

# Potencial mutagénico del tabaco de mascar venezolano

PATRICIO JARPA

*Cátedra de Histología. Departamento de Medicina Oral. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.*

## RESUMEN

Este trabajo pretende hacer una contribución que ayude a llenar el vacío de conocimiento acerca de la naturaleza y potencial mutagénico del tabaco de mascar venezolano, *chimó*. En este estudio, se utilizó la Prueba de Ames, la cual es una prueba bacteriana muy simple y sensible a la detección de mutágenos químicos. La investigación reveló que aunque algunos de los extractos, por ejemplo el *chimó*, en su dilución 1:2 mostró un aumento dependiente de la dosis en el número de colonias que revirtieron con TA 100 y mostraron diferencias estadísticamente significativas, el aumento máximo se restringió a un poco menos del doble indicando que esta muestra puede ser calificada como un mutágeno débil. El estudio indicó que los extractos de tabaco de mascar examinados no requirieron activación metabólica.

## ABSTRACT

This study intends to make a contribution that helps to fill the gap of knowledge about the nature and potential pathogenicity of the Venezuelan smokeless tobacco, *chimó*. The Ames Test is a very sensitive and simple bacterial test for detecting chemical mutagens. In this study, although some of the extracts (*Chimó* in its 1:2 dilution elicited a dose-dependent increase in the number of revertants with TA 100 strain and showed statistically significant differences, the maximum increase was restricted to slightly less than a doubling, indicating that this sample can be categorized as a weak mutagen. The present study indicates that the smokeless tobacco extracts tested did not require metabolic activation.

## PALABRAS CLAVE

Mutagenicidad, tabaco de mascar, test de Ames, mutágeno, cancerígeno.

## INTRODUCCIÓN

Squier y Lilly (1987) clasificaron, a corto, mediano y largo plazo, los efectos en la salud ocasionados por el

uso del tabaco de mascar.

### Efectos a Corto Plazo

Los efectos más importantes a corto plazo están directamente relacionados con la absorción de la nicotina a través de la mucosa bucal. Dependiendo del tiempo de exposición, el usuario del tabaco de mascar podría estar expuesto a niveles de nicotina en sangre cercanos o superiores a los que presenta un fumador de cigarrillos promedio.

Por ser un vasoconstrictor, la nicotina produce un gran impacto en el sistema cardiovascular alterando la presión sanguínea. Se ha demostrado que los usuarios jóvenes del tabaco de mascar presentan una presión sanguínea elevada, comparada tanto con la de fumadores como la de no fumadores (Schroeder y Chen, 1985). Por lo tanto, podemos decir que el tabaco de mascar puede asociarse con el desarrollo de problemas cardiovasculares.

### Efectos a Mediano Plazo

A mediano plazo, se hacen evidentes algunas manifestaciones bucales. Estas incluyen recesión gingival y manchas en los dientes. Squier y Lilly (1987) también han descrito áreas en donde la mucosa exhibe una superficie rugosa y blanca, presentando a menudo una serie de estriaciones, en el sitio en donde se coloca la porción de tabaco. Estas lesiones corresponden a leucoplasias o queratosis. Estas se han observado en individuos que han tenido el hábito por espacio de dos años. En un estudio reciente, Johnson y Squier (1993) detectaron leucoplasias y recesión gingival como las consecuencias de salud más obvias e inmediatas que implica el uso del tabaco de mascar. Por otro lado, las lesiones tienden a desaparecer si el usuario interrumpe el hábito o cambia el sitio de colocación de la porción de tabaco.

### Efectos a Largo Plazo

El riesgo más importante a largo plazo es el cáncer bucal. Silverman et al. (1984), en un estudio longitudinal con 257 pacientes se encontró que el 17.5 por ciento que presentaba lesiones blancas en la mucosa bucal, desarrolló carcinoma espinoso celular en un periodo

aproximado de 8.1 años. Estudios epidemiológicos realizados en poblaciones hindúes, con usuarios de tabaco de la localidad, indicó que su uso tópico constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal (Mehta et al., 1971). El cáncer bucal es común en India, y el tipo más común es el carcinoma espino, representando un 95 a 98 por ciento de todas las lesiones malignas en la cavidad bucal (Gupta et al., 1989).

En los Estados Unidos, ha habido pocos estudios relacionados con la asociación entre el uso del tabaco de mascar y el cáncer bucal. Según Winn et al. (1981), el riesgo relativo de cáncer bucal en ancianas usuarias de tabaco en pasta fue de 13 a 50 veces mayor dependiendo del tiempo de exposición.

