

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Maestría en Ciencias Biológicas



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

**Evaluación de genotoxicidad y patrones de metilación del ADN
asociados a la exposición a Cigarrillo Electrónico.**

Camila Bernal Forigua

Presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Biológicas

Área:

Genética Humana

Bogotá, Colombia
2022

Evaluación de genotoxicidad y patrones de metilación del ADN asociados a la exposición a Cigarrillo Electrónico.

Camila Bernal Forigua.

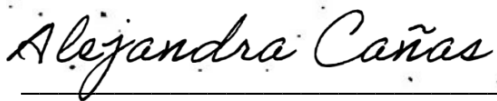
APROBADA



Adriana Patricia Rojas Moreno, MSc, Ph.D
Tutora



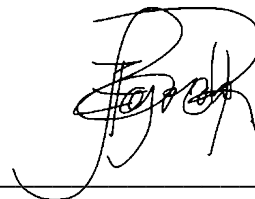
Gonzalo de Jesús Vázquez Palacio, MSc
Jurado



Alejandra Cañas Arboleda, MD
Cotutora



Andrés Felipe Aristizábal Pachón, MSc, Ph.D
Jurado



Javier Enrique Fajardo Rivero, MD
Jurado

Instituto de Genética Humana
Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, Colombia
2022

Evaluación de genotoxicidad y patrones de metilación del ADN asociados a la exposición a Cigarrillo Electrónico.

APROBADA

ALBA ALICIA TRESPALACIOS, MSc. Ph.D
Decana
Facultad de Ciencias

JHON JAIRO SUTACHAN RUBIO, MSc, Ph.D.
Director Posgrado
Facultad de Ciencias

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23, resolución No. 13 de 1946

Agradecimientos.

El presente trabajo de grado no habría sido posible sin la ayuda de mis padres, Adriana Forigua y Fernando Bernal quienes siempre están para apoyarme y acompañarme en cada momento de mi vida, especialmente con los retos a lo largo de mi formación académica, siendo mi soporte y ejemplo por seguir. Agradezco a mis profesores por la formación académica y personal que me han brindado, especialmente a la Dra. Adriana Rojas quien fue mi guía a lo largo del desarrollo de este trabajo, formándome y ayudándome en los momentos difíciles, siempre demostrándome que la verdadera ciencia nace del esfuerzo y trabajo constante sin perder de vista los objetivos y sin rendirse pese a las dificultades. A la Dra. Alejandra Cañas por todo el apoyo e interés frente a este trabajo, especialmente por creer en el poder de lo imposible, asombrarse con cada resultado y entender el impacto social de este proyecto.

A mis compañeros del proyecto de Vapeo, Carlos Camero y María José Pinzón, por ayudarme cuando lo necesitaba, por mostrar interés en este tema y sobre todo por permitirme enseñarles desde mi experiencia.

A Dra. Angela Patricia Vergara porque siempre estuvo dispuesta a compartir conmigo sus conocimientos respecto a este tema de investigación y se mostró muy interesada en este trabajo. Agradecer a mis amigos Gisella Bermúdez y Daniel González, gracias por escucharme, brindarme consejos para mejorar, darme perspectiva y fuerzas para continuar pese a las dificultades. Siempre viviré agradecida por vivir con ustedes una vez más este camino de la ciencia. Espero que sigamos creciendo juntos.

Quiero agradecer a todos los miembros del semillero de Epigenética, porque siempre estuvieron dispuestos a ayudar y participar en este trabajo. A todos los sujetos de investigación que formaron parte de estudio, que siempre se mostraron interesados en colaborar y que se tomaron el tiempo de enseñarme y aclararme términos que desconocía asociados con estos dispositivos.

El trabajo en equipo es el secreto que hace que gente común consiga resultados poco comunes -

Ifeanyi Onuoha

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

Resumen

Actualmente se ha incrementado la comercialización de los cigarrillos electrónicos como una alternativa segura frente al tabaquismo, lo que se asociado con un mayor uso de estos dispositivos especialmente entre los jóvenes y fumadores que están interesados en cesar el consumo del cigarrillo convencional. Dado el incremento del uso de este tipo de productos, existe la necesidad de determinar las consecuencias que tiene el uso de cigarrillos electrónicos en la salud humana, especialmente porque muchos de los compuestos contenidos en el aerosol y líquido de este tipo de dispositivos tienen un alto potencial genotóxico y las concentraciones de exposición a estos compuestos, normalmente exceden los límites establecidos como seguros. Este trabajo tiene por objetivo evaluar los niveles de genotoxicidad y los patrones de metilación del ADN asociados a la exposición a Cigarrillo Electrónico. En este proyecto se analizaron 72 muestras de sangre periférica provenientes de una población de vapeadores (n=32) , controles (n=32) y fumadores (n=8), en las cuales se determinaron las frecuencias de genotoxicidad por medio del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN). Para determinar el estado de metilación global, se evaluaron los patrones de metilación de los elementos repetitivos *LINE-1* mediante la prueba cuantitativa específica de metilación (qMSP) y RT-qPCR. Adicionalmente, se establecieron asociaciones entre las variables demográficas, de consumo y el biomarcador sérico de cotinina con los porcentajes de genotoxicidad y cambios en la metilación del ADN. Aquí demostramos que existe un aumento en los niveles de genotoxicidad asociados con el uso de los dispositivos electrónicos y que producto de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos se generan alteraciones epigenéticas importantes, especialmente aquellas relacionadas con la pérdida de metilación de los elementos *LINE-1*.

Este trabajo destaca la importancia de estudiar el impacto biológico del vapeo y proporciona evidencia científica que demuestra que estos dispositivos no son del todo inocuos y que pese a su diversidad de características presentan potenciales riesgos para la salud.

Palabras clave: Cigarrillos electrónicos, Vapeo, Micronúcleos, Genotoxicidad, Metilación del ADN, *LINE-1*

Abstract

Currently, the marketing of electronic cigarettes as a safe alternative to smoking has increased, which associates with a use increase of these devices, especially among young people and smokers who are interested in consumption cessation of conventional cigarettes. Given the increased use of this type of product, there is a need to determine the consequences of electronic cigarettes on human health, especially since many of the compounds contained in the aerosol and liquid of these devices have a high genotoxic potential and even the exposure concentrations to these compounds typically exceed established safe limits. The aim of this work is to evaluate the levels of genotoxicity and the patterns of DNA methylation associated with exposure to electronic cigarettes. In this project, 72 peripheral blood samples from a population of vapers (n=32), controls (n=32) and smokers (n=8) were analyzed, in which the frequencies of micronuclei (MN) and genotoxicity were determined, methylation patterns of LINE-1 repetitive elements were evaluated by Quantitative Methylation-Specific PCR (qMSP) and RT-qPCR to determine the global methylation status. Additionally, associations were established between demographic variables, consumption, and the serum biomarker of cotinine with the percentages of genotoxicity and changes in the level of methylation. Here we demonstrate that there is an increase in the levels of genotoxicity associated with the use of electronic cigarettes and that important epigenetic alterations are generated due to electronic cigarettes aerosol exposure, especially those related to the loss of methylation of the LINE-1-elements.

This work highlights the importance of assess the biological impact of vaping and provides scientific evidence that shows that these devices are not entirely innocuous and that despite their diversity of characteristics they might represent health risks.

Keywords: Electronic cigarettes, Vaping, Micronuclei, Genotoxicity, DNA methylation, LINE-1

Tabla de Contenido

Resumen.....	7
Abstract.....	8
1. Introducción.....	13
2. Justificación y planteamiento del problema.....	14
3. Marco Teórico.....	16
3.1 Cigarrillos electrónicos.....	16
3.1.1 Componentes químicos del aerosol y líquido de los cigarrillos electrónicos.....	16
3.1.2 Panorama mundial y nacional del uso de los cigarrillos electrónicos.....	19
3.1.3 Políticas asociadas a la regulación del uso de los cigarrillos electrónicos.....	20
3.1.4 Lesión pulmonar asociada al cigarrillo electrónico (EVALI).....	20
3.2 Genotoxicidad.....	21
3.2.1 Mecanismos de genotoxicidad.....	21
3.2.2 Ensayo de Micronúcleos.....	22
3.3 Epigenética.....	23
3.3.1 Metilación del ADN.....	23
3.4 LINE-1.....	24
3.5 Efectos genéticos y epigenéticos del uso de cigarrillos electrónicos.....	25
4. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo General.....	27
4.2 Objetivos Específicos.....	27
5. Metodología.....	28
5.1 Recolección de muestras y datos provenientes de Sujetos de Investigación.....	28
5.2 Medición de Cotinina sérica.....	29
5.3 Ensayo de Micronúcleos.....	30
5.4 Extracción de ADN genómico.....	31
5.5 Prueba cuantitativa específica de metilación (qMSP) de <i>LINE-1</i>	31
5.6 Análisis estadístico.....	32
6. Resultados.....	34
6.1 Características de la población de estudio.....	34
6.2 Evaluación de cotinina sérica como una aproximación para determinar el estado de exposición a la nicotina.....	35
6.3 Validación del ensayo CBMN en linfocitos aislados de sangre periférica de controles, vapeadores y fumadores.....	36
6.4 El incremento en la frecuencia de genotoxicidad se asocia con el uso de dispositivos electrónicos SEAN.....	39
6.5 Diferencias entre la frecuencia de genotoxicidad relacionada con el hábito de fumar y vapear.....	40
6.6 Análisis de las variables de consumo y la frecuencia de Genotoxicidad.....	41

6.7	Análisis de factores determinantes para presentar alta genotoxicidad.....	43
6.8	Relación entre los niveles de genotoxicidad respecto al número de caladas y niveles de cotinina.....	44
6.9	Efecto de la exposición al uso de cigarrillos electrónicos en los niveles de metilación de <i>LINE-1</i>	44
6.10	Diferencias en los niveles de metilación de <i>LINE-1</i> relacionadas con el hábito de fumar y vapear.	46
6.11	Análisis de las variables de consumo y los niveles de metilación de <i>LINE-1</i>	46
6.12	Variables que incrementan el riesgo de presentar bajos niveles de metilación de <i>LINE-1</i> ...	48
6.13	Asociación entre los niveles de metilación de <i>LINE-1</i> y los niveles de cotinina.....	49
7.	Discusión.....	49
8.	Conclusiones.....	56
9.	Perspectivas y recomendaciones.....	57
10.	Bibliografía.....	58

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Termino
MNi	Micronuclei
NBUDs	Nuclear buds
NPBs	Nucleoplasmic bridges
SEAN	Sistemas electrónicos de administración de nicotina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus assay
qMSP	Quantitative Methylation-Specific PCR
LINE-1	Long Interspersed Elements -1
SEAN	Sistemas electrónicos de administración de nicotina
SSSC	Sistemas electrónicos de administración sin nicotina
CE	Cigarrillos electrónicos
PG	Propilenglicol
NAET	Nitrosaminas específicas del tabaco
COV	Compuestos orgánicos volátiles
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
GRAS	Generally recognized as safe
FDA	Food and Drug Administration
EVALI	E-cigarette or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury
DAD	Daño alveolar difuso
EROs	Especies reactivas de oxígeno
8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina
DNMTs	DNA Methyltransferases
SAM	S-adenosil metionina
ENTJ	Encuesta Nacional de Tabaquismo en Jóvenes
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
DSBs	Double strand breaks

Índice de Figuras

Figura 1. Medición de cotinina sérica.....	36
Figura 2. Hallazgos frecuentes en el ensayo CBMN en linfocitos aislados de sangre periférica.....	37
Figura 3. Efecto del DEB en la inducción de MN, NBUDs y NPBs en linfocitos aislados de sangre periférica.....	38
Figura 4. Frecuencia de MN y genotoxicidad en linfocitos aislados de controles y vapeadores.....	39
Figura 5. Frecuencia de MN y genotoxicidad en fumadores y vapeadores.....	41
Figura 6. Análisis de la frecuencia de genotoxicidad de acuerdo con las variables categóricas asociadas al consumo.....	43
Figura 7. Análisis de regresión lineal de los niveles de genotoxicidad.....	44
Figura 8. Niveles de metilación de LINE-1 en sujetos de investigación vapeadores y no vapeadores.....	45
Figura 9. Niveles de metilación de LINE-1 en fumadores y vapeadores.....	46
Figura 10. Análisis de niveles de metilación de LINE-1 de acuerdo con las variables categóricas asociadas al consumo.....	48
Figura 11. Correlación Spearman entre los niveles de metilación de <i>LINE-1</i> y los niveles de cotinina sérica.....	49

Índice de Tablas.

Tabla 1. Secuencia cebadores implementados en el estudio.....	32
Tabla 2. Características de la población asociadas a variables clínicas y de consumo.....	34
Tabla 3. Variables asociadas al consumo en Vapeadores.....	35
Tabla 4. Conteo total de parámetros del ensayo de CBMN en controles, vapeadores y fumadores.....	40
Tabla 5. Definición de variables categóricas asociadas al consumo de los cigarrillos electrónicos.....	42
Tabla 6. Análisis de regresión logística bivariada de factores determinantes para presentar altos niveles de Genotoxicidad.....	43
Tabla 7. Análisis de regresión logística bivariada de factores determinantes para presentar bajos niveles de metilación de <i>LINE-1</i>	49

1. Introducción

Actualmente se ha demostrado que fumar tabaco es un factor de riesgo importante para la salud humana, especialmente, porque su consumo se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas respiratorias, problemas cardiovasculares y cáncer. El consumo de tabaco es una emergencia a nivel de salud pública y por lo tanto existe una necesidad apremiante de contar con nuevas alternativas para abordar este problema. Con base de un enfoque de reducción de daños, en el que se ha priorizado minimizar al máximo los efectos nocivos de fumar, los cigarrillos electrónicos fueron vistos como una posible alternativa frente a los cigarrillos convencionales (1,2).

La versión moderna de los cigarrillos electrónicos fue presentada por Hon Link en el 2003, y desde entonces se ha convertido en una nueva industria en el mercado mundial (3). La popularidad de los cigarrillos electrónicos ha crecido con rapidez especialmente dentro de la población joven, en la que existe la connotación cultural de que estos dispositivos son una alternativa inocua frente a los cigarrillos de tabaco.

Los cigarrillos electrónicos se definen como un conjunto de dispositivos que producen aerosol a partir del calentamiento de un líquido que normalmente contiene solventes, saborizantes o nicotina (4). Como componentes de estos dispositivos, se han descrito aproximadamente 87 compuestos químicos en el líquido, cartuchos precargados y aerosol, dentro de los que se incluyen a la nicotina (sustancia tóxica altamente adictiva), propilenglicol, glicerol, aldehídos, metales, compuestos orgánicos volátiles, compuestos fenólicos y diferentes saborizantes (5). A pesar de que se ha evaluado la seguridad de muchos de los componentes como los saborizantes en la industria alimentaria, sus efectos cuando ingresan al torrente sanguíneo a través de las vías respiratorias son menos conocidos, lo mismo ocurre con los efectos tras inhalar solventes como el propilenglicol y el glicerol en forma de aerosol (6). Otra de las preocupaciones radica en cuanto a los productos secundarios generados tras el calentamiento a altas temperaturas de estos compuestos, ya que pueden resultar en sustancias potencialmente tóxicas e irritantes (5).

Evaluar los efectos de las exposiciones ambientales en la salud humana es un objetivo importante en la investigación básica y clínica (7). La exposición a diferentes sustancias tóxicas generan múltiples alteraciones cromosómicas y daños en el ADN (8). Sin embargo, existe evidencia científica que propone que la influencia del medio ambiente va más allá de la

interacción con la secuencia del ADN. Las modificaciones epigenéticas por su parte, proporcionan un vínculo entre el medio ambiente y las alteraciones en la expresión génica que podrían conducir a fenotipos de enfermedades (9). El efecto del tabaquismo sobre el epigenoma está ampliamente descrito en humanos y se ha asociado primordialmente con la reducción en la metilación global del ADN (10).

Pese a que los dispositivos electrónicos contienen cantidades limitadas de los componentes de los cigarrillos convencionales, el aerosol inhalado puede ser perjudicial para la salud de los usuarios. Diferentes estudios en modelos animales y de líneas celulares sugieren que estos dispositivos generan alteración del transcriptoma y aumentan la probabilidad de desarrollar enfermedades respiratorias crónicas similares a las de los cigarrillos de tabaco (1,5).

A la fecha, se tiene muy poco conocimiento respecto a la relación del uso de los Cigarrillos electrónicos y el impacto genético y epigenético que estos puedan tener. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de genotoxicidad y los patrones de metilación del ADN asociados a la exposición a Cigarrillo Electrónico.

2. Justificación y planteamiento del problema

Durante la última década, se ha incrementado la comercialización de los cigarrillos electrónicos como una alternativa “segura” frente al tabaquismo, lo que se asocia con un mayor uso de estos dispositivos especialmente entre los jóvenes y fumadores que están interesados en cesar el consumo del cigarrillo convencional (11). Estos dispositivos electrónicos, se definen como dispositivos generadores de aerosoles a partir de soluciones líquidas que pueden ser altamente variables y poco estandarizadas en su composición. Adicionalmente, estos dispositivos cambian sus características de acuerdo con la marca comercial. En 2014, se identificaron más de 460 marcas de cigarrillos electrónicos. Los dispositivos pueden ir desde sistemas cerrados similares a los cigarrillos convencionales, hasta cigarrillos electrónicos de generación avanzada como dispositivos recargables similares a bolígrafos, con tanques, cartuchos y mods (12).

