más) y especialmente durante el embarazo incrementa la inestabilidad cromosómica en células fetales (amniocitos). Además, nuestro estudio sugiere que una de las consecuencias de que los componentes del tabaco atraviesen la placenta podría incrementar el riesgo de padecer cánceres hematológicos pediátricos.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la necesidad de:

- 1) Divulgar entre profesionales de la sanidad, principalmente ginecólogos y pediatras, la existencia de una más que probable asociación entre tabaquismo parental y cáncer pediátrico.
- 2) Realizar un consejo efectivo al fumador para conseguir reducir la exposición al humo del tabaco en los niños, así como realizar las campañas publicitarias que adviertan del peligro de consumir tabaco para la descendencia dando así una razón más para dejar de fumar. Dado que se calcula que el 80% de los fumadores habituales se inician durante la juventud (Villalbi y col., 2004) este aspecto es sumamente importante.
- 3) Iniciar estudios epidemiológicos con el fin de determinar si la descendencia de fumadores tiene incrementado el riesgo de cáncer.

El hallazgo realizado en nuestro estudio de que la banda 11q23 es diana para carcinógenos como el tabaco facilitará la labor de los genetistas moleculares para comprobar la existencia de posibles genes implicados en las alteraciones del desarrollo y cáncer.



## *6.- CONCLUSIONES*

---

## **6.-CONCLUSIONES**

**1.-** El hábito de fumar en mujeres en cantidades de 10 o más cigarrillos al día, durante un largo periodo (10 años o más) y especialmente durante el embarazo influye en el incremento de inestabilidad cromosómica detectada en amniocitos.

**2.-** La edad de las madres, aunque significativamente más alta en el grupo de fumadoras que en el control (3 años de diferencia), no influye en el incremento de inestabilidad cromosómica detectada en amniocitos.

**3.-** Al comparar los resultados citogenéticos obtenidos en fetos expuestos al tabaco in utero (F) y controles (C) se observan diferencias importantes en la proporción de anomalías cromosómicas estructurales [P=0.002; F:12,1% (96/793) y C:3,5 % (26/752)] y en menor grado en la proporción de metafases con inestabilidad cromosómica [P=0.04; F:10,5%(262/2492) y C:8,0%(210/2637)] y en la proporción de lesiones cromosómicas [P = 0.045; F:15,7%(8391/2492) y C:10,1%(267/2637)]

**4-** La distribución de 689 puntos de rotura implicados en lesiones y alteraciones estructurales, en ambos grupos de gestantes fumadoras y controles, no es al azar y se observa una localización preferencial con bandas donde se han descrito lugares frágiles (P <001).

**5.-** La banda 3p14.2, donde se ubica el lugar frágil FRA3B más frecuentemente expresado, sólo se ha encontrado afectada en el grupo de fumadoras, indicando que la expresión de FRA3B esta directamente relacionada con el tabaco tal como habían descrito previamente otros autores .

**6.-** Se han identificado tres bandas cromosómicas especialmente afectadas por la exposición al tabaco: la 5q31, la 17q21 y sobretodo la 11q23. Roturas afectando a esta última banda sólo se han encontrado en el grupo expuesto al tabaco.

**7.-** La banda 11q23, que hemos identificado como especialmente sensible a los componentes del tabaco, esta fuertemente implicada en las neoplasias hematológicas pediátricas. Las otras dos bandas, 5q31 y 17q21, se hallan también implicadas con procesos leucémicos infantiles aunque en mucho menor grado.

**8.-** Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que, en el feto, la exposición a los componentes del tabaco que atraviesan la placenta podría estar asociada a procesos oncohematológicos pediátricos, aunque serán necesarios estudios epidemiológicos para establecer la asociación entre fumar y aumento del riesgo de aparición de cáncer hematológico en los niños.

## ***7.- BIBLIOGRAFÍA***

---

## **7.-BIBLIOGRAFÍA**

A

---

Anderson D, Zeiger E. Human monitoring. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30: 95-96.

Au WW, Rodríguez G, Rocco C, Legator MS, Wilkinson GS .Chromosome damage and DNA repair response in lymphocytes of women who had children with neural tube defects. *Mutat Res* 1996; 361: 17-21.