Se han publicado muy pocos estudios epidemiológicos en relación con los efectos del uso del tabaco de mascar en Centro y Sur América. En 1946, Jaffe et al. estudiaron, en ratas, el posible efecto carcinógeno del tabaco de mascar venezolano. Durante tres semanas, se inyectaron, por vía intraperitoneal, extracto de *Chimó*. Después de ocho meses, ninguna rata mostró evidencia de tumores.

En estudios previos (Novoa et al., 1993), se encontró con que el consumo de alcohol tenía un efecto protector significativo ante las anormalidades detectadas en el electrocardiograma (EKG) y que el Chimó era un factor de riesgo para las anormalidades detectadas en la enfermedad cardíaca. Variables tales como, edad, sexo, estado civil, nivel educativo, índice de masa corporal, tabaquismo, alcoholismo, serología de *T. cruzi*, presión sistólica, y altura con respecto al nivel del mar fueron controladas estadísticamente.

Las pruebas de mutación microbiana han mostrado ser efectivas para detectar mutágenos/carcinógenos. Sin estas pruebas de laboratorio, sería difícil identificar estos elementos. Sugimura (1988) encontró que la prueba de Ames era la más recomendable. En esta prueba, distintas sustancias son examinadas usando placas Petri con diversos mutantes especialmente preparados de *Salmonella typhimurium*, seleccionados por su sensibilidad y especificidad para revertir desde un requerimiento de histidina a un estado prototrófico por una amplia variedad de mutágenos. La prueba es altamente eficiente para detectar carcinógenos como mutágenos.

El objetivo principal de esta investigación fue proveer información básica acerca del comportamiento mutagénico del tabaco de mascar venezolano, chimó y comparar su mutagenicidad con otros productos de tabaco de mascar usando la Prueba de Ames.

## MATERIALES Y METODOS

**Potencial mutagénico:** Para determinar la mutagenicidad de los extractos de tabaco de mascar se utilizó la Prueba de Ames. Los resultados se expresan como número de colonias de *Salmonella typhimurium* que revierten su estado, por placa de Petri.

**Tipo de Producto:** Se examinó una marca de tabaco de mascar venezolano (chimó): El Tigrito. Se estudiaron dos productos norteamericanos: Copenhagen, y Skoal Bandits. Se incorporo también, una marca de tabaco de mascar de la India: Maythi.

**Prueba de Mutagenicidad:** Las cepas TA 98 y TA 100 de *S. typhimurium* fueron provistas gentilmente por B.N. Ames. Las cepas se mantuvieron en cápsulas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  tal como lo describen Maron y Ames (1983). La fracción S9, preparada a partir de hígados de ratas Sprague Dawley pre-tratadas con Aroclor 1254, se adquirió en Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, y almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser usada. Primero, los cultivos de la cepa adecuada (TA98 o TA100) fueron inoculados en caldo Oxoid # 2, e incubados en un baño de agua giratorio, agitándose a 120 rpm, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 14 horas.

Durante el ensayo, se preparó agar blando compuesto de agar Difco 0,6% y NaCl 0,5% para ser dispensado en tubos de 13x100 mm (2 ml/tubo). La solución de histidina-biotina se le agregó al agar superficial y los tubos se mantuvieron a  $45^{\circ}\text{C}$  en un bloque térmico. Luego, se añadieron también al agar superficial, 0,1 ml del cultivo de la cepa de prueba, 0,1 ml de extracto de tabaco de mascar, y 0,5 ml de la mezcla S9. Los compuestos se probaron con y sin la mezcla de S9, incluyéndose igualmente en la prueba, los controles positivo y negativo. Se requirió el control negativo compuesto de la bacteria, la mezcla S9 y la saliva artificial para establecer el número de colonias que revierten en cada cepa de prueba. Los controles positivos, sodium azide (Fisher Scientific), carcinógeno bien conocido, sin la mezcla S9 para TA 100 y 2-aminofluoreno (Sigma), un pre-carcinógeno que requiere activación metabólica, en presencia de la mezcla S9 para TA 98. Se prepararon juegos dobles de placas Petri para cada una de las tres concentraciones de extractos de tabaco de mascar. Todos los componentes se mezclaron a baja velocidad por tres segundos, para luego ser vertidos en placas de agar glucosa. Todo este proceso tomó menos de 20 segundos y a continuación las placas se dejaron endurecer antes de invertir las placas. Las placas se incubaron aeróbicamente a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas en una incubadora. Después de 48 horas, se contó el número de colonias que revirtieron en las placas de prueba así como en las placas control, al mismo tiempo se confirmó la presencia del fondo difuso en todas las placas (Ames, B.N., et al., 1975).