Junto con la creciente popularidad de estos dispositivos, el uso de los cigarrillos electrónicos ha sido muy debatido, la principal controversia parte de la premisa de que los cigarrillos electrónicos pueden servir como una terapia de reemplazo, ya que al realizar un balance de riesgo-beneficio los cigarrillos electrónicos pueden ser una opción efectiva para poder abandonar el hábito de fumar; además, que estos dispositivos electrónicos contienen niveles más bajos de agentes tóxicos en comparación con los presentes durante la combustión del

tabaco(12). Si bien el vapor del cigarrillo electrónico tiene menos componentes peligrosos que el humo del cigarrillo, no es totalmente benigno. A pesar de esto, los jóvenes asumen que estos dispositivos son inocuos y no generan daño, lo que incrementa probabilidad de incursionar y posteriormente llevar al abuso de los dispositivos en esta población (12). Lo que resulta realmente preocupante, es que cada vez más los cigarrillos electrónicos son utilizados sin que se conozcan del todo sus efectos en la salud humana.

Las cifras de la Encuesta Nacional de Tabaquismo en Jóvenes (ENTJ) y del III Estudio Epidemiológico Andino sobre Consumo de Drogas en la Población Universitaria reflejan el consumo preocupante de los cigarrillos electrónicos, la prevalencia de uso de alguna vez en la vida de cigarrillos electrónicos entre los universitarios fue del 16,1% para países como Colombia. Por otra parte, el mismo informe reportó que el consumo de cigarrillo convencional entre los jóvenes es el mismo del cigarrillo electrónico, con un 9% de prevalencia (13). Esta alerta debe ser tomada en serio, considerando las implicaciones en el desarrollo de la salud física, cognitiva y conductual de esta población.

Los cigarrillos electrónicos han sido el producto de tabaco más utilizado por los jóvenes en los Estados Unidos (14). Entre los estudiantes de secundaria, el uso de los cigarrillos electrónicos aumentó de 220,000 estudiantes en 2011 a 3,05 millones de estudiantes en 2018 (15) Según la Organización Mundial de la Salud, cada vez más hay pruebas de que el uso de estos dispositivos podría causar daño pulmonar (16). El 17 de septiembre de 2019, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) activaron una investigación de emergencia sobre los vínculos entre los cigarrillos electrónicos y vaporizadores y las lesiones y muertes pulmonares. Para el 10 de diciembre de 2019, Estado Unidos notificó más de 2409 casos de pacientes hospitalizados y 52 muertes confirmadas (17,18).

En la actualidad, existe poca evidencia experimental que demuestre el impacto biológico del uso de los cigarrillos electrónicos, sin embargo, se puede predecir un impacto importante a partir de los antecedentes reportados para la exposición a tabaco (19). A nivel genómico se ha determinado que la exposición al humo de cigarrillo convencional, solventes orgánicos y tóxicos generan alteraciones citogenéticas (20). Se ha descrito que el hábito del tabaquismo tiene efectos duraderos en la metilación del ADN, especialmente muchos de estos estudios muestran niveles de hipometilación en fumadores comparados con sujetos no fumadores (21). Estos antecedentes permitieron plantear la pregunta de investigación: ¿Cuáles son los efectos genéticos y epigenéticos asociados al uso de los cigarrillos electrónicos?

Identificar si producto de la exposición al aerosol de los dispositivos electrónicos se generan cambios tanto en la metilación del ADN y se incrementa la frecuencia de daños a nivel del material genético, podría representar un hito importante en la evaluación y prevención de riesgos del uso de estos dispositivos. La ejecución de este trabajo puede aportar información importante del impacto de la práctica de vapear a nivel genético y epigenético en población colombiana. Además, de aportar al nuevo conocimiento en este campo, este trabajo constituiría una prueba científica que puede ser incluso socializada para crear concientización respecto al uso, regulación y estandarización de estos dispositivos.

3. Marco Teórico.

3.1 Cigarrillos electrónicos

Los cigarrillos electrónicos (CE) reúnen a un diverso grupo de dispositivos que se caracterizan por producir un aerosol tras el calentamiento de un líquido que habitualmente contiene solventes, saborizantes que pueden contener o no nicotina y otros aditivos para ser inhalados por el usuario. Los cigarrillos electrónicos a diferencia de los cigarrillos convencionales, no contienen tabaco, no generan humo y no dependen de la combustión para funcionar (4). Estos dispositivos electrónicos pueden recibir diversos nombres como: “*e-cigarettes*” “*e-cigs*” “narguiles electrónicos” “*e-hookahs*” “*mods*” “plumas de vapor” “vapeadores” “sistemas de tanque” “Sistemas electrónicos de administración de nicotina (SEAN) o sin nicotina (SSSC)” (22). Pese a la variedad de presentaciones, diseño y complejidad, los cigarrillos electrónicos poseen tres componentes principales: una batería o fuente de alimentación, un elemento calefactor y un cartucho o sistema de depósito para contener el líquido (23).

Los cigarrillos electrónicos se clasifican comúnmente en cuatro generaciones, la primera de ellas corresponde a dispositivos similares a los cigarrillos convencionales, que se caracterizan por ser desechables y presentar baterías de baja tensión. La segunda generación, incluye dispositivos con baterías recargables de alta capacidad y tanques separados del sistema. La tercera generación corresponde a los dispositivos denominados como tipo “*mods*” o modificables, permitiéndole al usuario personalizar aspectos como la temperatura y el voltaje. Finalmente, los dispositivos de cuarta generación que incluyen a los llamados “*Pod mods*” que corresponden a un cartucho precargado o recargable (5).

3.1.1 Componentes químicos del aerosol y líquido de los cigarrillos electrónicos

Los estudios cuantitativos y cualitativos han identificado en promedio 87 (60-113) compuestos químicos en los cartuchos, líquidos y aerosol de los cigarrillos electrónicos (5,6). Los principales compuestos incluyen a la nicotina, algunos solventes, nitrosaminas específicas del

tabaco (NAET), aldehídos, metales, compuestos orgánicos volátiles (COV), compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), saborizantes y alcaloides menores del tabaco (5).

El líquido de los cigarrillos electrónicos está conformado principalmente por humectantes o solventes, siendo el propilenglicol (PG) y el glicerol los más utilizados. El PG es implementado por la industria química, alimentaria y farmacéutica para mantener la humedad en ciertos medicamentos, cosméticos y alimentos o como solvente para colorantes y saborizantes (6). De la misma forma, el glicerol se utiliza en productos alimenticios, suplementos nutricionales, productos farmacéuticos y productos de cuidado personal. Tanto el PG como el glicerol fueron clasificados como generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (24). Sin embargo, las sustancias GRAS son seguras para la ingestión o preparaciones tópicas, pero no necesariamente para otras vías de administración como la inhalación. Inclusive, se ha descrito que estos solventes sufren un proceso de descomposición parcial cuando entran en contacto con la bobina de calentamiento del atomizador de los cigarrillos electrónicos y producen compuestos volátiles como el formaldehído, acetaldehído y la acroleína (25).

Otros de los componentes particulares de estos líquidos corresponden a los saborizantes, especialmente, porque para los consumidores resulta más atractivo su uso y se considera como una de las razones principales para emplear cigarrillos electrónicos (26). Actualmente, se conocen más de 7000 saborizantes comercializados para estos dispositivos, muchos de los cuales se generan a partir de compuestos químicos como alcoholes, ácidos, ésteres, lactonas, aldehídos, cetonas, heterociclos y mercaptanos (5,27). Productos químicos como el diacetilo, la 2,3-pentanediona y la acetoína se utilizan en la fabricación de saborizantes a mantequilla, caramelo, piña colada y fresa, muchos de estos se implementan comúnmente en los cartuchos y líquidos de cigarrillos electrónicos. El uso de estos saborizantes tomó relevancia cuando se asociaron con alteraciones de las vías respiratorias en trabajadores de plantas de fabricación de palomitas de maíz para microondas, los cuales al inhalar estos compuestos desarrollaron enfermedades como bronquitis, asma y bronquiolitis obliterante o también denominada "*Popcorn lung*" (28).

El cinamaldehído es el principal químico usado para saborizantes de canela, dulces y frutales. Algunas investigaciones, han asociado al cinamaldehído presente en los líquidos y aerosoles de recarga de los cigarrillos electrónicos con alteraciones en la homeostasis de modelos de

líneas celulares pulmonares, revelando efectos tanto citotóxicos como genotóxicos (5,29). El benzaldehído, que da un sabor frutal a cereza, es un aldehído aromático utilizado en alimentos y cosméticos, que puede estar presente en el 75% de los líquidos de los cigarrillos electrónicos con este sabor (30). Investigaciones asociadas a la exposición ocupacional al benzaldehído, han demostrado que este compuesto genera irritación en ojos y membranas mucosas de las vías respiratorias (31). Los sacáridos que se utilizan para crear los sabores dulces han demostrado que al calentarse producen compuestos secundarios como furanos y aldehídos (32). En general, muchos de los compuestos químicos que son dañinos para la salud son generados durante el proceso de aerosolización. Además, se han caracterizado 18 compuestos adicionales en aerosol que no se observan en el líquido de estos dispositivos (5,6,33).

Otros estudios han encontrado metales como níquel (Ni) y cromo (Cr) en el aerosol y líquido de los cigarrillos electrónicos (5,6). El origen de estos metales se vincula con la estructura y algunas partes específicas de los dispositivos. Por lo general, una bobina metálica (aleación de Ni-Cr) se calienta a altas temperaturas para que el líquido sea aerosolizado. Recientemente se ha demostrado que las concentraciones de estos metales en el aerosol y líquido aumentan después de que los metales son transferidos al entrar en contacto con la bobina e incluso se han identificado biomarcadores de estos metales en muestras de orina y saliva de los usuarios de estos dispositivos (34). La exposición a este tipo de metales a través del uso de los cigarrillos electrónicos es relevante ya que estos compuestos pueden causar efectos en la salud, principalmente porque son considerados como agentes tóxicos y cancerígenos (35,36).

La mayoría de estos dispositivos cuenta con una concentración de nicotina variable, de acuerdo con las características específicas del fabricante. En los cigarrillos electrónicos, la nicotina se libera del líquido en partículas de aerosol o se volatiliza a nicotina en fase gaseosa, que luego es inhalada por los usuarios. La nicotina es un alcaloide producto del tabaco, que corresponde a una molécula de amina terciaria que tiene anillos de pirrolidina y piridina. Esta se une selectivamente a los receptores nicotínicos-colinérgicos presentes en el cerebro, uniones neuromusculares, médula suprarrenal y ganglios (37). Este compuesto se difunde a través de los pulmones hacia la circulación y finalmente va al cerebro, así pues, la (S)-nicotina (la forma predominante de la nicotina) va al centro de recompensa en el sistema límbico y tiene un efecto estimulante en la corteza, liberando dopamina en la corteza frontal, el área mesolímbica y el cuerpo estriado; lo que se correlaciona con una sensación y experiencia placentera para los usuarios y confiere el carácter de altamente adictiva (20) Los efectos de la nicotina en la salud están ampliamente descritos, especialmente como producto de la inhalación a través del humo

de cigarrillos convencionales y se relacionan con enfermedades cardiovasculares y cáncer en los fumadores (6,38). Sin embargo, aún se desconocen muchos de los efectos específicos que pueda tener en la salud cuando se administra en forma de aerosol en comparación con un componente del humo quemado.

Como se ha evidenciado, aunque el principal alcaloide que se encuentra en la mayoría de los líquidos y aerosoles de los cigarrillos electrónicos es la nicotina, se han identificado varios alcaloides menores del tabaco que incluyen: nornicotina, anatabina, anabasina, cotinina, la óxido-N-nicotina, miosmina, β -nicotirina y β -nornicotirina. Estos alcaloides menores pueden estar asociados con impurezas durante algunos procesos biosintéticos o por oxidación durante el procesamiento del tabaco (39).

Eventualmente, la mayoría de los cigarrillos electrónicos, emiten un gran número de sustancias potencialmente tóxicas que pueden causar daño y representar un alto riesgo para la salud. Es importante destacar que, debido a las diferencias en la fabricación, características específicas de los productos y factores modificables como el voltaje y la temperatura, se genera una alta variabilidad de sustancias y concentraciones de estas, tanto en el líquido como en el aerosol de estos dispositivos.

3.1.2 Panorama mundial y nacional del uso de los cigarrillos electrónicos

Los cigarrillos electrónicos han sido el producto de tabaco más utilizado por los jóvenes en los Estados Unidos desde el 2014. Entre los estudiantes de secundaria, el uso de los cigarrillos electrónicos aumentó de 1,5% (220,000 estudiantes) en 2011 a 20,8% (3,05 millones de estudiantes) en 2018 (15). Por el contrario, para la población adulta en 2017, se informó que 2,8% de los adultos estadounidenses reportaron ser usuarios de estos dispositivos. Adicionalmente, se estableció que el 29,8% de esta población habían sido fumadores de cigarrillos regulares, 58,8% eran fumadores de cigarrillos convencionales y el 11,4% nunca habían sido fumadores de cigarrillos regulares (40). La población adulta mayor de 45 años pertenecía a fumadores o exfumadores de cigarrillos convencionales de tabaco, y por el contrario la población joven de 18 a 24 años reportaba nunca haber sido fumadores de cigarrillo convencional. Estos datos soportan la premisa de que la población adulta incursiona en el uso de estos dispositivos electrónicos para tener una alternativa de reemplazo con el fin de dejar de fumar y por contrario la población joven en su mayoría presenta diversas razones de uso como: porque un amigo o familiar lo uso, la variedad de sabores disponibles, la falsa percepción de seguridad frente a los cigarrillos de tabaco y curiosidad por los dispositivos (40).

Las cifras del III Estudio Epidemiológico Andino sobre Consumo de Drogas en la Población Universitaria, también mostraron un consumo preocupante de los cigarrillos electrónicos en población escolar y universitaria. La prevalencia de uso de los cigarrillos electrónicos entre los universitarios de los cuatro países andinos fue de 27,4% en Ecuador, 16,1% (~1.568 usuarios) en Colombia, 12,8% en Bolivia y 12,5% en Perú. En Colombia, el 16,6% de los estudiantes han usado cigarrillos electrónicos alguna vez en la vida, de los cuales la mayoría son hombres. La prevalencia es de 19,6 entre aquellos que tienen 18 años o menos, seguida por 19% en el grupo etario de 19 a 20 años. Finalmente, la menor prevalencia de consumo de cigarrillos electrónicos se registra entre los universitarios del grupo etario de 25 años y más, con 9,5%. (13).

3.1.3 Políticas asociadas a la regulación del uso de los cigarrillos electrónicos.

Alrededor de la regulación del uso de los dispositivos electrónicos, la FDA, que es la entidad encargada de la regulación de los productos que contienen tabaco y nicotina, emitió una propuesta para incluir a los cigarrillos electrónicos bajo la ley de Prevención del Tabaquismo Familiar y Control del Tabaco, en el que se consideraron aspectos como la diversidad de ingredientes, las características del producto y los riesgos para la salud, así como su atractivo para los menores y los no usuarios de cigarrillo convencional (41). La FDA también prohíbe el acceso de este tipo de dispositivos a menores edad. Actualmente, debido a que alrededor de este tipo de dispositivos se utiliza una terminología diversa y no estandarizada, sus componentes son altamente divergentes y su uso varía dependiendo de las preferencias del usuario. Esta falta de estandarización presenta un desafío para la vigilancia y control de estos productos (42).

3.1.4 Lesión pulmonar asociada al cigarrillo electrónico (EVALI)

Desde la introducción en el mercado de estos dispositivos, se ha postulado que la inhalación de partículas y compuestos químicos producidos por el proceso de aerosolización de los cigarrillos electrónicos podrían afectar directamente la función pulmonar. En 2019, el departamento de Salud pública de Illinois y el Departamento de servicios de salud de Wisconsin emprendieron una investigación tras recibir informes de 142 casos de lesiones pulmonares que ocurrieron asociadas al uso de los cigarrillos electrónicos, producto de esta colaboración se denominó a estas presentaciones clínicas como “EVALI” (43). Estas lesiones pulmonares agudas, pueden tener diferentes hallazgos patológicos que incluyen: neumonía organizada fibrinosa aguda y daño alveolar difuso (DAD). Las diferentes presentaciones clínicas pueden ir desde una neumonía eosinofílica aguda, neumonía lipoidea y enfermedad

intersticial con bronquiolitis; estas diferencias en la presentación clínica pueden variar de acuerdo con si los usuarios presentaban una enfermedad pulmonar subyacente, la respuesta inmune del huésped y el tipo de material o compuesto inhalado (17,43). Durante el 2019, se reportaron un total de 2051 casos de EVALI y 39 muertes en los Estados Unidos (17).

3.2 Genotoxicidad

La genotoxicidad es un término utilizado en genética para describir la capacidad de una sustancia química de ocasionar daños sobre el material genético (ADN, ARN), afectando así la integridad celular (44). Todas las sustancias químicas que causan daños en la secuencia de ADN o la estructura cromosómica y que conducen a mutaciones se describen como genotóxicas. Este daño en el ADN puede ser directo o indirecto en forma de roturas de una o dos hebras, pérdida de la reparación por escisión de bases, entrecruzamiento, sitios lábiles a los álcalis, mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (45).

El daño del material genético de las células somáticas induce la patogénesis de enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, la arterosclerosis y las enfermedades del corazón, que son las principales causas de muerte en la población humana (46). Por otra parte, el daño genético de las células germinales puede conducir a mutaciones hereditarias potencialmente relacionadas con defectos congénitos (45).