**B**

---

Bakshi SR, Patel RK, Roy SK, Alladi PA, Trivedi AH, Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah PM, Rawal UM . Chromosomal aberrations in young cancer patients *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 115: 114-117.

Ban S, Cologne JB, Neriishi K. Effect of radiation and cigarette smoking on expression of FUDR-inducible common fragile sites in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 1995; 334: 197-203.

Baumert J, Ladwig KH, Doring A, Lowel H, Wichmann HE. Temporal Changes and Determinants of Smoking Habits with Respect to Prevention. *Gesundheitswesen* 2005; 67(Suppl 01): 46-50.

Beratis NG, Panagoulas D, Varvarigou A .Increased blood pressure in neonates and infants whose mothers smoked during pregnancy: *J Pediatr* 1996; 128: 806-812.

Bernstein IM, Plociennik K, Stahle S, Badger GJ, Secker-Walker R. Impact of maternal cigarette smoking on fetal growth and body composition *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 883-886.

Böhm U, Dahm PF, McAllister BF, Greenbaum IF. Identifying chromosomal fragile sites from individuals: a multinomial statistical model. *Hum Genet* 1995; 95: 249-256.

Brunnemann KD, Hoffmann D. Analytical studies on tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit Rev Toxicol* 1991; 21: 235-240.

## C

Caporossi D, Vernole P, Nicoletti B, Tedeschi B. Characteristic chromosomal fragility of human embryonic cells exposed in vitro to aphidicolin. *Hum Genet* 1995; 96: 269-274.

Cardenas VM, Thun MJ, Austin H, Lally CA, Clark WS, Greenberg RS, Heath CW Jr. Environmental tobacco smoke and lung cancer mortality in the American Cancer Society's Cancer Prevention Study. II. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 57-64.

Chen AT, Reidy JA, Annest JL, Welty TK, Zhou HG. Increased chromosome fragility as a consequence of blood folate levels, smoking status, and coffee consumption. *Environ Mol Mutagen* 1989; 13: 319-324.

Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, Bernstein ID, Korsmeyer SJ, Hammond GD, Kersey JH. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993; 81: 2386-2393.

Chen Y, Pederson LL, Lefcoe NM. Passive smoking and low birthweight. *Lancet* 1989; 1;2(8653): 54-55.

Chen Z, Guidez F, Rousselot P, Agadir A, Chen SJ, Wang ZY, Degos L, Zelent A, Waxman S, Chomienne C. PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1178-1182.

## Bibliografia

---

Cimino G, Lo Coco F, Biondi A, Elia L, Luciano A, Croce CM, Masera G, Mandelli F, Canaani E. ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood* 1993; 15: 544-546.

Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res* 2004; 6 :125-140.

Coghlin J, Gann PH, Hammond SK, Skipper PL, Taghizadeh K, Paul M, Tannenbaum SR. 4-Aminobiphenyl hemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 274-280.

Contal M, Masson G, Boyer C, Cazevielle C, Mares P. Neonatal consequences of maternal smoking during pregnancy. *Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2005; 34 Spec No 1: 3S215-222.

Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 1997; 89: 215-225.

Cox MC, Panetta P, Lo-Coco F, Del Poeta G, Venditti A, Maurillo L, Del Principe MI, Mauriello A, Anemona L, Bruno A, Mazzone C, Palombo P, Amadori S. Chromosomal aberration of the 11q23 locus in acute leukemia and frequency of MLL gene translocation: results in 378 adult patients. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 298-306.

D

---

De Seixas Correa LF .The framework convention on tobacco control. Bull World Health Organ 2002; 80(12): 924. Epub 2003 Jan 23.

Dekaban A. Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. J Nucl Med 1965; 10: 740-746.

DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. Mutat Res 2004; 567(2-3): 447-474.

Desurmont M, Schepens C. Relationship between sudden infant death and in utero exposure to smoking: how should smoking parents be informed?. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2005; 34 Spec No 1: 3S223-229.

Diethelm PA, Rielle JC, McKee M. The whole truth and nothing but the truth? The research that Philip Morris did not want you to see. Lancet 2005; 366: 86-92.

Bibliografía \_\_\_\_\_

E \_\_\_\_\_

Egozcue J, Forteza G. Cytogenetic arguments on the existence of mitotic "crossing over. Sangre (Barc) 1969; 14: 195-204.