**Análisis Estadístico:** El número de colonias que revierten se reportan como medias y desviaciones estandar. Para comparar los valores de las medias se usó análisis de varianza de una vía con un post-test para múltiples comparaciones de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS**

La Tabla 1 muestra los resultados de los cuatro extractos de tabaco de mascar seleccionados para el ensayo de mutagenicidad. Ninguno de ellos alcanzó el doble del aumento en la tasa de reversión espontánea. El chimó venezolano con TA 100 sin la fracción microsomal S9 fue significativamente diferente del control negativo (reversión espontanea) en sus tres concentraciones: sin diluir  $p < 0.01$ , diluido 1:2  $p < 0.001$ , y diluido 1:10  $p < 0.01$ . Con TA 100 en presencia de la fracción microsomal S9, el chimó no mostró diferencias estadísticamente significativas del control. Con TA 98 en la presencia y ausencia de la fracción microsomal S9, todas las concentraciones fueron significativamente diferentes del control, pero no difirieron significativamente entre ellos. USA Bandits con TA 100 y sin la fracción microsomal S9 mostró diferencias significativas del control en sus tres concentraciones: sin diluir  $p < 0.001$ , diluido 1:2  $p < 0.01$ , y diluido 1:10  $p < 0.01$ . En presencia de la fracción microsomal S9, Bandits no mostró diferencia significativa del control en su concentración no diluida; sin embargo, mostró alguna diferencia en las diluciones 1:2 ( $p < 0.01$ ) y 1:10 ( $p < 0.05$ ). USA Bandits, no exhibió diferencias significativas del control con TA98 en presencia o ausencia de la fracción

microsomal S9. USA Copenhagen mostró una diferencia significativa del control con TA 100 en presencia y ausencia de S9 en su concentración sin diluir:  $p < 0.001$  y  $p < 0.01$  respectivamente. Tambien, fue significativamente diferente del control en su dilución 1:10 sin s9 ( $p < 0.01$ ). USA Copenhagen con TA 98 no mostró diferencias significativas del control, con la excepción de su concentración no diluida en la presencia de S9 ( $p < 0.05$ ). El tabaco de mascar hindú, Maythi, mostró diferencia significativa del control solo con TA 100 en ausencia de S9 en sus concentraciones no diluidas y 1:2 ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente). Estos resultados revelan una respuesta aparentemente no relacionada con la dosis, aunque la Tabla 1 muestra que hay diferencias estadísticamente significativas. También, es evidente en esta tabla que TA 98 en ausencia de S9, no mostró diferencias significativas con cualquier producto o concentración probada en comparación con el control (tasa de reversión espontánea). En presencia de S9, no se apreciaron diferencias significativas, excepto con el chimó y Copenhagen en sus concentraciones no diluidas. Por otro lado, TA 100 sin S9, mostró diferencias significativas en todos los productos versus control, salvo en Copenhagen en su dilución 1:2 y en Maythi en su dilución 1:10. El chimó, en presencia de S9, mostró una diferencia significativa con la tasa de reversión espontánea. Bandits mostró diferencias estadísticamente significativas del control excepto en su concentración no diluida. Solo la concentración no diluida del extracto de Copenhagen, exhibió diferencia estadísticamente significativa versus control. El producto hindú, Maythi, no mostró diferencias significativas de la tasa de reversión espontánea.

**Tabla 1.** Actividad Mutagénica de los Extractos del Tabaco de Mascar

MUESTRA	CONCENT. % Sin diluir	N°. PROMEDIO DE COLONIAS QUE REVIERTEN	
		TA 98 -S9 + S9	TA 100 -S9 + S9
CHIMÓ	10	24 ± 2 48 ± 1	88 ± 5 63 ± 6
	50	22 ± 3 42 ± 1	97 ± 3 43 ± 5
	100	27 ± 3 39 ± 3	87 ± 5 44 ± 2
BANDITS	10	27 ± 3 34 ± 2	76 ± 3 74 ± 3
	50	35 ± 1 29 ± 3	79 ± 3 84 ± 4
	100	31 ± 3 33 ± 3	93 ± 4 59 ± 4
COPENHAGEN	10	28 ± 3 37 ± 2	92 ± 5 62 ± 5
	50	27 ± 1 31 ± 3	64 ± 5 39 ± 6
	100	30 ± 3 38 ± 3	87 ± 5 100 ± 3
MAYTHI	10	23 ± 3 33 ± 2	57 ± 5 66 ± 5
	50	20 ± 2 30 ± 3	97 ± 6 53 ± 3
	100	33 ± 4 26 ± 1	53 ± 5 47 ± 5
<b>CONTROLES POSITIVOS</b>			
2 - Aminofluorene	TA 98 (+S9)	2709 ± 224	
Sodium Azide	TA 100 (-S9)	2462 ± 327	
<b>REVERSION ESPONTANEA</b>			
	TA 98	27 ± 3	
	TA 100	54 ± 5	
<b>CONTROL NEGATIVO</b>			
Saliva Artificial - S9 mix			
	TA 98	12 ± 2	
	TA 100	23 ± 3	