3.2.1 Mecanismos de genotoxicidad

El daño al material genético es causado por las interacciones de la sustancia genotóxica con la estructura y secuencia del ADN. Estas sustancias genotóxicas interactúan en una ubicación específica o secuencia de bases de la estructura del ADN y causan lesiones, roturas, fusiones, deleciones, mala segregación o falta de disyunción que conducen a daños y mutaciones (45). Dentro de los agentes genotóxicos más comunes, se encuentran las especies electrofílicas que forman aductos covalentes al ADN, radiaciones ultravioleta e ionizantes, análogos de nucleósidos, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la síntesis de proteínas y las especies reactivas de oxígeno (EROs) (45). Estas últimas causan estrés oxidativo, que altera la proliferación celular, el metabolismo y en consecuencia se ha consolidado su asociación con una amplia variedad de enfermedades; las EROs son genotóxicas por naturaleza dado que causan lesiones oxidativas con alta capacidad mutagénica, siendo la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) la más abundante en el ADN (45).

En diversos estudios se ha demostrado que los usuarios de cigarrillos electrónicos pueden estar expuestos a EROs, principalmente provenientes del elemento calefactor del cigarrillo

electrónico, el aerosol de los dispositivos y la batería compuesta de iones de litio (6,47). Por lo cual, el consumo podría asociarse con un riesgo de genotoxicidad, sin embargo, a la fecha se requieren de más estudios y evidencias que permitan estimar de manera concreta las propiedades genotóxicas del cigarrillo electrónico.

3.2.2 Ensayo de Micronúcleos

El ensayo citogenético para la identificación de micronúcleos, es una técnica reconocida para evaluar los niveles de daño en el ADN mediante pruebas de genotoxicidad *in vitro* con el objetivo de realizar biomonitorización de la exposición a diferentes agentes genotóxicos (48). Los micronúcleos (MN) se originan a partir de fragmentos acéntricos o cromosomas completos que se retrasan durante la anafase y no logran segregarse a los polos opuestos de la célula durante la mitosis. Estos MN rezagados se excluyen de los núcleos de las células hijas y se envuelven en su propia membrana nuclear (48,49). Existen dos mecanismos para la formación de los MNs, el primero de ellos son las roturas cromosómicas o clastogénesis y el segundo corresponde a la interrupción del aparato mitótico o aneugénesis (50). Una variante del ensayo de micronúcleos conocida como ensayo de citoma con bloqueo de la citocinesis (CBMN), es el método predilecto para identificar MNs en células humanas, principalmente células como los linfocitos que pueden ser estimuladas para dividirse *ex vivo* a través del uso compuestos con actividad mitogénica (51). La base de este ensayo tiene como principio el uso de la Citocalasina-B, un metabolito obtenido del hongo *Drechslera dematioidea*, el cual inhibe la tasa de polimerización de actina durante el final de la telofase y por ende bloquea la citocinesis celular sin causar daño en el ADN. En consecuencia, los linfocitos tras finalizar el ciclo celular se van a visualizar como células binucleadas (50). El ensayo de CBMN, también permite la identificación de otros biomarcadores de genotoxicidad como los puentes nucleoplasmáticos (NPB) y las yemas nucleares (NBUD). Los NPBs se originan a partir de cromosomas dicéntricos causados por las fusiones de telómeros, alteraciones en los mecanismos de reparación de roturas de ADN o fallo de la separación de cromátides. Cada uno de los centrómeros de los cromosomas dicéntricos son segregados a los polos opuestos de la célula durante la anafase lo que permite evidenciar la morfología característica de los NPBs. Asimismo, debido a que en las células binucleadas no se genera la rotura de este puente anafásico, la membrana nuclear que rodea a los núcleos también recubre al puente anafásico (52). Las NBUDs, son otro indicador de inestabilidad cromosómica ya que son un mecanismo a través del cual los núcleos eliminan genes amplificados y complejos de reparación de ADN (49). Los fragmentos de ADN amplificado tienden a localizarse selectivamente en la periferia

del núcleo y se eliminan a través de la brotación nuclear para formar NBUDs durante la fase S del ciclo celular. Estos genes amplificados a menudo corresponden a cromosomas dobles minutos (*double minutes*), caracterizados por ser pequeños fragmentos de ADN extra-cromosómico producto de amplificaciones génicas que no presentan regiones centroméricas ni teloméricas (53).

3.3 Epigenética

La epigenética es la ciencia encargada del estudio de las modificaciones heredables en la expresión génica que no alteran la secuencia de ADN, estos cambios ocurren a través de una serie de reacciones químicas en la estructura de la cromatina que afectan la actividad transcripcional. (54). Dentro de los mecanismos epigenéticos se reconocen la metilación de ADN, las modificaciones covalentes de histonas, los ARN no codificantes, los complejos remodeladores de la cromatina y las variantes de histonas (55). Estas marcas epigenéticas no son inducidas espontáneamente, se dan de manera programada por la célula o en respuesta a factores ambientales y hábitos, por lo cual se ha descrito un papel importante de la epigenética en el desarrollo de múltiples enfermedades (56).

3.3.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que consiste en la transferencia de un grupo metilo a la posición C5 de la citosina formando 5-metilcitosina (5mC) en regiones del ADN abundantes en dinucleótidos de citosina/guanina llamadas "islas CpG" (57). La metilación del ADN regula la expresión génica reclutando proteínas implicadas en la represión o inhibiendo la unión de factores de transcripción al ADN, por lo cual un gen hipermetilado se relaciona con una baja expresión génica y por el contrario un gen en un estado de hipometilación se considera transcripcionalmente activo. La metilación del ADN es catalizada por una familia de ADN metiltransferasas (DNMTs) que transfieren un grupo metilo a partir del metabolito S-adenosil metionina (SAM) al residuo de citosina para formar 5mC. La metilación del ADN es importante para mediar el silenciamiento de elementos retrotransponibles en el genoma, regular la expresión génica específica de tejido, procesos de *imprinting* genómico y fenómenos biológicos como la inactivación del cromosoma X. Por otra parte, se ha demostrado que la metilación del ADN puede ser determinada por características del sujeto y agentes ambientales externos como malnutrición, contaminación ambiental o el humo de cigarrillo (58).

3.4 LINE-1

Los elementos nucleares intercalados largos (LINE) son los únicos retrotransposones autónomos y activos que incluyen *LINE-1*, *LINE-2* y *LINE-3* en el genoma humano (59). Aproximadamente el 45% del genoma humano se compone de elementos transponibles (60), en particular, las secuencias repetidas de *LINE-1* (L1) constituyen alrededor del 17% del genoma total y están presentes en la mayoría de los cromosomas (61). Los elementos *LINE-1* tienen entre 6 - 7 kb de longitud y contiene una región 5' no traducida (5'-UTR), dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2) y un 3'-UTR con una cola poli-A (59). Aunque más del 99,9 % de los elementos *LINE-1* se han vuelto inactivos por truncamientos en 5', inversiones o mutaciones puntuales dentro de los dos ORF, la retrotransposición de *LINE-1* continúa diversificando los genomas humanos y su movimiento puede conducir a casos esporádicos de enfermedad (60).

Desde su descubrimiento original, se han dado aproximadamente 65 mutaciones que causan enfermedades en el hombre que se han atribuido a eventos de retrotransposición. La retrotransposición mediada por *LINE-1* puede actuar como mutágeno al alterar directamente los exones, de manera similar, las inserciones en intrones pueden inducir errores de empalme o saltos de exón, lo que genera alelos hipomórficos o de expresión nula. Finalmente, informes recientes sugieren que la endonucleasa L1 puede causar roturas de doble cadena, lo que en principio podría conducir a inestabilidad genómica. Adicionalmente, las inserciones de *LINE-1* pueden afectar la expresión génica por una variedad de mecanismos como la introducción de una poliadenilación prematura y/o sitios de pausa transcripcional de ARN polimerasa II en los genes, atenuando así su expresión. Finalmente, en raras ocasiones, las inserciones de L1 puede alterar los genes, lo que lleva a la generación de distintas unidades de transcripción a través de un fenómeno conocido como ruptura de genes (60).

Debido a su abundancia en el genoma humano, la metilación de las secuencias de *LINE-1* se ha utilizado como una aproximación al estado de metilación global del ADN (61). La hipometilación de las secuencias de *LINE-1* es una característica importante del cáncer acompañada de inestabilidad genómica y heterogeneidad genética, por lo tanto se ha convertido en un indicador de la aparición, desarrollo y mal pronóstico de muchas enfermedades (59).

La sobreexpresión de proteínas asociadas a la retrotransposición y el ARN de *LINE-1* están vinculados con procesos como la apoptosis, daño y reparación del ADN, plasticidad celular, respuesta al estrés celular y progresión tumoral (59).

3.5 Efectos genéticos y epigenéticos del uso de cigarrillos electrónicos

Como se mencionó anteriormente, los aerosoles generados por los cigarrillos electrónicos están compuestos por varios agentes potencialmente tóxicos que generan un aumento del estrés oxidativo, estados de inflamación (47) y cambios en los patrones de expresión génica (62,63). Por lo cual, es esencial determinar si la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos puede ser una fuente importante de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas (5).

Al respecto, en recientes estudios *in vitro* de células epiteliales pulmonares sanas y tumorales se evidenció la aparición de lesiones oxidativas y alquilantes del ADN, tras la exposición al aerosol del cigarrillo electrónico, de una manera dosis dependiente. Estos efectos nocivos fueron asociados a compuestos como el formaldehído y a las altas EROs encontradas en el aerosol (64). Si bien en otros modelos de estudio de células de ratón y humanas no se encontraron cambios significativos en la inducción de mutaciones (65), se debe tener en cuenta que los estudios *in vitro* miden la exposición aguda a los cigarrillos electrónicos, por lo cual los efectos de una exposición prolongada deben ser evaluados en futuras investigaciones (5). Es importante considerar que, si bien estos estudios analizan la capacidad mutagénica de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos, en la actualidad se ha estudiado poco acerca de las alteraciones sobre el epigenoma. El estudio del impacto epigenético podría brindar evidencia relevante acerca del efecto de estos dispositivos sobre el transcriptoma, dado que los mecanismos epigenéticos pueden verse alterados producto de diferentes exposiciones ambientales (65).

En un estudio realizado por Martin M, *et al.* se comparó la expresión de 597 genes relacionados con el sistema inmune en células epiteliales de la mucosa nasal de personas fumadoras, no fumadoras y usuarios de cigarrillos electrónicos. Producto de la exposición al humo de cigarrillo convencional se evidenció una disminución en la expresión de 53 genes, mientras que para los usuarios de cigarrillos electrónicos se demostró una expresión a la baja de 305. Dentro este último grupo, se destacan cinco genes que presentaron cambios significativos a nivel transcripcional: el gen que codifica para la proteína 16 con dominios de dedos de Zinc y dominio BTB (*ZBTB16*), la proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (*EGR1*), receptor de inmunoglobulina polimérica (*PIGR*), prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (*PTGS2*) y la

proteína de unión a FK506 (*FKBP5*). La mayoría de estos transcritos corresponden a factores de transcripción que a su vez regulan corriente abajo la expresión de genes asociados con el sistema inmune, tal es el caso del factor estimulante de colonias 1 (*CSF-1*), que codifica para una citoquina involucrada en la activación de la inmunidad innata en la respuesta a infecciones, *CSF-1* es diana del factor de transcripción *EGR1* y cuya expresión disminuyó significativamente en usuarios de cigarrillos electrónicos. Estos datos sugieren que el uso de cigarrillos electrónicos podría inducir estados de inmunosupresión asociados a la represión de genes involucrados con la respuesta inmune a nivel de la mucosa nasal, lo cual podría aumentar la susceptibilidad a distintas infecciones (66).

En modelos murinos (hembras BALB/c) expuestos al vapor de cigarrillo electrónico que se encontraba libre de nicotina y sin adición de saborizantes, se evidenciaron cambios a nivel del transcriptoma pulmonar de los ratones, encontrando alteraciones en la expresión de 37 genes, dentro de los cuales se destaca a *ARNTL*, *NPAS2*, *NR1D1*, *NR1D2*, *PER1*, *PER2* y *PER3*, quienes tienen un papel central en la regulación y maquinaria del reloj molecular circadiano (67). La disrupción del reloj circadiano a nivel del tejido pulmonar puede resultar en alteraciones anormales de la función respiratoria, la producción de una respuesta inflamatoria exacerbada, el incremento de EROs (que puede causar daños en el ADN) y la hipersecreción de moco, las cuales pueden contribuir en el desarrollo y avance de enfermedades como el asma y EPOC (68).

Asimismo, la exposición a los líquidos y aerosoles de los cigarrillos electrónicos con nicotina inducen la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo *GCLC*, *GPX2*, *NQO1* y *HO1* en células NHBE, correspondientes a células epiteliales bronquiales humanas (69). Por otro lado, la exposición a los vapores de cigarrillos electrónicos producen una desregulación en la expresión de más de 125 genes que codifican para miARNs, lo cual fue evidenciado por Solleti y colaboradores (69) por medio de técnicas como RNA-seq. Dichas alteraciones son causadas por los compuestos químicos presentes en los cigarrillos electrónicos, tales como el propilenglicol, glicerol y saborizantes, cuyos efectos se ven potenciados por la presencia de nicotina a distintas concentraciones (70).

4. Objetivos

4.1 Objetivo General.

Evaluar los niveles de genotoxicidad y los patrones de metilación asociados a la exposición a Cigarrillo Electrónico.

4.2 Objetivos Específicos.

- 4.2.1 Determinar el efecto genotóxico en linfocitos aislados de muestras de sangre periférica provenientes de usuarios de cigarrillos electrónicos.
- 4.2.2 Evaluar la presencia de alteraciones en los patrones de metilación del ADN de los elementos repetitivos *LINE-1* en usuarios de cigarrillos electrónicos.
- 4.2.3 Establecer asociaciones entre las variables demográficas, de consumo y biomarcadores séricos de metabolitos de la nicotina con los porcentajes de genotoxicidad y cambios a nivel de metilación del ADN.

5. Metodología

5.1 Recolección de muestras y datos provenientes de Sujetos de Investigación

El presente trabajo parte de un estudio de tipo transversal analítico. La población consistió en 72 sujetos de investigación voluntarios provenientes de la ciudad de Bogotá, los cuales se clasificaron en tres Grupos: Grupo 1: conformado por 32 usuarios de Cigarrillos electrónicos, dentro de los que se incluyen usuarios exclusivos de los dispositivos electrónicos y usuarios que alternan el uso de los dispositivos con el cigarrillo convencional, denominados a partir de ahora como “vapeadores mixtos”; Grupo 2: compuesto por 8 fumadores de cigarrillo convencional; y Grupo 3: correspondiente a la población control de 32 no fumadores y no vapeadores. Todos los grupos fueron pareados por edad (± 1 año) y sexo. Los criterios de inclusión y clasificación para cada uno de los participantes fueron los siguientes:

Grupo 1-Vapeadores: Se consideraron a todas aquellas personas que tuvieran un uso actual de los dispositivos electrónicos con una frecuencia de mínimo 1 vez por semana durante los últimos 6 meses. Se incluyó a cualquier usuario de cigarrillos electrónicos independientemente si el dispositivo usado tiene o no nicotina, saborizantes o sustancias psicoactivas adicionales como la marihuana.

Grupo 2-Fumadores: Conformado por todas aquellas personas que informaron haber consumido más de 100 cigarrillos en la vida, el último hace menos de 6 meses y que no emplearan ningún otro producto de tabaco o dispositivo electrónico.

Grupo 3-Controles: El grupo control consistió en personas que reportaban no ser usuarias de ningún producto de tabaco, dispositivos electrónicos, cigarrillo convencional, pipa, sustancias que contengan nicotina y sustancias psicoactivas o que, de ser el caso, el consumo se diera en un máximo de 5 veces en su vida con menos de 100 cigarrillos, menos de 5 sesiones de vapeo y sin consumo en los últimos 6 meses.

Como criterios de exclusión para todos los grupos se consideró el tener exposición previa a genotóxicos (metales pesados, fumigante, radiaciones, medicamentos de oncoterapia), padecer de enfermedades respiratorias crónicas como EPOC y cáncer, contar con un diagnóstico de síndromes de inestabilidad cromosómica y ser menor de 18 años.

El principal tipo de muestreo fue no probabilístico por bola de nieve, en el cual se le pide a los participantes de la investigación que ayuden a los investigadores a identificar otros sujetos potenciales (71). Durante la fase de muestreo, se les informo a cada uno de los participantes acerca de los objetivos de la investigación, los posibles riesgos durante la toma de muestra, la

protección de los datos personales y posterior autorización de estos mediante la firma del consentimiento informado.

A cada uno de los sujetos de investigación se le tomaron muestras de sangre periférica por la técnica de venopunción. Las muestras fueron recolectadas en: un tubo con anticoagulante EDTA para el aislamiento de ADN genómico, un tubo con anticoagulante de heparina sódica para la realización de cultivos de linfocitos y un tubo con gel separador para determinar biomarcadores séricos de metabolitos de la nicotina. Posteriormente, a cada uno de los participantes le fue realizada una encuesta en donde se evaluaron las variables demográficas, clínicas, comorbilidades y de consumo que competen para el estudio. Las respuestas fueron recolectadas en el programa REDCap (Research Electronic Data Capture), bajo la licencia otorgada a la Pontificia Universidad Javeriana, por su desarrollador original la Universidad de Vanderbilt (72,73). El uso de REDCap Javeriana garantiza además que los datos se mantienen en poder del investigador y se conservan físicamente en los servidores de la universidad.

Una vez recogida la información y las respectivas muestras, a cada sujeto se le asignó un código aleatorio para mantener la anonimidad a lo largo del estudio. Esta investigación se realizó bajo las disposiciones establecidas en la resolución N.º 008430 de 1993 del ministerio de Salud de Colombia y fue aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana (FM-CIE-0308-20).