Egozcue J, Antich J, Ballesta F, Goyanes V, Izquierdo L, Tamparillas M, Tavares A. Genética Médica. Ed Expaxs -1978

F

---

Finette BA, O'Neill JP, Vacek PM, Albertini RJ. Gene mutations with characteristic deletions in cord blood T lymphocytes associated with passive maternal exposure to tobacco smoke. *Nat Med* 1998; 4(10): 1144-1151.

Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, Greaves M. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 1993; 363: 358-360.

Frestedt JL, Hilden JM, Kersey JH. AF4/FEL, a gene involved in infant leukemia: sequence variations, gene structure, and possible homology with a genomic sequence on 5q31. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 669-678.

Fundia AF, Acevedo SH, Larripa IB. Chromosomal instability in chronic myeloid leukemia: Philadelphia breakpoints are irrespective to spontaneous breakage and fragile sites. *Haematologica* 2000; 85: 1104-1106.

G \_\_\_\_\_

Gallimore PH, Richardson CR. An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strains of rat. *Chromosoma* 1973; 41: 259-263.

Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988; 8: 577-580.

Glover TW, Stein CK . Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. *Am J Hum Genet* 1987; 41: 882-890.

Glover TW, Stein CK. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 265-873.

Glover TW. Instability at chromosomal fragile sites. *Rec. Results Cancer Res* 1998; 154: 185-199.

Gomolka E, Morawska A, Jenner B, Piekoszewski W, Breborowicz GH. Effect of tobacco smoke exposure on urine lead concentration of pregnant women. *Przegl Lek* 2004; 61: 1116-1118.

Gray RF, Indurkha A, Mc Cormick MC. Prevalence, stability, and predictors of clinically significant behavior problems in low birth weight children at 3, 5, and 8 years of age. *Pediatrics* 2004; 114: 736-843.

Greenbaum IF, Fulton JK, White ED, Dahm PF. Minimum sample sizes for identifying chromosomal fragile sites from individuals: Monte Carlo estimation. *Hum Genet* 1997; 101: 109-112.

---

## H

---

Habek D, Habek JC, Ivanisevic M, Djelmis J Fetal tobacco syndrome and perinatal outcome. *Fetal Diagn Ther* 2002; 17: 367-371.

Hall GW. Childhood myeloid leukaemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 573-591.

Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Natl Cancer Inst* 1999. 91: 1194-1210.

Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 2002; 3: 461-469.

Heim S, Mitelman F. Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genome map to one of the 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. *Hum Genet* 1987 ;75(1): 70-2.

Horta BL, Victora CG, Menezes AM, Halpern R, Barros FC. Low birth weight, preterm births and intrauterine growth retardation in relation to maternal smoking. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1997; 11: 140-151.

Hoffmann D, Hoffmann I . The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 1997; 50: 307-364.

Hrubá D, Kachlik P. Influence of maternal active and passive smoking during pregnancy on birthweight in newborns. *Cent Eur J Public Health* 2000; 8: 249-252.

Hu Z, Gomes I, Horrigan SK, Kravarusic J, Mar B, Arbieva Z, Chyna B, Fulton N, Edassery S, Raza A, Westbrook CA. A novel nuclear protein, 5qNCA

## Bibliografia

---

(LOC51780) is a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on chromosome 5 band q31. *Oncogene* 2001; 20: 6946-6954.

Human gene mapping 11. London Conference (1991). Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping. London, UK, August 18-22, 1991. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 58: 1-984.

Huret JL, Senon S, Bernheim A, Dessen P. An Atlas on genes and chromosomes in oncology and haematology *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004; 50(7): 805-807.

Husgafvel-Pursiainen K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat Res* 2004; 567: 427-45.

I

---

Infante-Rivard C, Fernández A, Gauthier R, David M, Rivard GE. Fetal loss associated with caffeine intake before and during pregnancy. *JAMA* 1993; 270: 2940-2943.

International Agency for Research on Cancer: Tobacco Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol 38. Lyon, IARC, 1986.

J

---

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001: pp 86.

Jalili T, Murthy GG, Schiestl RH. Cigarette smoke induces DNA deletions in the mouse embryo. *Cancer Res* 1998 ; 58: 2633-2638.

Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G ,Thiry P, Rodeck C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 25-29.

Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 238-244.

Jinot J, Bayard S. Respiratory health effects of passive smoking: EPA's weight-of-evidence analysis. *J Clin Epidemiol* 1994; 47: 339-349; discussion 351-353.

K

---

Kahn A, Groswasser J, Sottiaux M, Kelmanson I, Rebuffat E, Franco P, Dramaix M, Wayenberg JL. Prenatal exposure to cigarettes in infants with obstructive sleep apneas. *Pediatrics*. 1994; 93: 778-783.

Kao-Shan CS, Fine RL, Whang-Peng J, Lee EC, Chabner BA. Increased fragile sites and sister chromatid exchanges in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smokers. *Cancer Res* 1987; 47: 6278-6282.

Koh HK, Kannler C, Geller AI. Cancer Prevention: Preventing Tobacco-Related Cancers. En : DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer Principles and Practice of Oncology* 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia : Lippincott Williams-Wilkins 2001. p 549-560.

L \_\_\_\_\_

Lackmann GM, Salzberger U, Tollner U, Chen M, Carmella SG, Hecht SS. Metabolites of a tobacco-specific carcinogen in urine from newborns . J Natl Cancer Inst 1999; 91: 459-465.

Laucht M, Schmidt MH. Maternal smoking during pregnancy: risk factor for ADHD in the offspring?. Jugendpsychiatr Psychother 2004; 32: 177-185.

Liang KY, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. Biometrika 1986; 73: 13-22.

Limongi MZ, Pelliccia F, Rocchi A. Characterization of the human common fragile site FRA2G. Genomics 2003; 81: 93-97.

Littlefield LG, Joiner EE. Analysis of chromosome aberrations in lymphocytes of long-term heavy smokers. Mutat Res 1986; 170: 145-150.

## M

---

Mangelsdorf M, Ried K, Woollatt E, Dayan S, Eyre H, Finnis M, Hobson L, Nancarrow J, Venter D, Baker E, Richards RI. Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer. *Cancer Res* 2000; 60(6): 1683-1689.

Marschalek R. MLL(myeloid/lymphoid or mixed lineage leukaemia). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. November 2002

Marschalek R . Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 449-54. Epub 2004 Dec 30

Martínez-Frías ML, Rodríguez-Pinilla E, Bermejo E; Grupo Periférico del ECEMC. Tobacco smoking during pregnancy in Spain: an analysis according to years, autonomous communities and maternal characteristics *Med Clin (Barc)* 2005 29; 124: 86-92.

Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen MW, van Dongen JJ, Pieters R, Haas OA, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R . Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes .*Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 449-54. Epub 2004 Dec 30

## Bibliografía

---

Míguez L, Fuster C, Perez MM, Miró R, Egozcue J. Spontaneous chromosome fragility in chorionic villus cells. *Early Hum Dev* 1991; 26: 93-99.

Milunsky A, Carmella SG, Ye M, Hecht SS. A tobacco-specific carcinogen in the fetus. *Prenat Diagn* 2000; 20:307-310.

Moorman AV, Raimondi SC, Pui CH, Baruchel A, Biondi A, Carroll AJ, Forestier E, Gaynon PS, Harbott J, Harms DO, Heerema N, Pieters R, Schrappe M, Silverman LB, Vilmer E, Harrison CJ; Ponte di Legno Working Group. No prognostic effect of additional chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia and 11q23 abnormalities. *Leukemia* 2005; 19: 557-563.

Morelli C, Karayianni E, Magnanini C, Mungall AJ, Thorland E, Negrini M, Smith DI, Barbanti-Brodano G. Cloning and characterization of the common fragile site FRA6F harboring a replicative senescence gene and frequently deleted in human tumors. *Oncogene* 2002; 21: 7266-7276.

Muñoz A Introducción a la oncología pediátrica . En : Madero López L, Muñoz Vila A eds. *Hematología y Oncología Pediátricas* . 1ª edición . Madrid: Ed Ergon, 1997.p.197-206.

Musthapa MS, Lohani M, Tiwari S, Mathur N, Prasad R, Rahman Q. Cytogenetic biomonitoring of Indian women cooking with biofuels: micronucleus and chromosomal aberration tests in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2004; 43: 243-249.