**Tabla 2.** Comparación de Extractos de Tabaco vs. Control

Concentración del Producto		Valores p (extracto vs. reversión espontánea)			
		TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
<b>Chimó</b>	Sin Diluir	ns	p<0.01	p<0.01	p<0.05
	Dilusión 1:2	ns	p<0.01	p<0.001	p<0.05
	Dilusión 1:10	ns	p<0.05	p<0.01	p<0.05
<b>Bandits</b>	Sin Diluir	ns	ns	p<0.001	ns
	Dilusión 1:2	ns	ns	p<0.01	p<0.01
	Dilusión 1:10	ns	ns	p<0.01	p<0.05
<b>Copenhagen</b>	Sin Diluir	ns	p<0.05	p<0.01	p<0.001
	Dilusión 1:2	ns	ns	ns	ns
	Dilusión 1:10	ns	ns	p<0.01	ns
<b>Maythi</b>	Sin Diluir	ns	ns	p<0.05	ns
	Dilusión 1:2	ns	ns	p<0.01	ns
	Dilusión 1:10	ns	ns	ns	ns

## DISCUSIÓN

De los muchos tests para mutagenicidad que se han propuesto en los últimos años, el de Ames es el sistema de prueba in vitro más usado y validado mundialmente. Este ensayo utiliza células bacteriales cultivadas en un agar suave que contiene una pequeña cantidad de histidina para permitir el crecimiento de bacterias autotróficas, y está diseñado para detectar mutaciones que revierten células auxotróficas a células prototróficas independientes de la histidina. En este estudio, extractos de tabaco de mascar de USA. (Copenhagen y Skoal Bandits), India (Maythi) y Venezuela (*Chimó*) fueron examinados para detectar niveles de mutagenicidad en los diferentes productos. Las muestras se probaron usando dos cepas experimentales: TA 98 y TA 100, en presencia y ausencia de S9. Estas cepas experimentales son recomendadas para pruebas de mutagenicidad general. El criterio utilizado para identificar cualquier compuesto químico como mutágeno es un aumento de dos veces la tasa de reversión espontánea junto con una respuesta relacionada con la dosis. En nuestro estudio, aunque algunos de los extractos (*Chimó* en su dilución 1:2; Bandits en su concentración no diluida; Copenhagen en su concentración no diluida y Maythi en su dilución 1:2) revelaron un aumento relacionado con la dosis en el número de colonias que revirtieron con la cepa TA100 y mostraron diferencias estadísticamente significativas, el máximo aumento se restringió a un poco menos del doble, reflejando que estas muestras pueden ser categorizadas como mutagenos débiles. El presente trabajo indica que los extractos de tabaco de mascar probados no requirieron

activación metabólica. Por otro lado, nuestras muestras, cuando se probaron con la cepa Ta98, fallaron en mostrar una respuesta positiva o una tendencia a aumentar los números de colonias que revierten.

Los hallazgos obtenidos en esta investigación están en concordancia con estudios anteriores hechos por Shirname-Moré (1991) y Stamm et al., (1994), quienes encontraron que los extractos de tabaco de mascar acidificados y no nitrogenados fallaron en demostrar actividad mutagénica significativa con TA 98 con o sin S9. Otro estudio, realizado por Bagwe et al., (1990), reportó que los extractos acuosos y con cloroformo de tabaco de mascar hindú (Pan masala) resultaron no mutagénicos mientras que los extractos etanólicos fueron apenas mutagénicos en el Test de Ames usando las cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 98 y TA 100). Siendo el tabaco una mezcla compleja en donde se han identificado más de 3000 compuestos en su composición, las cepas convencionales de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) podrían ser predictoras no adecuados de respuestas provenientes de células humanas ante esta mezcla nitrogenada tan compleja. Es más, varios compuestos químicos que son clastogénicos a células de mamíferos son reportados como no mutagénicos en bacterias por Ishidate et al. (1981). Sin embargo, es importante mencionar que más recientemente, nuevas cepas de Salmonella, la serie YG, han sido establecidas por Ishidate (1991), mostrando una gran actividad nitroreductasa o acetiltransferasa y específicamente sensible a las aminas aromáticas en los ensayos de mutación reversa. Estas cepas podrían detectar pequeñas cantidades de aminas aromáticas mutagénicas contenida en la orina de fumadores. Por lo tanto, la especificidad de estas cepas

podría ser útil en la identificación preliminar de principios mutagénicos en mezclas complejas como el tabaco.