5.2 Medición de Cotinina sérica

Con el fin de establecer un parámetro cuantificable del grado de exposición a la nicotina producto del uso de los cigarrillos electrónicos y cigarrillos convencionales, se evaluó la presencia de cotinina sérica de cada uno de los sujetos de investigación pertenecientes al grupo de vapeadores y fumadores. La cotinina (1-metil-2-(3-piridinil)-2pirrolidinona, C₁₀H₁₂N₂O) es un alcaloide producto del metabolismo de la nicotina (74), que se ha usado para distinguir a los fumadores de personas no fumadoras y fumadores de segunda mano, principalmente porque corresponde a un biomarcador que refleja el alcance de la exposición a tabaco (75). La exposición a la nicotina puede medirse cuantitativamente en los niveles de cotinina a partir de muestras de orina, sangre o saliva, y se usa especialmente porque presenta un tiempo de vida media de ~20 horas, siendo detectada incluso varios días posteriores a la exposición al humo de tabaco o aerosol de cigarrillo electrónico (76).

El suero se extrajo a partir de las muestras de sangre periférica obtenidas en el tubo con gel separador, provenientes de vapeadores y fumadores. Cada tubo fue centrifugado a 3500 rpm

durante 15 minutos y posteriormente se extrajo 2 mL de suero libre de hemólisis, el cual fue llevado a congelación (-20°C). Las muestras fueron remitidas a la entidad prestadora del servicio el Laboratorio de referencia COLCAN, para determinar el contenido de cotinina sérica mediante la técnica de quimioluminiscencia. Para definir las diferencias en los niveles de cotinina entre cada uno de los grupos, se estableció como valor de referencia a una persona no expuesta con un resultado de hasta 8 ng/mL y expuesta mayor a 16 ng/mL. Estos valores fueron parametrizados de acuerdo con los criterios de la CDC para biomonitoreo de Cotinina (No. 486-56-6) (77) y los valores de referencia establecidos por el laboratorio COLCAN.

5.3 Ensayo de Micronúcleos

Para dar cumplimiento al primer objetivo específico, que busca determinar el efecto genotóxico producto de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos, se llevó a cabo el ensayo de micronúcleos. El ensayo citogenético para la detección de micronúcleos es una de las técnicas más usadas para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, por lo que su identificación provee una medida cuantificable de aberraciones cromosómicas. (78). El ensayo de citoma con bloqueo de la citocinesis o por sus siglas en inglés (CBMN: Cytokinesis-block micronucleus cytome assay) es una variante del ensayo de micronúcleos que abarca un análisis más completo para medir el daño al ADN, la citostasis y la citotoxicidad; este se basa en el uso de citocalasina-B para impedir la citocinesis celular ocasionando en las células mononucleadas un aspecto de células binucleadas posterior al ciclo celular. Cada evento de daño al ADN se puntúa en células binucleadas tras aparición e identificación de micronúcleos (MN), yemas nucleares (NBUDs) y puentes nucleoplásmaticos o por sus siglas en inglés (NPB) (51).

Para la prueba de micronúcleos se usaron muestras obtenidas a partir de cultivos de linfocitos realizados mediante el uso de sangre periférica colectada en tubo con heparina. A cada uno de los sujetos de investigación se le realizó al menos dos cultivos de linfocitos. Para tal fin se cultivaron 10 gotas de sangre en 5ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco,#31800022) suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (Gibco,#12657029), penicilina/estreptomicina (Gibco,#15140122) y 50µl de fitohemaglutinina (Gibco,#10576015). Transcurridas 44 horas de cultivo a 37°C y con 5% CO₂ los cultivos estuvieron sometidos a la acción de la citocalasina-B (6ug/ml) (Sigma,C6762-5mg) por 28 horas. Después de este tiempo de cultivo, las células fueron cosechadas sometidas a choque hipotónico por 10 minutos con solución hipotónica de KCL 0,075M y fijadas con solución fijadora (metanol: ácido acético glacial 6:1). Posterior a la

fijación y extensión en lámina portaobjetos las células fueron teñidas con el colorante Giemsa (Merck,109204-0500) durante 10 minutos.

Las láminas portaobjetos fueron evaluadas a doble ciego y por un único observador en un microscopio de luz con una ampliación total de 1000X con objetivo de inmersión. Se evaluaron un total de 1000 células por lámina registrando la presencia de MN, NBUDs y NPB en cada célula y siguiendo los criterios de análisis sugeridos por Fenech *et al* (49). Para la validación de este ensayo, se realizaron cultivos de linfocitos de 5 sujetos de investigación entre los que se incluyeron vapeadores y controles, a los cuales transcurridas 24 horas de cultivo les fue añadido diepoxibutano (DEB)-1,3-butadiene diepoxide (Sigma,#202533-5g), un agente químico clastógeno del ADN a una concentración final de 100ng/mL siguiendo lo descrito por Arleen *et al* (79) . Las láminas obtenidas tras el tratamiento con DEB funcionaron como un control positivo interno para el análisis del ensayo de micronúcleos.

5.4 Extracción de ADN genómico

Para dar cumplimiento con el segundo objetivo específico, que plantea evaluar la presencia de alteraciones en los patrones de metilación del ADN producto de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos; se utilizaron muestras de sangre periférica recolectadas en el tubo con anticoagulante EDTA. Inicialmente, para la extracción de ADN genómico se realizó un proceso de lisis de eritrocitos para separar la fracción leucocitaria de la muestra. Cada una de las muestras de sangre fue añadida a 8 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El protocolo de extracción se realizó con el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus (ZYMO Research, D4069) partiendo de 200 µl de la capa leucocitaria obtenida y siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras obtener el eludido de ADN extraído este se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1.000 (NanoDrop Technologies) y fue almacenado en congelación (-20 °C) hasta su uso.

5.5 Prueba cuantitativa específica de metilación (qMSP) de LINE-1

Para determinar el impacto a nivel epigenético producto de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos, se evaluaron los niveles globales de metilación del ADN reflejados en elementos LINE-1. Los elementos nucleares intercalados largos 1 (LINE-1) son elementos transponibles autónomos que constituyen aproximadamente el 17% del genoma humano (80,81). Esta metodología se realizó mediante los ensayos de qMSP, en donde en primera instancia se obtuvo ADN convertido tras el tratamiento con bisulfito de sodio, el cual media la desaminación de las citosinas en uracilos mientras que las citosinas metiladas permanecen

intactas (82). Este tratamiento se realizó utilizando 500 ng del ADN genómico extraído siguiendo las indicaciones del fabricante kit EZ ADN Methylation (ZYMO Research, #D5002).

El ADN purificado y convertido fue utilizado como molde en una PCR en tiempo real específica para metilación realizada en el equipo Cobas z 480 analyzer de Roche Instrument, empleando oligos diseñados específicamente para la condición metilada de *LINE-1* (Tabla 1). La secuencia de los cebadores fue tomada del trabajo de Fazio *et al* (83). Como control inicial endógeno del “input DNA” (ADN de partida) se emplearán oligos específicos de *β-actina* (Tabla 1) Las reacciones qMSP se realizaron con un volumen final de 10 µl y se implementó FastStart SYBR Green Master (Roche, #4673484001), cebadores específicos de *LINE-1* metilado y 2 µl de ADN genómico modificado con bisulfito. Los ensayos de qMSP fueron validados usando el set de controles metilado y no metilado (Human Methylated and Non-methylated DNA set D5014-Zymo research). Los datos de CT fueron normalizados utilizando primers pobres en sitios CG del gen *β-actina*, por el método ΔCT y comparados contra el Control metilado por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, adaptando lo descrito por Li *et al* (84).

$$\Delta C_T(LINE - 1) = C_T(LINE - 1) - C_T(\beta - actina)$$

$$\Delta\Delta C_T(LINE - 1) = \Delta C_T(muestra) - \Delta C_T(Control Metilado)$$

Fórmula 1. Formula para la cuantificación de los niveles de metilación relativa de *LINE-1*.

Tabla 1. Secuencia cebadores implementados en el estudio.

Región diana	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón	Temperatura de anillamiento (Tm)
<i>LINE-1</i> -Metilado	Forward	CGCGAGTCGAAGTAGGGC	120 pb	62°C
	Reverse	ACCCGATTTTCCAAATACGACCG		
<i>β-actina</i>	Forward	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	120 pb	58°C
	Reverse	AACCAATAAAACCACTCCTCCCTTAA		

5.6 Análisis estadístico

Para establecer la normalidad de los datos se realizó una prueba de Shapiro-Wilk, este análisis reveló que los datos no siguen una distribución normal, por tal motivo se emplearon pruebas de estadística no paramétrica. Para determinar diferencias entre las variables demográficas, clínicas y de consumo entre cada uno de los grupos (vapeadores, fumadores y controles) se empleó la prueba U de Mann-Whitney para comparar dos grupos independientes y la prueba de Kruskal-Wallis cuando se compararon tres grupos independientes. En los análisis de frecuencia de micronúcleos y genotoxicidad entre los grupos de controles y vapeadores, se implementó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney o Mann-Whitney Wilcoxon. Para

los análisis de genotoxicidad en el que se incluye el grupo de fumadores o en los que los sujetos de investigación fueron clasificados en más de dos grupos se implementó la prueba de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, se realizaron pruebas de correlación de Spearman para determinar la correlación entre la frecuencia de genotoxicidad y los niveles de metilación de *LINE-1* con las diferentes variables continuas asociadas al consumo (Niveles de cotinina, años de consumo, días de uso del dispositivo, número de caladas y vatios del dispositivo electrónico). Posteriormente, se realizaron análisis de regresión logística simple, con el fin de identificar los factores determinantes para presentar una alta genotoxicidad o bajos niveles de metilación de *LINE-1*. Todos análisis de regresión logística se realizaron con las dos variables de resultado objetivo de este estudio:

1. **Alta frecuencia de Genotoxicidad:** se definió como los sujetos de investigación que presentaron los niveles más altos de frecuencia de genotoxicidad (n=23), al distribuir los datos de frecuencia de genotoxicidad corresponden a los cuartiles Q3-Q4.
2. **Bajos niveles de Metilación de *LINE-1*:** se definió como el 25% de los sujetos con niveles de metilación más bajos de *LINE-1* (n=18) (Resultados de $2^{-\Delta\Delta CT}$ más bajos), al distribuir los datos de expresión por cuartiles corresponden al cuartil Q1.

Por otro lado, las variables explicativas se definieron de la siguiente manera: Vapeador (Si/No), Fumador (Si/No), uso de dispositivo electrónico con Nicotina (Si/No), uso diario del dispositivo electrónico (7 días de la semana), alta cotinina (≥ 347 ng/ml), alto número de caladas/día (≥ 400), altos años de consumo (≥ 5 años) y alta potencia en vatios del dispositivo electrónico (≥ 80 W).

Todos los análisis estadísticos y las asociaciones de variables se realizaron en el software estadístico Stata: Versión 16 (StataCorp LLC.). Para creación de gráficas y figuras se utilizó GraphPad Prism versión 8.01 (GraphPad Software). En todas las figuras las barras de error se representan como mediana e IC 95%; *, $P < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

6. Resultados

6.1 Características de la población de estudio

Las características de la población seleccionada, clasificada en grupos de vapeadores, fumadores y controles se muestran en la Tabla 2. Cada uno de los sujetos de investigación fue pareado por edad y sexo. La mediana y rango de la edad en los grupos de vapeadores y controles fue de 22 (18-59) y para el grupo de los fumadores de 21 (21-25). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a la edad y sexo. Las variables clínicas más relevantes se asociaron con la presencia de comorbilidades como asma, padecimiento de enfermedad cardíaca, bronquitis y neumonía, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Para hacer una aproximación a la cantidad de tabaco consumido por los sujetos de investigación pertenecientes al grupo de fumadores, se realizó el cálculo del parámetro de índice paquete año (IPA). El IPA es útil para valorar el riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con el consumo de tabaco, así como determinar las probabilidades de éxito o fracaso en un intento de abandono del consumo (85). Los sujetos de investigación pertenecientes al grupo de fumadores se clasificaron como una población de riesgo leve de acuerdo con el IPA. Dentro de los datos recolectados en la encuesta, se evaluó la variable de años de consumo en los grupos de vapeadores exclusivos, mixtos y fumadores. La mediana y rango de años de consumo en el grupo de los vapeadores fue de 3 (0,5 – 34) y para el grupo de fumadores de 5 (3-10), los análisis de esta variable muestran diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 2. Características de la población asociadas a variables clínicas y de consumo.

Variable	Controles (n=32)	Vapeadores (n=32)	Fumadores (n=8)	Valor p
Edad (Años) *	22 (18-59)	23 (18-59)	21 (21-25)	0,9762
Sexo				0,7543
Mujeres	8	8	3	
Hombres	24	24	5	
Comorbilidades				
Asma	1	2	--	0,6799
Enfermedad Cardíaca	2	1	--	0,6799
Bronquitis	--	1	--	0,5353
Neumonía	--	1	--	0,5353
Índice paquete año (IPA)*	--	--	1 (0,15 – 2,5)	
Años de Consumo *	--	3 (0,5 – 34)	5 (3-10)	0,0001

* Resultados expresados como mediana (rango).

Para este trabajo se contó con un total de 32 vapeadores, a los cuales se les realizó una encuesta asociada con las variables de consumo respecto a los cigarrillos electrónicos. En primera instancia, se realizó una clasificación de acuerdo con el tipo de consumo de estos dispositivos

electrónicos, en donde se identificó que 20 de los vapeadores corresponden a usuarios exclusivos y 12 a usuarios mixtos (los cuales alternan su consumo con el cigarrillo convencional). Otras variables de relevancia como el promedio de caladas/día y días de uso semanal se resumen en la Tabla 3. Asimismo, se determinó las características más importantes de los dispositivos usados por los vapeadores, indagando sobre la potencia en vatios (W), el tipo de vapeador o cigarrillo electrónico, los saborizantes de preferencia de los usuarios y la presencia de nicotina en los dispositivos. Es importante destacar, que del número total de vapeadores incluidos en este estudio, el 96,8 % usa dispositivos electrónicos que contienen nicotina. No obstante, también se evidencia que los vapeadores suelen alternar su consumo con diferentes tipos de dispositivo como dispositivos desechables, con cartucho precargado, sistema de tanque o un sistema modificado. Finalmente, vale la pena resaltar, que los sujetos de investigación pertenecientes a este grupo tienen una preferencia del 46,9 % por los saborizantes de tipo frutales, seguidos por mentolados y sabor a vainilla.

Tabla 3. Variables asociadas al consumo en Vapeadores.

Variable	N (%)
Tipo consumo	
Exclusivos	20 (62,5%)
Mixtos	12 (37,5 %)
Caladas/día	
<250	19 (59,4 %)
250-500	7 (22 %)
500-750	3 (9,3 %)
750-1000	3 (9,3 %)
Días de uso	
< 7	10 (31,2 %)
7	22 (68,8 %)
Vatios Dispositivo	
<50	22 (68,7 %)
50-100	7 (22 %)
>100	3 (9,3 %)
Tipo Dispositivo	
Desechable	14
Cápsulas o cartuchos	19
Sistema tanque	17
Sistema modificado	12
Saborizantes preferencia	
Mentolados	11 (34,5 %)
Frutales	15 (46,9 %)
Vainilla	3 (9,3 %)
Otro	3 (9,3 %)
Uso de nicotina	31 (96,8 %)

6.2 Evaluación de cotinina sérica como una aproximación para determinar el estado de exposición a la nicotina.

Con el fin de determinar el grado de exposición a la nicotina producto del humo de cigarrillo y el aerosol de los cigarrillos electrónicos, se cuantificó los niveles del biomarcador sérico de cotinina. Los vapeadores presentaron una mediana de 223,5 ng/ml con un rango de 9-501 ng/ml y los fumadores de 4,85 ng/ml con un rango 0 – 13,5 ng/ml (Figura 1) evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p < 0,0001$). De acuerdo con los parámetros anteriormente establecidos como criterios de clasificación para este biomarcador, se considera que la cohorte de fumadores en este estudio presenta una baja exposición a la nicotina respecto a los vapeadores.

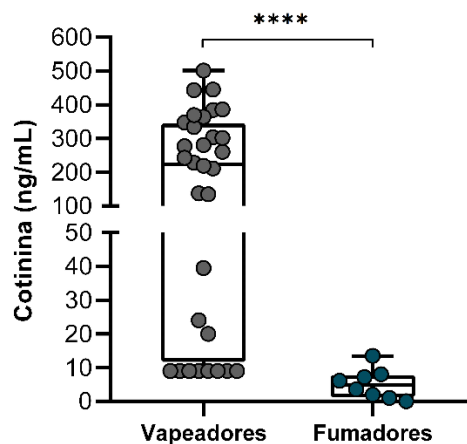


Figura 1. Medición de cotinina sérica. Concentraciones de cotinina en ng/ml cuantificado mediante la técnica de quimioluminiscencia. Los valores p de significancia se muestran como: **** $p < 0,0001$.

6.3 Validación del ensayo CBMN en linfocitos aislados de sangre periférica de controles, vapeadores y fumadores

Una vez caracterizada la población respecto a las variables clínicas y de consumo, se procedió a determinar el efecto genotóxico en muestras de sangre periférica provenientes de cada uno de los grupos de investigación. Para dar cumplimiento con este objetivo, se llevó a cabo el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN), en el cual se realizó un puntaje del grado de inestabilidad genómica mediante el análisis de la presencia de micronúcleos (MNs), puentes nucleoplásmaticos (NPBs) y yemas nucleares (NBUDs). La Figura 2 corresponde a las imágenes obtenidas por microscopía que muestran las anomalías nucleares y hallazgos más representativos en las láminas analizadas.