N

---

Nazaire MH. Passive smoking and respiratory health in children and adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 705-706.

Norppa H. Cytogenetic biomarkers. *IARC Sci Publ* 2004; 179-205.

Bibliografia \_\_\_\_\_

O \_\_\_\_\_

O'connor RJ, Hyland A, Giovino GA, Fong GT, Cummings KM. Smoker awareness of and beliefs about supposedly less-harmful tobacco products<sup>1</sup>. Am J Prev Med 2005; 29: 85-90.

P

---

Peacock JL, Bland JM, Anderson HR. Effects on birthweight of alcohol and caffeine consumption in smoking women. *J Epidemiol Community Health* 1991; 45: 159-163.

Petersen PE . Tobacco and oral health--the role of the world health organization. *Oral Health Prev Dent* 2003; 1: 309-315.

Pluth JM, Ramsey MJ, Tucker JD. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat Res* 2000; 465: 101-111.

R

---

Ribas M, Miro R, Gelabert A, Egozcue J. Chromosome instability in lymphocytes from two patients affected by three sequential primary cancers: the role of fragile sites. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 110: 133-135.

Richards RI. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet* 2001; 17: 339-345.

Ried K, Finnis M, Hobson L, Mangelsdorf M, Dayan S, Nancarrow JK, Woollatt E, Kremmidiotis G, Gardner A, Venter D, Baker E, Richards RI. Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1651-1663.

Rowland RE, Harding KM. Increased sister chromatid exchange in the peripheral blood lymphocytes of young women who smoke cigarettes. *Hereditas* 1999; 131: 143-146.

Rubes J, Lowe X, Moore D 2nd, Perreault S, Slott V, Evenson D, Selevan SG, Wyrobek AJ. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teen age men. *Fertil Steril* 1998; 70: 715-723.

Ruhle W, Graf von Ballestrem CL, Pult HM, Gnirs J. Correlation of cotinine level in amniotic fluid, umbilical artery blood and maternal blood. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1995; 55: 156-159.

## S

Saad F, Aldrich T Pediatric cancer in Kentucky: good news. *J Ky Med Assoc* 2004; 102: 483-487.

Salonen K, Lahdetie J. No effect of maternal smoking in early pregnancy observed on chromosome aberrations in chorionic villus samples. *Mutat Res* 1993; 298: 285-289.

Sanal O, Wei S, Foroud T, Malhotra U, Concannon P, Charmley P, Salser W, Lange K, Gatti RA. Further mapping of an ataxia-telangiectasia locus to the chromosome 11q23 region. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 860-866.

Sasco AJ, Vainio H. From in utero and childhood exposure to parental smoking to childhood cancer: a possible link and the need for action. *Hum Exp Toxicol* 1999; 18: 192-201.

Shenassa ED, Brown MJ Maternal smoking and infantile gastrointestinal dysregulation: the case of colic. *Pediatrics* 2004; 114: e 497-505.

Shields PG Epidemiology of tobacco carcinogenesis. *Curr Oncol Rep* 2000; 2: 257-262.

Shields PG . Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* 2002; 21: 6870-6876.

Shulman LP, Elias S, Tharapel AT, Li LR, Phillips OP, Simpson JL. Sister chromatid exchange frequency in directly prepared cytotrophoblasts: demonstration of in vivo deoxyribonucleic acid damage in pregnant women who smoke cigarettes. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1877-1880.

Simon R, de la Calle B, Palme S, Meier D, Anklam E  
Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. *J Sep Sci* 2005; 28: 871-882.

Smith MA, Ries LAG. Childhood Cancer: Incidence, Survival, and Mortality. En Pizzo PA ,Poplack DG, eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia : Lippincott Williams – Wilkins, 2002: 1-12.

Soldz S, Dorsey E Youth attitudes and beliefs toward alternative tobacco products: cigars, bidis, and kreteks. *Health Educ Behav* 2005; 32: 549-566.

Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 689-698.

Stein CK, Glover TW, Palmer JL, Glisson BS. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 333-340.

Stephan G, Pressl S. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from healthy subjects as detected in first cell division. *Mutat Res* 1999; 446: 231-237.

Stewart BW, Kleihues P, eds. *World Cancer Report*. International Agency for Research on Cancer. Lyon, IARC Press, 2003.