## CONCLUSIÓN

El presente estudio examinó los efectos de los productos del tabaco de mascar y su potencial mutagénico. Basado en los resultados obtenidos de estos experimentos, se puede esbozar la siguiente conclusión:

Los productos del tabaco de mascar mostraron baja mutagenicidad después de ser sometidos al Test de Ames con o sin S9.

El presente trabajo reveló que nuestras muestras de productos de tabaco de mascar, no mostraron una respuesta fuerte y positiva en la prueba de mutagenicidad. Sin embargo, para considerarlos como no mutagénicos se requiere su evaluación con otro tipo de pruebas tales como tests de aberración cromosomal; usando el test de Ames con diferentes cepas de *Salmonella* que exhiban una baja frecuencia de reversión espontánea y alta sensibilidad a mutágenos y análisis químicos más precisos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames, B.N.; McCann, J.; y Yamasaki, E. 1975. **Methods for detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/mammalian microsomal mutagenicity test.** Mutation Research 31:347-364.
- Bagwe, A.N., Ganu, U.K., Gokhale, S.V. y Bhisey, R.A. 1990. **Evaluation of the mutagenicity of 'pan masala', a chewing substitute widely used in India.** Mutation Research 241:349-354.
- Gupta, P.C.; Bhonsle, R.B.; y Murti, P.R. 1989. **An Epidemiologic Assessment of Cancer risk in Oral Precancerous lesions in India with special reference to nodular leukoplakia.** Cancer 63:2247-2252.
- Ishidate, M.; Sofuni, T. y Yoshigawa, K. 1981. **Chromosomal Aberration Tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens.** Archives of Toxicology. Supplement. 4:41-44.
- Ishidate, M.; Sofuni, T. y Nohmi, T. 1991. **Quantitative Evaluation on the Genotoxic Potency of Chemicals.** Journal of Toxicological Sciences 16 Supplement 1:83-92.
- Jaffe, W. 1946. **Acción Cancerígena del Alquitrán de cigarrillo y del chimó.** Revista del S.A.S. XI 3-4:387-390.
- Johnson, G.K.; y Squier, C.A. 1993. **Smokeless Tobacco use by youth: a health concern.** Pediatric Dentistry 15(3):169-173.
- Maron, D.M.; y Ames, B.N. 1983. **Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test.** Mutation Research 113:173-215.
- Metha, F.S.; Pindborg, J.J.; Hamner, J.E.; et al. 1971. **Report on Investigations of Oral Cancer and Precancerous Conditions in Indian Rural Populations, Copenhagen.** Munksgaard 1966-69.
- Novoa-Montero, D.; Mandell, W.; Ross.; Torres, R. y Escaffi, P. 1993. **Chewing Tobacco (Chimó) as risk factor for Chronic Cardiopathy in rural chagasic and non chagasic Venezuelan adults, (Submitted)** International Journal of Epidemiology.
- Schroeder, K.L.; Chen, M.S. 1985. **Smokeless Tobacco and Blood Pressure.** New England Journal of Medicine 312:919.
- Shirname-More, L. 1991. **Forward Mutation of Salmonella typhimurium by Smokeless Tobacco extracts.** Mutation Research 259: 37-42.
- Silverman, S.; Gorsky, M.; y Loyada, F. 1984. **Oral Leukoplakia and Malignant Transformation. A follow up study of 257 patients.** Cancer 53:563-568.
- Squier, C.A.; y Lilly, G. 1987. **Smokeless Tobacco-Better Schewed than Chewed.** Department of Oral Pathology and Dows Institute, College of Dentistry, The University of Iowa.
- Stamm, S.C.; Zhong, W.Z.; y Ong, T. 1994. **Mutagenicity of Coal-Dust and Smokeless-Tobacco extracts in Salmonella typhimurium strains with differing levels of O-acetyltransferase activities.** Mutation Research 321(3):253-264.
- Sugimura, T. 1988. **Successful Use of Short-Term Tests for Academic purposes: Their use in identification of new environmental carcinogens with possible risk for humans.** Mutation Research 205:33-39.
- Winn, D.M.; Blot, W.J.; Shy, C.M.; Pickle, L.W.; Toledo, A.; Fraumeni, J.F. 1981. **Snuff Dipping and Oral Cancer among women in the Southern United States.** New England Journal of Medicine 304:745-749.