Las células mononucleadas (Figura 2A) se caracterizan por presentar un citoplasma intacto y una morfología de núcleo normal, diferenciándose así de células necróticas y apoptóticas. Las células binucleadas (Figura 2B) se caracterizan por tener dos núcleos delimitados por

membranas nucleares intactas, los cuales se encuentran situados dentro del mismo límite del citoplasma y presentan un tamaño equivalente entre sí. Asimismo, estos núcleos deben tener un patrón de tinción similar entre sí e idealmente no deben superponerse. Por otra parte, los MNs tienen una morfología similar a la de los núcleos presentes en las células binucleadas, no obstante, estos se caracterizan por ser de un tamaño inferior. Según los criterios de Fenech *et al* (49) los MNs pueden representar 1/16 y 1/3 del diámetro de los núcleos principales. Los MNs no deben estar conectados a los núcleos principales o estar superpuestos a los mismos y deben presentar la misma intensidad de tinción que los núcleos principales (Figura 2C). Dentro de los análisis de microscopia, se evidencio la presencia concomitante de más de un micronúcleo por célula binucleada (Figura 2D).

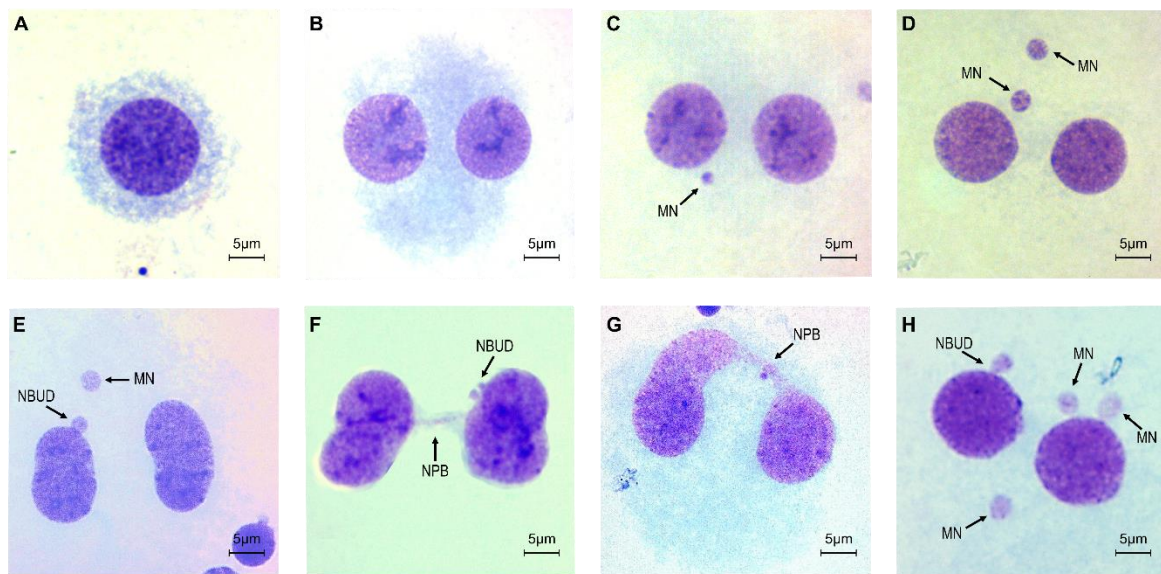


Figura 2. Hallazgos frecuentes en el ensayo CBMN en linfocitos aislados de sangre periférica. Cultivos de linfocitos aislados de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina y tratados con citocalasina B para el bloqueo de la citocinesis celular. Las imágenes corresponden a extendidos celulares realizados en láminas portaobjetos que fueron teñidos con coloración Giemsa. Las imágenes fueron obtenidas a partir de un microscopio de luz con una ampliación total de 1000X con objetivo de inmersión. Las células en las que no se evidencia daño a nivel del ADN incluyen: **A)** Célula mononucleada y **B)** Célula binucleada. Los biomarcadores de daño al ADN incluyen: **C)** Célula binucleada con un micronúcleo, **D)** Célula binucleada con dos micronúcleos, **E)** Célula binucleada con yema nucleares y un micronúcleo, **F)** Célula binucleada con puente nucleoplasmático y yemas nucleares, **G)** Célula binucleada con puente nucleoplasmático, **H)** Célula binucleada con múltiples micronúcleos y yema nuclear. *MN:* micronúcleo *NBUD:* yemas nucleares *NPB:* puentes nucleoplasmáticos.

Las NBUDs a pesar de que presentan una apariencia similar a los MNs en cuanto a su tamaño, estas se caracterizan por ser estructuras que se encuentran conectadas a alguno de los núcleos de manera similar a una protuberancia o gemación de la estructura nuclear. Las yemas nucleares pueden presentarse como núcleos con hendidura o núcleos lobulados. En este trabajo

se cuantificó como NBUDs a todos los núcleos que tienen brotes nucleares claramente definidos (Figura 2E). Los NPBs son estructuras continuas que unen los núcleos de una célula binucleada y poseen las mismas características de tinción que los núcleos principales (Figura 2F,2G). Es importante destacar, que en el análisis del ensayo CBMN también se evidenció la presencia de varias marcas de genotoxicidad en una misma célula binucleada (Figura 2E,2H). Cada uno de los criterios morfológicos descritos anteriormente, fueron usados como criterios de evaluación para la identificación de marcadores de inestabilidad genómica en el ensayo de CBMN.

Teniendo en cuenta la identificación de cada una de las alteraciones características presentes en el ensayo CBMN, se procedió a realizar la validación de la lectura y reconocimiento de MNs, NBUDs y NPBs mediante el uso del agente clastógeno diepoxibutano (DEB). Dentro de esta validación, fueron seleccionadas 5 muestras correspondientes a 4 controles no fumadores no vapeadores y 1 vapeador mixto, los cuales durante la fase de cultivo celular fueron tratados con DEB al 5 μ M; como condición control se usaron los cultivos de los sujetos de investigación seleccionados no tratados con DEB. Los resultados de frecuencia de micronúcleos se muestran como el conteo de MN por cada 1000 células binucleadas contadas y la frecuencia de genotoxicidad se define como el conteo de MNs, NBUDs y NPBs en 1000 células binucleadas (Figura 3). El DEB aumentó significativamente la formación de MN y de marcadores de inestabilidad genómica aproximadamente de 2 veces más respecto a sus controles no tratados ($p < 0,05$) (Figura 3A, 3B). Estos resultados validan la lectura e identificación de la frecuencia de MN y genotoxicidad a través del ensayo CBMN.

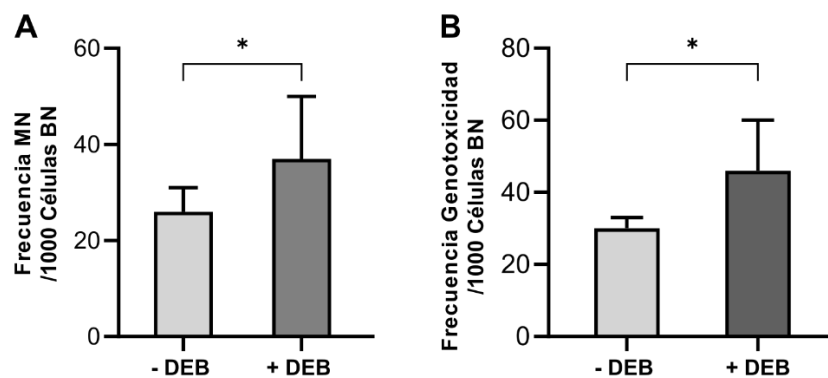


Figura 3. Efecto del DEB en la inducción de MN, NBUDs y NPBs en linfocitos aislados de sangre periférica. Cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina, tratados con el agente inductor de daño al ADN diepoxibutano (100ng/mL) y posteriormente con citocalasina B para el bloqueo de la citocinesis celular. Los resultados obtenidos son producto de los ensayos de CBMN. A) Frecuencia de MN expresada en número de micronúcleos por 1000 células binucleadas tras el tratamiento DEB, B) Frecuencia de Genotoxicidad expresada en número de MN, NBUDs y NPBs por

cada 1000 células binucleadas tras el tratamiento DEB. Los valores p de significancia se muestran como: * $p < 0,05$. MN: micronúcleo NBUD: yemas nucleares NPB: puentes nucleoplasmáticos.

6.4 El incremento en la frecuencia de genotoxicidad se asocia con el uso de dispositivos electrónicos SEAN

Con el objetivo de evaluar el efecto genotóxico producto de la exposición al aerosol de cigarrillos electrónicos, se realizaron ensayos de CBMN en los que se identificaron mediante microscopia la presencia de MNs, NBUDs y NPBs en muestras de sangre periférica provenientes de usuarios de cigarrillos electrónicos (n=32) y controles no vapeadores (n=32) (Figura 4) Los resultados muestran que al comparar los dos grupos la frecuencia de MN es mayor en el grupo de vapeadores ($p < 0,05$) (Figura 4A), y de manera similar, la frecuencia de genotoxicidad también aumenta en el grupo de vapeadores respecto a controles no expuesto al aerosol del cigarrillo electrónico ($p < 0,01$) (Figura 4C). Al establecer la mediana del conteo de MN en los controles esta fue de 11 con un rango total de 3-28 MN frente al grupo de vapeadores en los que se determinó una mediana de 13 con un rango total 3- 28 MN.

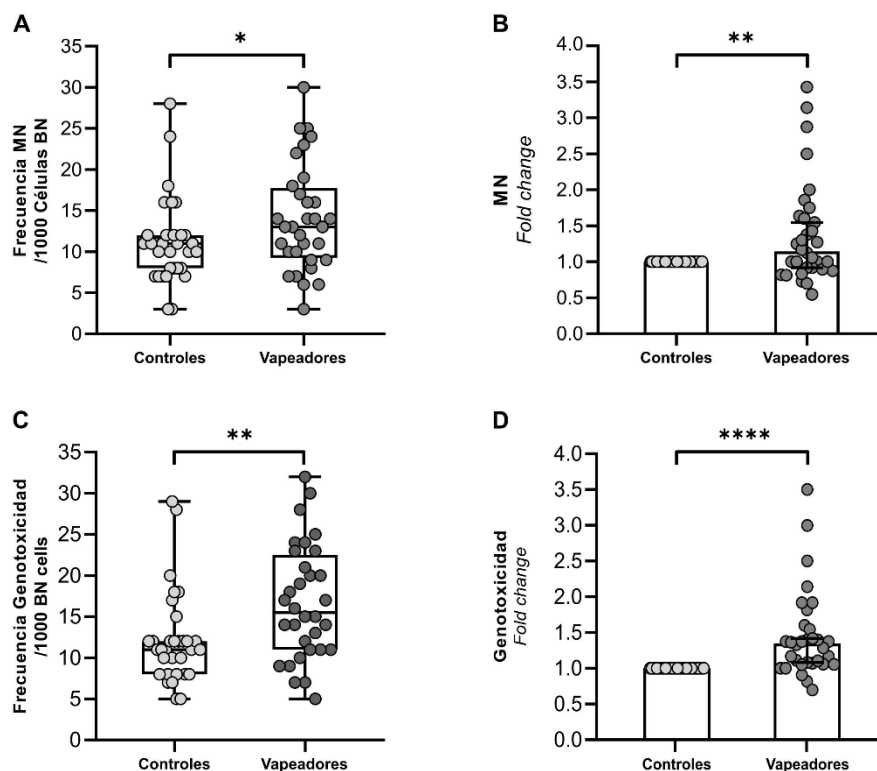


Figura 4. Frecuencia de MN y genotoxicidad en linfocitos aislados de controles y vapeadores. A) Frecuencia de MN expresada en número de micronúcleos por 1000 células binucleadas, B) *Fold change* del conteo de micronúcleos relativo a controles pareados no vapeadores. C) Frecuencia de Genotoxicidad expresada en número de MN, NBUDs y NPBs por cada 1000 células binucleadas, D) *Fold change* genotoxicidad relativo a controles pareados no vapeadores. La distribución de los datos dentro de cada grupo se muestra mediante una combinación de gráficos de dispersión (para mostrar valores individuales) y gráficos de cajas y bigotes. Los valores p de significancia se muestran

como: * p <0,05; ** p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001. MN: micronúcleo NBUD: yemas nucleares NPB: puentes nucleoplasmáticos.

Además, se establecieron los indicadores de mediana y rango para los parámetros restantes del ensayo de CBMN como lo son las NBUDs y los NPBs; en el grupo de controles fue de 1 (0-5 NBUD) y de 0 (0-1 NPBs). Los resultados de los vapeadores corresponden a 2 (0 -7 NBUD) y 0 (0-2 NPB) respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Conteo total de parámetros del ensayo de CBMN en controles, vapeadores y fumadores.

Categoría	MNi		NBUDs		NPBs	
	Media±SD	Mediana (Rango)	Media±SD	Mediana (Rango)	Media±SD	Mediana (Rango)
Controles n=32	11,16 ±5,19	11 (3-28)	1,72 ±1,61	1 (0-5)	0,09 ± 0,296	0 (0-1)
Vapeadores n=32	14,06 ± 6,48	13 (3-28)	1,97 ± 1,94	2 (0 -7)	0,09 ±0,39	0 (0-2)
Fumadores n=8	14,38 ±4,14	15 (9-20)	2 ± 1,51	2 (0-5)	0,25 ±0,46	0 (0 -1)

Los resultados se muestran como valores de media ± desviación y mediana (rango) para cada uno de los parámetros de ensayo (CBMN) como una aproximación del número total de micronúcleos, puentes nucleoplasmáticos y brotes nucleares por 1000 células. MN: micronúcleo NBUD: yemas nucleares NPB: puentes nucleoplasmáticos.

Dado que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los parámetros de media y rango en el conteo neto de MNs, NBUDs y NPBs entre vapeadores y controles, se procedió a parear cada uno de los sujetos de investigación por edad y sexo para los análisis posteriores. Los resultados del ensayo de CBMN se ajustaron como *Fold change* de MN y genotoxicidad, los cuales corresponden a la tasa de cambio de la frecuencia de MN y genotoxicidad de vapeadores relativa a su control pareado por edad y género (Figura 4B,4D). Los resultados derivados de este análisis muestran que los vapeadores presentan un aumento en los niveles de genotoxicidad y frecuencia de micronúcleos respecto a sus controles pareados no usuarios de estos dispositivos con diferencias estadísticamente significativas (Figura 4B,4D).

6.5 Diferencias entre la frecuencia de genotoxicidad relacionada con el hábito de fumar y vapear.

Con el objetivo de evaluar las diferencias que existen en los niveles de genotoxicidad entre los grupos de fumadores y vapeadores, se realizaron análisis de los resultados obtenidos mediante el ensayo de CBMN entre estos grupos. Para los análisis se tomó una cohorte de la población de fumadores (n=8), vapeadores (n=8) y controles (n=8) pareada por edad y sexo. Los resultados revelan que al comparar estos tres grupos existe una mayor frecuencia de MN en el grupo de vapeadores siendo estadísticamente significativas (p <0,05) respecto a los controles. Sin embargo, para el grupo de fumadores, aunque se evidencia una tendencia al aumento en la

frecuencia de MN, al momento de comparar estos cambios respecto a los controles ($p=0,4689$) y vapeadores ($p=0,5173$) no existen diferencias estadísticamente significativas (Figura 5A,5B).

Estos resultados son similares cuando se realiza el análisis por frecuencia de genotoxicidad, en donde el grupo de vapeadores presenta una mayor frecuencia de genotoxicidad respecto a controles y fumadores, incluso cuando estos resultados son normalizados respecto a los controles pareados (Figura 5C, 5D). En conclusión, para la cohorte analizada, los vapeadores continúan siendo el grupo que con mayor frecuencia de genotoxicidad. De otra parte, también se estableció la mediana del conteo de MN en el grupo de los fumadores, la cual fue de 15 con un rango total de (9-20 MN), y para los parámetros restantes del ensayo de CBMN como lo son las NBUDs y los NPBs fueron de 2 (0-5 NBUDs) y 0 (0 -1 NPBs) (Tabla 4).

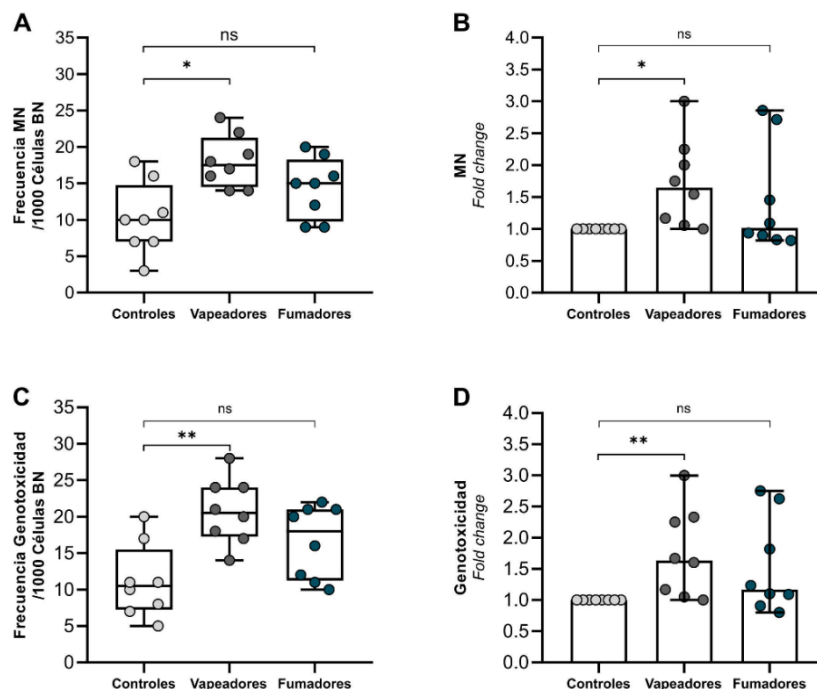


Figura 5. Frecuencia de MN y genotoxicidad en fumadores y vapeadores. **A)** Frecuencia de MN expresada en número de micronúcleos por 1000 células binucleadas, **B)** *Fold change* del conteo de micronúcleos relativo a controles pareados. **C)** Frecuencia de Genotoxicidad expresada en número de MN, NBUDs y NPBs por cada 1000 células binucleadas, **D)** *Fold change* genotoxicidad relativo a controles pareados. La distribución de los datos dentro de cada grupo se muestra mediante una combinación de gráficos de dispersión y gráficos de cajas y bigotes. Los valores p de significancia se muestran como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. ns: No significativo MN: micronúcleo NBUD: yemas nucleares NPB: puentes nucleoplasmáticos.