Stjernfeldt M, Ludvigsson J, Berglund K, Lindsten J. Maternal smoking during pregnancy and the risk of childhood cancer .*Lancet* 1986; 2(8508): 687-688.

Sutherland GR Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 1979; 31: 125-135.

Sutherland GR, Baker E, Richards RI. Fragile sites still breaking. *Trends Genet* 1998; 14(12): 501-506.

Sutherland GR, Richards RI. Fragile sites-cytogenetic similarity with molecular diversity. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 354-359.

T \_\_\_\_\_

Tawn EJ, Whitehouse CA. Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *Mutat Res* 2001; 490:171-177.

Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, Smith DI. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 2000; 60: 5916-5921.

Torikaiu K, Uwano Y, Nakamori T, Tarora W, Takahashi H. Study on tobacco components involved in the pyrolytic generation of selected smoke constituents. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 559-568.

V

---

Villalbi JR, Tomas Z, Lopez MJ, Rodriguez M, Nebot M. Changing epidemiology of smoking: Barcelona, 2000-2001 Rev Clin Esp 2004; 204: 312-316.

Vogler GP, Kozlowski LT. Differential influence of maternal smoking on infant birth weight: gene-environment interaction and targeted intervention. JAMA 2002; 287: 241-242.

Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002; 287: 195-202.

WHO tobacco convention set to become law by year's end. *Bull World Health Organ.* 2004 Aug;82(8):635. Epub 2004 Sep 13.

Wisborg K, Kesmodel U, Henriksen TB, Olsen SF, Secher NJ. A prospective study of smoking during pregnancy and SIDS. *Arch Dis Child* 2000; 83: 203-206.

Y

---

Yagi H, Deguchi K, Aono A, Tani Y, Kishimoto T, Komori T. Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* 1998; 92; 108-117.

Yunis and Soreng. Constitutive fragile sites and Cancer. *Science* 1984; 226; 1199-1204.

Yunis JJ, Soreng AL, Bowe AE . Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene* 1987; 1: 59-69.

Z

---

Zdravkovic T, Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta* 2005; 26: Suppl A:S81-6.

Zenzes MT, Puy LA, Bielecki R, Reed TE. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 125-131.



## 8.-ANEXOS

### ENCUESTA

Con el objeto de realizar un correcto estudio de los hábitos tabáquicos de las mujeres, estas eran sometidas a una entrevista con la finalidad de descartar el consumo de alcohol, café y te. Posteriormente en el caso de que la entrevista fuera totalmente convincente se les entregaba una encuesta con el fin de comprobar los consumos de tabaco, tanto con anterioridad a la gestación como durante la misma, así como su posible exposición en lugares públicos o privados al humo de tabaco en condición de fumadoras pasivas.

CAS N° .....

INDICACIÓ DIAGNÒSTICA.....

SETMANA DE GESTACIÓ.....

EDAT.....

DATA D'EXTRACCIÓ DE LA MOSTRA.....

### QÜESTIONARI:

1- ¿Es usted fumadora habitual? .....

-A quina edat va començar a fumar?.....

-Num. de cigarretes per dia.....

-Tipus de tabac:

- Ros
- Negre
- Baix en nicotina
- D'altres

2. -¿Ha fumat durant les primeres setmanes de gestació (abans de conèixer que estava embarassada)?.....

3.- ¿En decidir quedar-se embarassada, va deixar de fumar?.....

4.- ¿Fuma el seu marit a casa seva?.....

-Num .de cigarretes per dia.....

-Tipus de tabac:

- Ros
- Negre
- Baix en nicotina
- D'altres

5.-¿ Al seu lloc de treball hi-ha fumadors?.....

## Indice de impacto del Journal Citation Report , 2004


 Journal Citation Reports® 2004 JCR Science Edition

<b>Mark</b>	<b>Rank</b>	<b>Abbreviated Journal Title</b> <i>(linked to journal information)</i>	<b>ISSN</b>	<b>Total Cites</b>	<b>Impact Factor</b>	<b>Immediacy Index</b>	<b>Articles</b>	<b>Cited Half-life</b>
□	1	<u>JAMA-J AM MED ASSOC</u>	0098-7484	88864	24.831	5.499	351	6.3