6.6 Análisis de las variables de consumo y la frecuencia de Genotoxicidad

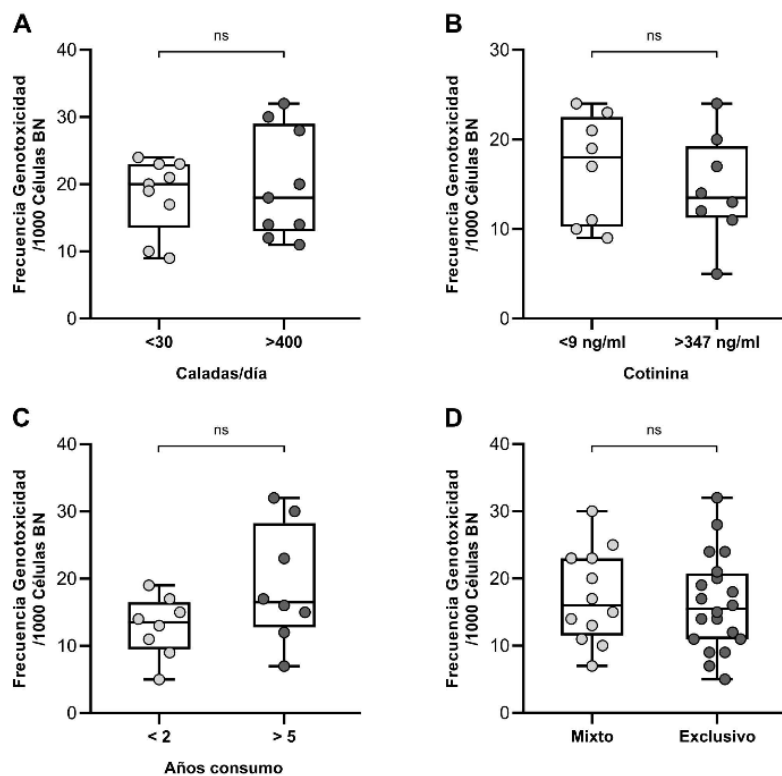
Teniendo en cuenta que la frecuencia de genotoxicidad en el grupo de los vapeadores es mayor respecto a los grupos control y fumadores, se planteó el objetivo de determinar que variables

de consumo se asocian con incrementos en la frecuencia de genotoxicidad. Para ello, se definieron algunas variables categóricas a partir de los resultados obtenidos en la encuesta realizada al grupo de vapeadores. Cada una de estas categorías se estableció a partir de dividir los datos por cuartiles, en donde los resultados encontrados en Q1 se definieron como la condición baja y aquellos resultados situados en Q3 y Q4 como la condición alta de acuerdo con cada una de las variables, estas categorías se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Definición de variables categóricas asociadas al consumo de los cigarrillos electrónicos.

Variable	Categoría Baja	Categoría Alta
Caladas /día	< 30 caladas	> 400 caladas
Cotina sérica	< 9ng/ml	> 347ng/ml
Años de consumo	< 2 años	> 5 años
Potencia dispositivo(Vatios)	< 6,5 W	> 80 W
Uso días a la semana	< 7 días	> 7 días

Como hallazgos de este análisis, se evidencia que la frecuencia de genotoxicidad no muestra diferencias estadísticamente significativas cuando se compara los grupos de vapeadores clasificados por el número de caladas, niveles de cotinina sérica, años de consumo, potencia del dispositivo y uso semanal del cigarrillo electrónico. Asimismo, se realizó el análisis de la frecuencia de genotoxicidad entre vapeadores mixtos y exclusivos, y se evidencia que no existen diferencias entre cada uno de los grupos (Figura 6).



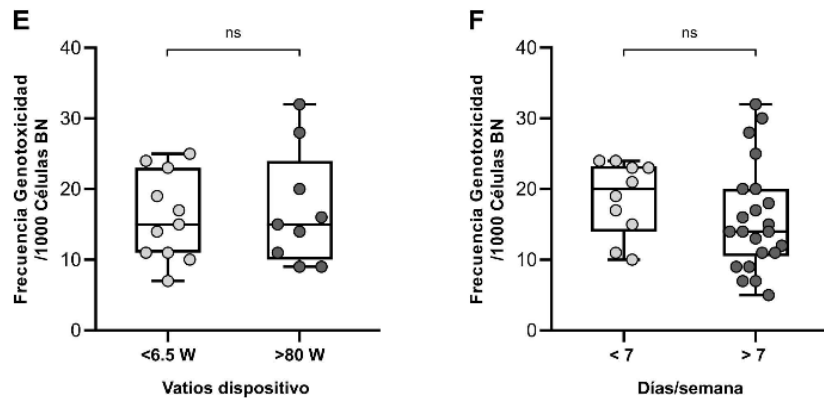


Figura 6. Análisis de la frecuencia de genotoxicidad de acuerdo con las variables categóricas asociadas al consumo. **A)** Comparación de la frecuencia de genotoxicidad entre los grupos de vapeadores que realizan bajo y alto número de caladas/día. **B)** Análisis de la frecuencia de genotoxicidad entre los grupos de vapeadores que presentan baja y alta cotinina (ng/ml). **C)** Comparación de la frecuencia de genotoxicidad entre los grupos de vapeadores tienen bajos y altos años de consumo del dispositivo electrónico. **D)** Frecuencia de genotoxicidad entre los grupos de vapeadores mixtos y exclusivos. **E)** Comparación de la frecuencia de genotoxicidad entre los grupos de vapeadores que usan un dispositivo electrónico con bajos y altos vatios. **F)** Análisis de genotoxicidad entre los grupos de vapeadores que usan los dispositivos electrónicos menos de 7 días vs el uso semanal. La distribución de los datos dentro de cada grupo se muestra mediante una combinación de gráficos de dispersión y gráficos de cajas y bigotes. *ns: No significativo*

6.7 Análisis de factores determinantes para presentar alta genotoxicidad

Con el objetivo de identificar algunos factores que aumentan la probabilidad de presentar altos niveles de genotoxicidad, se realizaron análisis de regresión logística con algunas variables clínicas y de consumo (Tabla 6). Los resultados del análisis de regresión logística simple señalan que ser un vapeador activo incrementa la probabilidad de presentar alta genotoxicidad en 3,69 veces más respecto a sujetos no vapeadores. De manera similar, se encontró mediante el análisis bivariado, que las variables de ser fumador y adicionar nicotina a los dispositivos incrementan la probabilidad de presentar una alta frecuencia de genotoxicidad en el ensayo de CBMN (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de regresión logística bivariada de factores determinantes para presentar altos niveles de Genotoxicidad.

Variable	Regresión logística Simple		
	OR	IC 95%	Valor p
Vapeador Activo	3,69	1,13-12,10	0,031*
Vapeador Mixto	3,86	0,87- 17,16	0,076
Fumador	4,42	1,21-16,19	0,025*
Vapeador con Nicotina	3,73	1,12-12,39	0,031*
Consumo diario Vapeador	0,31	0,07-1,47	0,140
Cotinina (≥ 347 ng/ml)	0,39	0,07-2,36	0,308
Caladas/día (≥ 400)	2,34	0,49-11,27	0,288
Años consumo (≥ 5)	0,63	0,09-4,18	0,631
Vatios (≥ 80)	0,88	0,14-5,58	0,888

En resumen, estos resultados concuerdan como lo evidenciado anteriormente, demostrando que dentro de las variables de consumo como: usuario vapedor, usuario de cigarrillo convencional y presencia de nicotina en el dispositivo, pueden tener influencia sobre los niveles y frecuencia de genotoxicidad.

6.8 Relación entre los niveles de genotoxicidad respecto al número de caladas y niveles de cotinina.

Para contribuir al cumplimiento del tercer objetivo específico, se realizaron análisis de regresión lineal con el fin de predecir el valor de la variable *fold change* de genotoxicidad según diferentes variables continuas asociadas al consumo. En primera instancia, la variable que se quiere predecir corresponde a los resultados normalizados de la frecuencia de genotoxicidad en el grupo de vapedores respecto a la cantidad de caladas/día reportas por los vapedores. Los resultados muestran que existe una relación lineal directa entre las variables de genotoxicidad y número de caladas, indicando una dependencia lineal (Figura 7A) . En contraste, los análisis provenientes de la comparación con los resultados de cotinina sérica (Figura 7B) evidencian que pese a que existe una tendencia lineal las variables analizadas no muestran una dependencia estadísticamente significativa.

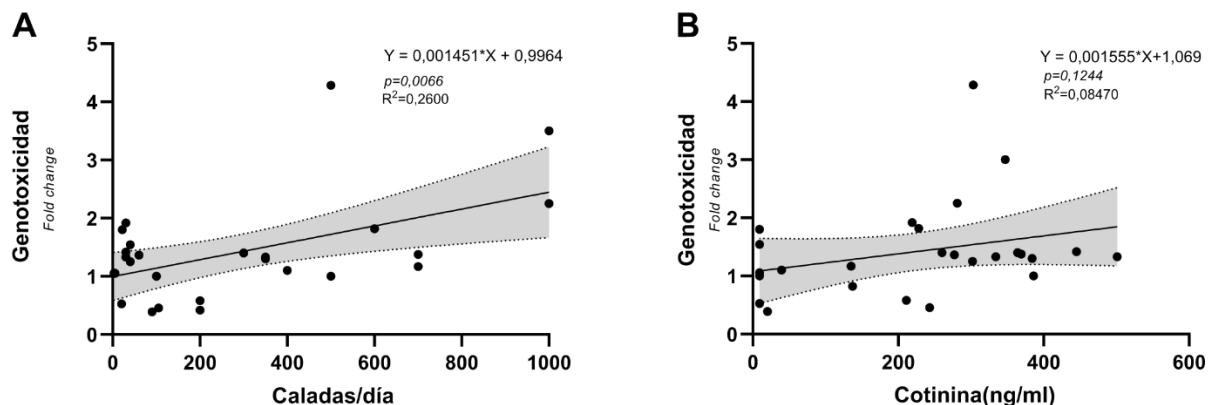


Figura 7. Análisis de regresión lineal de los niveles de genotoxicidad. A) Regresión lineal del *fold change* de Genotoxicidad respecto al número de caladas/día. **B)** Regresión lineal del *fold change* de Genotoxicidad respecto a las concentraciones de cotinina sérica.

6.9 Efecto de la exposición al uso de cigarrillos electrónicos en los niveles de metilación de *LINE-1*.

Con el objetivo de evaluar si existen cambios epigenéticos producto de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos, se realizaron ensayos de qMSP para determinar los patrones de metilación del ADN en los elementos repetitivos *LINE-1*. Para esta metodología, se compararon los niveles de metilación de *LINE-1* en vapedores y controles respecto al control metilado (M). Como resultados de estos ensayos se logró evidenciar que existen diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en los niveles de metilación de *LINE-1* en el grupo de vapeadores respecto a los detectados en las muestras de control metilado. Específicamente se detectaron disminuciones en los niveles de metilación de *LINE-1* para este grupo. Por el contrario, en los sujetos de investigación designados como no vapeadores, no se detectaron diferencias significativas respecto al control de metilación. De otra parte, al realizar una comparación entre el grupo de no vapeadores y vapeadores, los niveles de metilación de *LINE-1* en vapeadores son menores respecto a los controles con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 8A). Los resultados que se muestran como porcentajes de metilación corresponden a la normalización de los datos considerando al resultado más alto de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de *LINE-1* metilado como el 100% de metilación (Figura 8B). Asimismo, se evidencia un patrón de metilación similar, en el cual el grupo de vapeadores tiene los menores porcentajes de metilación respecto a los controles metilados y sujetos no vapeadores con diferencias estadísticamente significativas. Es importante mencionar, que cuando se realiza la comparación entre los porcentajes de metilación de *LINE-1* entre el control no metilado (N) y los vapeadores no se identifican diferencias estadísticamente significativas.

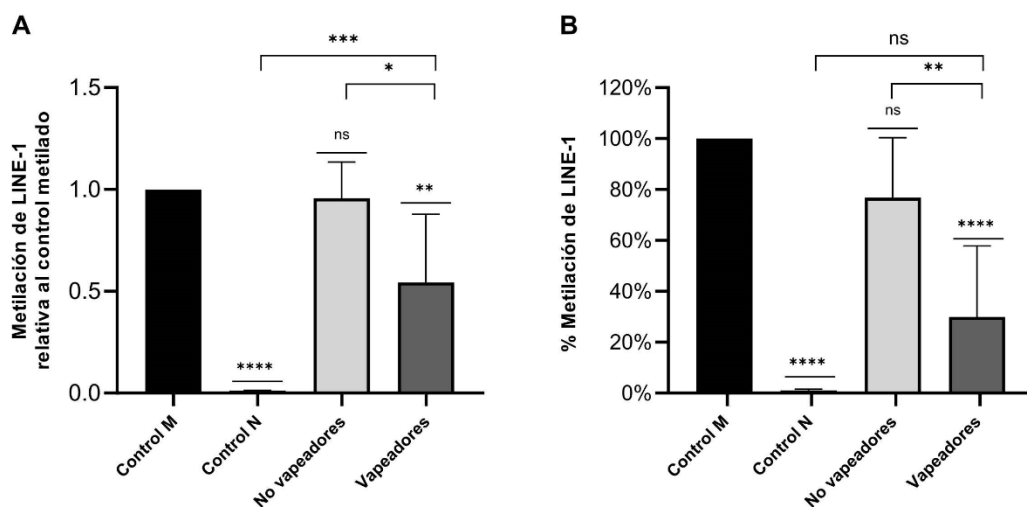


Figura 8. Niveles de metilación de LINE-1 en sujetos de investigación vapeadores y no vapeadores. A) Metilación de LINE-1 relativa al control metilado (M) B) Porcentajes de metilación de LINE-1. Los valores p de significancia se muestran como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. ns: No significativo

En conjunto estos resultados demuestran que la metilación del ADN en los elementos *LINE-1* es menor en el grupo de sujetos de investigación que tienen el hábito de Vapear.

6.10 Diferencias en los niveles de metilación de *LINE-1* relacionadas con el hábito de fumar y vapear.

Con el objetivo de evaluar las diferencias que existen en los niveles de metilación entre los grupos de fumadores y vapeadores, se realizaron comparaciones de los resultados obtenidos mediante qMSP entre estos grupos. Para los análisis se tomó una cohorte de la población de fumadores (n=8), vapeadores (n=8) y controles (n=8). Los resultados revelan que: al contrastar estos tres grupos existen mayores niveles de metilación de *LINE-1* relativos al control metilado en el grupo control; en cuanto al grupo de fumadores, estos muestran una tendencia a la baja respecto al grupo control en los niveles de metilación de *LINE-1*, sin embargo, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,99$). Por otra parte, aquellos sujetos de investigación pertenecientes al grupo de vapeadores muestran menores niveles de metilación de *LINE-1* en comparación con el grupo control ($p = 0,0003$) y sujetos de investigación que tienen el hábito de fumar ($p = 0,01$).

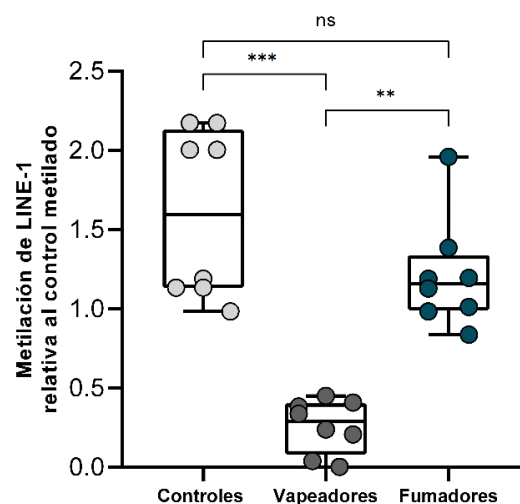


Figura 9. Niveles de metilación de *LINE-1* en fumadores y vapeadores. La distribución de los datos dentro de cada grupo se muestra mediante una combinación de gráficos de dispersión y gráficos de cajas y bigotes. Los valores p de significancia se muestran como: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ns: No significativo

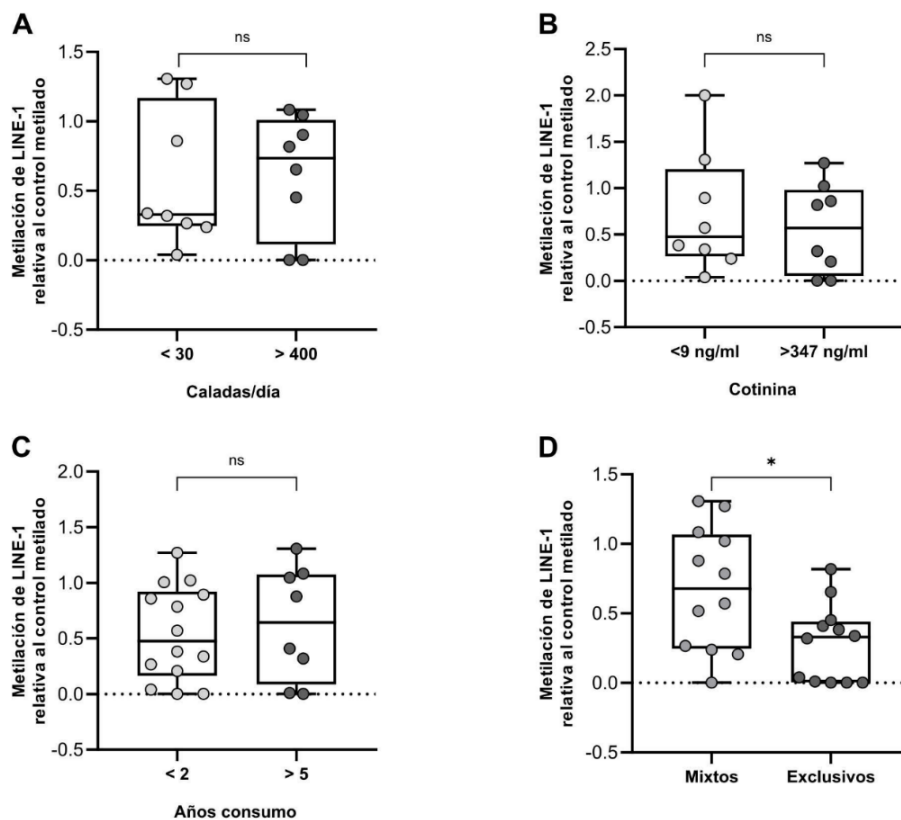
En resumen, estos resultados concuerdan con lo previamente demostrado, en donde los sujetos de investigación pertenecientes al grupo de vapeadores exhiben bajos niveles de metilación en los elementos *LINE-1* en comparación con usuarios de cigarrillo convencional y sujetos control.

6.11 Análisis de las variables de consumo y los niveles de metilación de *LINE-1*.

Teniendo en cuenta que los niveles de metilación de *LINE-1* son inferiores en el grupo de los vapeadores respecto a los grupos control y fumadores, se planeó determinar que variables se

asocian con los patrones de metilación de *LINE-1*. Por consiguiente, se usaron las variables categóricas asociadas al consumo especificadas en la Tabla 5. Como hallazgos de este análisis, se evidencia que los niveles de metilación de *LINE-1* no muestra diferencias estadísticamente significativas cuando se compara los grupos de vapeadores clasificados por el número de caladas, niveles de cotinina sérica, años de consumo, potencia del dispositivo y uso semanal del cigarrillo electrónico (Figura 10). De otra parte, al realizar los análisis de los niveles de metilación de *LINE-1* entre vapeadores mixtos y exclusivos se evidenció que existen diferencias entre cada uno de los grupos, mostrando una disminución en los niveles de metilación en los usuarios exclusivos de los dispositivos electrónicos (Figura 10A).

En conclusión, estos datos sugieren que en la cohorte analizada de vapeadores los niveles de metilación de *LINE-1* más bajos corresponden a aquellos usuarios de cigarrillos electrónicos que no alternan su consumo con los cigarrillos convencionales.



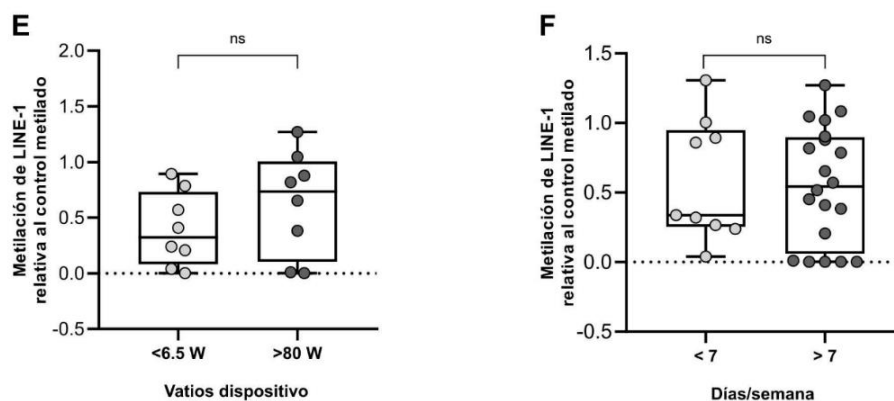


Figura 10. Análisis de niveles de metilación de LINE-1 de acuerdo con las variables categóricas asociadas al consumo.

A) Comparación de la metilación de *LINE-1* entre los grupos de vapeadores que realizan bajo y alto número de caladas/día. B) Análisis de metilación de *LINE-1* entre los grupos de vapeadores que presentan baja y alta cotinina (ng/ml). C) Comparación de los niveles de metilación de *LINE-1* entre los grupos de vapeadores tienen bajos y altos años de consumo del dispositivo electrónico. D) Metilación de *LINE-1* entre los grupos de vapeadores mixtos y exclusivos. E) Comparación de la metilación de *LINE-1* entre los grupos de vapeadores que usan un dispositivo electrónico con bajos y altos vatios. F) Análisis de metilación de entre los grupos de vapeadores que usan los dispositivos electrónicos menos de 7 días vs el uso semanal. Los valores p de significancia se muestran como: * p <0,05. ns: No significativo

6.12 Variables que incrementan el riesgo de presentar bajos niveles de metilación de *LINE-1*.

Partiendo del análisis de resultados de los patrones metilación de *LINE-1* en el grupo de vapeadores, se buscó identificar qué factores que aumentan la probabilidad de presentar bajos niveles de metilación de *LINE-1*; para ello se realizaron análisis de regresión logística con algunas variables clínicas y de consumo (Tabla 7). Los resultados del análisis de regresión logística simple señalan que ser un vapeador incrementa la probabilidad de presentar bajos niveles de metilación de *LINE-1* en 5,44 veces más respecto a sujetos no vapeadores. De manera similar, se encontró que aquellos vapeadores que adicionan nicotina a los dispositivos incrementan la probabilidad de presentar bajos niveles de metilación de los elementos *LINE-1* (Tabla 7). Finalmente, se adicionó una nueva variable categórica definida como alta genotoxicidad (puntuación de ensayo CBMN $\geq 18/1000$ células BN); los análisis de regresión logística con esta categoría demostraron que tener alta genotoxicidad no es un factor determinante para presentar bajos niveles de metilación de *LINE-1*.

Tabla 7. Análisis de regresión logística bivariada de factores determinantes para presentar bajos niveles de metilación de *LINE-1*.

Variable	Regresión logística Simple		
	OR	IC 95%	Valor p
Vapeador Activo	5,44	1,55-19,18	0,008*
Vapeador Mixto	3,5	0,71-17,22	0,123
Fumador	1,75	0,38-7,97	0,469
Vapeador con Nicotina	4,28	1,30-14,14	0,017*
Consumo diario Vapeador	0,69	0,15-3,11	0,632
Cotina (≥347ng/ml)	1,4	0,28-6,98	0,681
Caladas/día (≥ 400)	0,55	0,11-2,72	0,460
Años consumo (≥5)	1,4	0,28-6,98	0,681
Vatios (≥ 80)	0,61	0,12-3,16	0,557
Alta Genotoxicidad (≥18)	11,88	0,38-3,72	0,768

6.13 Asociación entre los niveles de metilación de *LINE-1* y los niveles de cotinina.

Para determinar la asociación entre algunas medidas de consumo y los patrones de metilación, se llevaron a cabo un análisis de correlación de Spearman comparando los niveles de cotinina sérica frente a la metilación de *LINE-1*. Este análisis mostró una correlación negativa moderada ($r=-0,4159$) y estadísticamente significativa ($p=0,0105$) entre ambas variables (Figura 11). Estos resultados evidencian que a mayores niveles de cotinina sérica menores son niveles de metilación de *LINE-1*.

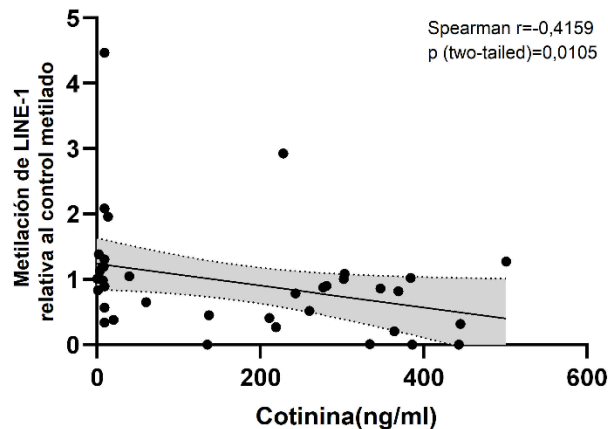


Figura 11. Correlación Spearman entre los niveles de metilación de *LINE-1* y los niveles de cotinina sérica.

7. Discusión

El acelerado crecimiento de la industria de los cigarrillos electrónicos es el resultado de las diversas estrategias de promoción que se usan al momento de referirse a estos dispositivos. Principalmente, porque afirman ser una alternativa más segura respecto al uso de los cigarrillos de tabaco se consideran como una estrategia para abandonar el hábito de fumar y como una

experiencia atractiva para los usuarios, ya que permiten personalizar y elegir opciones dentro del amplio catálogo de sabores y variantes de dispositivos. Dado el creciente uso de este tipo de productos, especialmente dentro de la población joven, existe la necesidad de determinar las consecuencias que tienen los cigarrillos electrónicos en la salud, especialmente porque muchos de los compuestos contenidos en el aerosol tienen un alto potencial genotóxico y las concentraciones de exposición a estos compuestos normalmente exceden los límites establecidos como seguros de exposición ocupacional (86).

En el humo del tabaco se han descrito más de 4000 compuestos químicos, de los cuales 60 son conocidos como carcinógenos. La mitad de estos compuestos se producen de forma natural en la hoja de tabaco y el resto de ellos surgen producto de la combustión. La amplia gama de productos químicos presentes en el humo de los cigarrillos convencionales incluye: monóxido de carbono, dióxido de carbono, cianuro de hidrógeno, amoníaco, benceno, formaldehído, fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y nitrosaminas específicas del tabaco (TNSA) (86). La nicotina que es uno de los componentes más abundantes en el humo del cigarrillo convencional y es responsable de las propiedades adictivas del tabaco, se encuentra presente en el aerosol de los cigarrillos electrónicos en concentraciones altamente variables (37).

Eventualmente, el humo del tabaco corresponde a una mezcla de sustancias químicas entre las que se encuentran agentes carcinogénicos, muchos de los cuales inducen daños en el ADN; producto de estos daños y de una presencia concomitante de fracaso en los mecanismos de reparación en algunos casos se generan alteraciones en genes cuya mutación facilita el establecimiento y la progresión tumoral. Estas mutaciones somáticas se conocen como tipo “*Drivers*”, las cuales explican una de las razones por las que el hábito de fumar se ha relacionado con aproximadamente 17 tipos diferentes de cáncer (87,88). Sin embargo, muchos de estos agentes químicos inducen cáncer a través de otros mecanismos celulares y moleculares, es por esto que algunas sustancias químicas se han denominada como carcinógenos no genotóxicos, que corresponde a un grupo diverso de compuestos que se asocian con las patologías tumorales pero que su mecanismo de acción principalmente está vinculado con mecanismos epigenéticos (89). Dentro de las anomalías epigenéticas relacionadas al tabaquismo, se encuentra la metilación del ADN, principalmente, producto de esta exposición se han descrito estados de hipometilación global. La hipometilación global facilita la inestabilidad genómica, incrementa la susceptibilidad a mutaciones, se asocia con reactivación de elementos de retrotransposición y activación de oncogenes (90). Como una

primera aproximación para determinar los efectos de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos, se puede tomar como punto de partida evaluar los efectos conocidos para los cigarrillos convencionales de tabaco tanto a nivel genético como epigenético.

Como resultado de los análisis del impacto a nivel genético, en este trabajo se evidenció que los sujetos expuestos al aerosol del cigarrillo electrónico presentan una mayor frecuencia de MN y marcas de genotoxicidad (MN, NBUDs, NPBs) respecto a los controles no expuestos. Estos resultados son congruentes y refuerzan con evidencia del impacto en humanos. Algunos hallazgos observados en el modelo animal de rata expuesta al aerosol de los cigarrillos electrónicos, demostraron que a nivel pulmonar existía daño oxidativo en el ADN a través de la identificación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). Asimismo, este daño fue evaluado a nivel de sangre periférica de estos modelos animales en los que, mediante el ensayo de cometa y micronúcleos, se observó un incremento en los niveles de daño genotóxico en las ratas que estuvieron expuestas al aerosol de estos dispositivos (91). Adicionalmente, en un estudio *in vitro* en las líneas celulares HaCaT (Queratinocitos), UMSCC10B (Carcinoma de células escamosas de la laringe) y HN30 (Carcinoma de células escamosas faríngeas y cavidad oral) expuestas a extractos del aerosol de los dispositivos con nicotina y sin nicotina, reveló la existencia de altos niveles de genotoxicidad a través del ensayo de cometa y la detección de la variante de histonas γ -H2AX, lo que indica un aumento de las roturas del ADN (92).

Muchas de las posibles explicaciones por las cuales existe un incremento de daño a nivel del ADN se centran directamente con las sustancias y compuestos químicos presentes en el aerosol de estos dispositivos. Algunos de los compuestos de cigarrillos electrónicos que se describen como agentes genotóxicos son: formaldehído, metales, nitrosaminas específicas del tabaco (TNSA), compuestos orgánicos volátiles (COV), compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), saborizantes y alcaloides menores del tabaco. El formaldehído es capaz de inducir monoadductos de N-hidroximetil en guanina, adenina y citosina, y enlaces cruzados (*crosslinks*) de N-metileno entre purinas adyacentes en el ADN, estos enlaces cruzados corresponden a tipos de daño en el ADN potencialmente graves para la supervivencia celular, especialmente, si no son reparados por vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (93). Por otra parte, algunos de los metales presentes en la bobina de calentamiento de estos dispositivos se han asociado con la generación de monoadductos y roturas de cadena sencilla. Además, los compuestos orgánicos como las nitrosaminas generan monoadductos en el ADN y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se caracterizan por la formación de adductos (94) Los HAP en sí mismos son biológicamente inertes, y sus efectos genotóxicos requieren la

activación metabólica de intermediarios biológicamente reactivos, que modifican covalentemente el ADN y son responsables de la formación de estos aductos (95).

Asimismo, algunos compuestos presentes en los saborizantes, como el cinamaldehído, se han asociado con un potencial genotóxico debido a la presencia de α y β aldehídos insaturados en su estructura; estos aldehídos son electrofílicos y pueden reaccionar con macromoléculas como el ADN, lo que facilita la formación de aductos. De hecho, se han informado estudios que demuestran que el cinamaldehído muestra resultados positivos en las pruebas de genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (96). Las EROs tienen un rol fundamental para la generación de daños oxidativos, roturas en el ADN de doble cadena (DSBs: por sus siglas en inglés *double strand breaks*), cadena sencilla y una respuesta inflamatoria exacerbada en estudios de células epiteliales humanas y de ratón expuestas al aerosol y líquido de los cigarrillos electrónicos (47).

Nuestros resultados muestran que aquellos sujetos de investigación expuestos al aerosol de dispositivos electrónicos presentan mayores niveles de genotoxicidad respecto a personas no expuestas pareadas por edad y sexo, lo que lleva a establecer que es probable que estas diferencias sean producto de que el cigarrillo electrónico incrementa los niveles de exposición a cada uno de estos agentes químicos con potencial genotóxico.

Es importante considerar que los ensayos de genotoxicidad, como CBMN, son influenciados por diversas variables como la edad, el sexo, el índice de masa corporal (IMC), factores del estilo de vida y antecedentes familiares de cáncer. Algunos estudios han caracterizado los resultados de los análisis del ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica en una cohorte de la población general, con el fin de estandarizar algunos valores de referencia para los estudios de biomonitoreo (94). Goran *et al*, realizaron un análisis de 200 sujetos de investigación de la población en general, en donde se evidenció una frecuencia de MN de $5,06 \pm 3,11$ por 1000 células binucleadas, mientras que la frecuencia de NPBs fue de $1,21 \pm 1,46$ y de NBUD $3,48 \pm 2,14$ respectivamente (97). Nuestros resultados en los sujetos de investigación correspondientes al grupo control evidencian una frecuencia por cada 1000 células binucleadas de MN de $11,16 \pm 5,19$, NPBs de $0,09 \pm 0,296$ y NBUDs de $1,72 \pm 1,61$. Por otra parte, los sujetos de investigación correspondientes al grupo de Vapeadores muestran una frecuencia por cada 1000 células binucleadas de MN de $14,06 \pm 6,48$, NPBs de $0,09 \pm 0,39$ y NBUDs de $1,97 \pm 1,94$. Si se realiza una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo frente a los estándares publicados para este ensayo, nuestra población control y de vapeadores presenta un aumento en la frecuencia de MN. Probablemente, este incremento se puede relacionarse con

alguna de las variables no controladas en nuestras poblaciones como el IMC, antecedentes familiares de cáncer, variables asociadas al estilo de vida como calidad de aire del sitio de residencia, el consumo de alcohol, la actividad física, la exposición a medicamentos y exposición a radiación por procesos diagnósticos, siendo esto una limitante para nuestros resultados.

Sin embargo, si bien los ensayos de CBMN aquí reportados pueden estar influenciados en parte por estos factores de variabilidad individual, la evidencia actual en diferentes modelos biológicos respalda nuestros hallazgos de indicios de genotoxicidad asociada a la exposición del cigarrillo electrónico. Adicionalmente, para este trabajo se tuvo en cuenta dos de las variables con mejor evidencia de alterar la genotoxicidad como un criterio para aparear a cada uno de los sujetos de investigación pertenecientes tanto al grupo de vapeadores como de controles, siendo estas la edad y sexo, en los análisis determinados como *fold change* MN y genotoxicidad, los cuales muestran la variación de cada uno de los usuarios vapeadores respecto a su control apareado (misma edad y mismo sexo). El efecto del envejecimiento sobre la frecuencia de MN posiblemente debido a la acumulación del daño en el genoma dependiente de la edad, relacionando una mayor edad con mayor índice de MN tanto en hombres como en mujeres (97). En el caso del análisis del género, se ha descrito que las mujeres presentan una frecuencia de MN superior a la de los hombres (98).

Otra de las utilidades que se le ha dado al ensayo de micronúcleos, es implementarlo como un biomarcador de detección temprana acerca del efecto genotóxico del tabaquismo (99). En un estudio realizado por Asmaa *et al*, se identificaron en 78 fumadores y 70 sujetos no fumadores la frecuencia de micronúcleos a través del ensayo de CBMN. Los sujetos fumadores mostraron una mediana de 4 MN con un rango total (0-16 MN) frente a 2 en los no fumadores con un rango total (0-8 MN). Asimismo, a través del análisis de regresión lineal múltiple, se identificaron que variables como continuas como el índice paquete año (IPA) y duración del tabaquismo en años, podría correlacionarse con una alta puntuación en el ensayo de MN con diferencias estadísticamente significativas (99).

Si bien en nuestros resultados en una cohorte de controles, vapeadores y fumadores, cada uno apareado por edad y género, no se evidenciaron diferencias en el grupo de fumadores respecto a los parámetros de frecuencia de MN y genotoxicidad, esto puede atribuirse a que la cohorte de sujetos fumadores son jóvenes clasificados como fumadores leves (consumo de menos de 5 cigarrillos diarios), lo que es respaldado por los análisis cuantitativos de cotinina sérica y

determinación de IPA. Otra posibilidad para este efecto observado podría ser que en esta población joven se genera una respuesta adaptativa a la exposición crónica al humo del cigarrillo especialmente frente al estrés oxidativo (100).

Por otra parte, en nuestros resultados no se encontraron diferencias en la frecuencia de genotoxicidad según algunas variables de consumo de cigarrillo electrónico como niveles de cotinina, años de consumo y potencia del dispositivo. Este hecho puede deberse probablemente a un efecto de la dificultad de la categorización de estas variables continuas. Esto se confirma mediante los análisis de correlación lineal donde se evidencia que existe una posible relación dosis-respuesta entre el número de caladas/día y la genotoxicidad normalizada. Otra posible explicación es la existencia de otros factores del consumo y de los dispositivos, compuestos químicos inhalados, respuesta del huésped frente a esta exposición o incluso variables clínicas y asociadas al estilo de vida.

Debido a que el número aproximado de caladas/día podría representar una medida de frecuencia de uso de estos dispositivos, se podría inferir que a un mayor uso de los cigarrillos electrónicos existen mayores niveles de genotoxicidad. En estudios *in vitro* de células epiteliales orales y pulmonares expuestas al condensado del aerosol de los cigarrillos electrónicos se observó una inducción de daño en el ADN de manera dependiente de la dosis, observando incremento en los niveles de daño oxidativo del ADN en ambas líneas celulares para dosis equivalentes a 10 y 100 puffs o caladas (60).

De manera interesante, cuando se comparan los niveles de genotoxicidad entre los grupos de vapeadores mixtos y exclusivos no se evidencian diferencias entre los grupos, lo cual llama la atención debido a que se esperaría un impacto a nivel genético mayor en vapeadores mixtos relacionado con los compuestos químicos presentes en el humo de los cigarrillos de tabaco. No obstante, el uso exclusivo de los cigarrillos electrónicos fue suficiente y necesario para inducir daño a nivel del ADN. Estudios *in vitro* de líneas celulares determinaron que los niveles de daño oxidativo del ADN eran similares o ligeramente más altos después de la exposición al aerosol de estos dispositivos en comparación con los extractos de humo de cigarrillo convencional (60), estos resultados y antecedentes muestran que la exposición ambiental al aerosol de los cigarrillos electrónicos puede inducir daños a nivel de ADN.

El humo del cigarrillo convencional se considera uno de los factores ambientales que más se han asociado con modulación de la metilación del ADN a través del daño directo al ADN y en consecuencia el reclutamiento de DNMTs (DNA metiltransferasas) a los sitios de reparación.

Esta modulación epigenética se ha asociado a carcinógenos como el arsénico, el cromo, el formaldehído, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas. Asimismo, el humo del cigarrillo convencional puede alterar la metilación del ADN indirectamente a través de la modulación y expresión de factores de unión al ADN, como Sp1. Esta proteína, es un factor de transcripción común que se une a motivos ricos en GC en regiones promotoras y previene la metilación *de novo* durante la embriogénesis (10).

En el presente estudio, en el grupo de sujetos vapeadores se evidenció una pérdida significativa de los niveles de metilación del ADN en los elementos repetitivos *LINE-1* en comparación con los controles. Por el contrario, los niveles de metilación de *LINE-1* identificados en este trabajo para el grupo de fumadores, no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con el grupo control, lo que probablemente puede ser atribuido a lo mencionado anteriormente en donde los sujetos de investigación pertenecientes a este grupo se clasifican como fumadores leves.

Teniendo en cuenta que los elementos repetitivos en el ADN representan casi un 50% del genoma humano, estos resultan ser un indicador de más de un tercio de los niveles de metilación global (102). La metilación del ADN cumple la función de proteger la integridad del genoma al reprimir la actividad de los elementos transponibles móviles. Estos elementos transponibles, normalmente se encuentran hipermetilados, lo que resulta en su silenciamiento transcripcional. Dado que la maquinaria de transposición requiere enzimas codificadas dentro de los elementos transponibles, la represión transcripcional de estos elementos previene eficazmente los fenómenos de translocaciones (10).

Los resultados obtenidos en este trabajo soportan la idea de que la exposición ambiental al aerosol de los cigarrillos electrónicos y sus productos químicos asociados, se correlacionan con cambios aberrantes en el epigenoma induciendo una pérdida de metilación en los elementos repetitivos *LINE-1*. Estos resultados son respaldados por algunos estudios donde se han evidenciado cambios en los patrones de metilación del ADN tras la exposición a dosis bajas de compuestos como el benceno, también presente en el aerosol del cigarrillo electrónico, revelando una reducción significativa de la metilación en *LINE-1* (103). Incluso, algunos estudios *in vitro* y en modelos animales también han confirmado que los agentes cancerígenos inducen cambios en los niveles de metilación del ADN en los tejidos normales similares a los que se encuentran en las células tumorales (104).

Un estudio realizado por Caliri *et al*, brindó una primera evidencia de la asociación entre el vapeo y la pérdida de los niveles de metilación del ADN en humanos, donde a partir de muestras de sangre periférica de vapeadores, fumadores y personas no fumadoras, se analizaron los niveles de metilación (5-mC) en los elementos *LINE-1*. Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de la metilación (5-mC) en los elementos *LINE-1* de vapeadores en un 18% y fumadores en un 13%, en comparación con el control de no fumadores, sin diferencia significativa entre vapeadores y fumadores. Adicionalmente, se cuantificó la desmetilación mediante la cuantificación hidroximetilación (5-hmC) global del ADN, mostrando una disminución tanto en vapeadores (66%) como en fumadores de tabaco (88%) (103).

Finalmente, los resultados de este estudio muestran que existe una correlación negativa entre los niveles de cotinina sérica y los niveles de metilación de *LINE-1*. Estos resultados podrían explicarse de acuerdo a lo que se ha descrito para el cigarrillo convencional, en donde se ha visto que la reducción de los niveles de metilación global puede deberse en parte a la regulación negativa de enzimas DNMT causada por la nicotina (105). Incluso, estos efectos mostraron que usuarios que se encuentran en la categoría de vapeadores exclusivos presentan menores niveles de metilación en comparación con vapeadores mixtos. Los resultados descritos para los análisis de metilación demuestran entonces el impacto del uso del cigarrillo electrónico a nivel epigenético, revelando una posible influencia del aerosol de estos dispositivos sobre los mecanismos epigenéticos asociados a la metilación del ADN.

8. Conclusiones

Actualmente existen muy pocos estudios que determinen el impacto biológico del uso de los cigarrillos electrónico, no obstante, los reportes en la literatura que tienen por objetivo estimar la magnitud de las consecuencias para la salud de estos dispositivos están basados principalmente en modelos animales y estudios de líneas celulares.

Nuestros experimentos parten de muestras de sangre periférica de sujetos de investigación correspondientes a los grupos de vapeadores, fumadores y controles, en los que se llevaron a cabo análisis de genotoxicidad mediante el ensayo de CBMN y análisis de metilación del ADN en las regiones *LINE-1*, por lo tanto, estos resultados corresponden a una primera aproximación del impacto genético y epigenético del uso de los cigarrillos electrónicos.

Hemos demostrado que existe un aumento en los niveles de genotoxicidad producto del uso de los dispositivos electrónicos en comparación con el grupo de sujetos de investigación control, incluso estos efectos se vieron en el grupo de vapeadores de manera independiente a si los usuarios alternaban el consumo de los dispositivos electrónicos con el uso de cigarrillos convencionales, mostrando que vapear corresponde a un factor de riesgo para tener altos niveles de genotoxicidad.

Adicionalmente, encontramos que producto de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos se generan alteraciones epigenéticas importantes, especialmente aquellas relacionadas con la pérdida de metilación de los elementos *LINE-1* en la población de vapeadores.

Nuestros hallazgos destacan la importancia del estudio de los efectos genéticos y epigenéticos del vapeo para determinar las consecuencias del uso de los cigarrillos electrónicos en la salud. Este trabajo proporciona evidencia científica que sugiere que los cigarrillos electrónicos no son del todo inocuos y que pese a su diversidad de características comparten potenciales riesgos.

9. Perspectivas y recomendaciones

- Este estudio corresponde a una primera aproximación del impacto del uso de los cigarrillos electrónicos. Por lo tanto, se recomienda más investigación para determinar los efectos a largo plazo del uso de los cigarrillos electrónicos, así como el daño en el ADN y los cambios a nivel de metilación de los elementos *LINE-1*.
- Realizar metodologías complementarias a los análisis de genotoxicidad como el ensayo de cometa, con el fin de identificar daños en el ADN no reconocidos por la técnica de micronúcleos (CBMN).
- Este trabajo forma parte de un proyecto financiado que también contempla la realización de análisis de transcriptómica y la determinación de expresión de *LINE-1* en usuarios de cigarrillo electrónico.
- Este trabajo incluyó en el diseño de estudio, sujetos pareados por edad y sexo para evitar algunos factores de confusión en cada uno de los análisis. Sin embargo, los resultados mostrados dependen de factores genéticos, variables clínicas, demográficas y asociadas al estilo de vida que no fueron tomadas en cuenta. Para futuros análisis de este proyecto de impacto ambiental producto de la exposición al aerosol de los cigarrillos electrónicos

se recomienda tener en cuenta más variables y factores alineados que se puedan asociar con los resultados obtenidos.

- Se recomienda ampliar el número de sujetos de investigación correspondientes al grupo de fumadores de cigarrillo convencional para determinar diferencias entre el consumo de cigarrillos convencionales y cigarrillos electrónicos.
- Este proyecto reunió información que podría ser analizada en estudios posteriores sobre el historial asociado al consumo de los cigarrillos electrónicos en una población colombiana, en donde se cuenta con información asociada a factores como: razones de uso, edad de inicio de consumo de cigarrillo electrónico, tipo de dispositivo, características específicas del dispositivo, marcas de dispositivos y saborizantes más frecuentes.
- Como parte de las actividades de nuestro grupo de investigación se pretende socializar en la comunidad no científica de todas las edades los riesgos del uso de los cigarrillos electrónicos para crear concientización respecto al uso de estos dispositivos, y por ende contribuir a la realización de un consumo consciente por parte de los usuarios de estos dispositivos.

10. Bibliografía

1. Shi H, Fan X, Horton A, Haller ST, Kennedy DJ, Schiefer IT, et al. The Effect of Electronic-Cigarette Vaping on Cardiac Function and Angiogenesis in Mice. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):4085. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40847-5>
2. The debate over e-cigarettes demands stronger evidence of their value. *Nature*. el 27 de junio de 2019;570(7762):415.
3. Rahman MA, Hann N, Wilson A, Worrall-Carter L. Electronic cigarettes: patterns of use, health effects, use in smoking cessation and regulatory issues. *Tob Induc Dis* [Internet]. 2014 [citado el 31 de enero de 2022];12(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25745382/>
4. Polosa R, Cibella F, Caponnetto P, Maglia M, Prosperini U, Russo C, et al. Health impact of E-cigarettes: A prospective 3.5-year study of regular daily users who have never smoked. *Sci Rep*. 2017;
5. Niederbacher N, Bermudez Gisella L, González Mauricio D, Bernal C, García F, León D, et al. Electronic cigarettes: Genetic and epigenetic impact (Review). *Int J Epigen* [Internet]. 2021;1(1):2. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/ije.2021.2>
6. Stratton K, Kwan LY, Eaton DL. Public Health Consequences of E-Cigarettes. Stratton K, Kwan LY, Eaton DL, editores. Washington, D.C.: National Academies Press; 2018.
7. Wogan GN. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1992 [citado el 31 de

- enero de 2022];98:167–78. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1486846/>
8. JW M, L C-M, Ó B-G, MA M, JF Á, JA L, et al. Tobacco consumption in the population of Risaralda, Colombia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* [Internet]. el 23 de marzo de 2020 [citado el 31 de enero de 2022];58(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34543546/>
 9. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* [Internet]. abril de 2007 [citado el 31 de enero de 2022];8(4):253–62. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17363974/>
 10. Lee KWK, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet* [Internet]. 2013 [citado el 31 de enero de 2022];4(JUL). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2471111/>
 11. Shi H, Fan X, Horton A, Haller ST, Kennedy DJ, Schiefer IT, et al. The Effect of Electronic-Cigarette Vaping on Cardiac Function and Angiogenesis in Mice. *Sci Reports* 2019 91 [Internet]. el 11 de marzo de 2019 [citado el 31 de enero de 2022];9(1):1–9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-40847-5>
 12. Kong G, Krishnan-Sarin S. A call to end the epidemic of adolescent E-cigarette use. *Drug Alcohol Depend* [Internet]. el 1 de mayo de 2017 [citado el 1 de febrero de 2022];174:215. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2811111/>
 13. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC). III Estudio epidemiológico andino sobre consumo de drogas en la población universitaria de Colombia , 2016 Junio de 2017 III. 2017.
 14. Surgeon General’s Advisory on E-cigarette Use Among Youth | Smoking & Tobacco Use | CDC [Internet]. [citado el 10 de marzo de 2022]. Disponible en: https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/surgeon-general-advisory/index.html
 15. Cullen KA, Ambrose BK, Gentzke AS, Apelberg BJ, Jamal A, King BA. Notes from the Field: Use of Electronic Cigarettes and Any Tobacco Product Among Middle and High School Students — United States, 2011–2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. el 16 de noviembre de 2020 [citado el 30 de enero de 2022];67(45):1276–7. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6745a5.htm>
 16. Werner AK, Koumans EH, Chatham-Stephens K, Salvatore PP, Armatas C, Byers P, et al. Hospitalizations and Deaths Associated with EVALI. *N Engl J Med* [Internet]. el 23 de abril de 2020 [citado el 10 de marzo de 2022];382(17):1589–98. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1915314>
 17. Salzman GA, Alqawasma M, Asad H. Vaping Associated Lung Injury (EVALI): An Explosive United States Epidemic. *Mo Med* [Internet]. 2019 [citado el 30 de enero de 2022];116(6):492. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31491072/>
 18. Layden JE, Ghinai I, Pray I, Kimball A, Layer M, Tenforde MW, et al. Pulmonary Illness Related to E-Cigarette Use in Illinois and Wisconsin - Final Report. *N Engl J Med* [Internet]. el 5 de marzo de 2020 [citado el 1 de febrero de 2022];382(10):903–16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31491072/>
 19. Lee KWK, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet*. 2013;4(JUL):132.
 20. Caporaso N, Gu F, Chatterjee N, Sheng-Chih J, Yu K, Yeager M, et al. Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *PLoS One*. 2009;4(2).
 21. Tsai P-C, Glastonbury CA, Eliot MN, Bollepalli S, Yet I, Castillo-Fernandez JE, et al. Smoking induces coordinated DNA methylation and gene expression changes in adipose tissue with consequences for metabolic health. *Clin Epigenetics* [Internet]. el 20 de diciembre de 2019 [citado el 31 de enero de 2022];11(1):1–10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34543546/>

- 2018 [citado el 1 de febrero de 2022];10(1):126. Disponible en:
<https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-018-0558-0>
22. U.S. Department of Health and Human Services. E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: A Report of the Surgeon General. US Dep Heal Hum Serv Centers Dis Control Prev Natl Cent Chronic Dis Prev Heal Promot Off Smok Heal [Internet]. 2016;1–298. Disponible en: https://e-cigarettes.surgeongeneral.gov/documents/2016_SGR_Full_Report_non-508.pdf
 23. Benowitz NL, Fraiman JB. Cardiovascular effects of electronic cigarettes. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2017;14(8):447–56. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.36>
 24. CFR - Code of Federal Regulations Title 21 [Internet]. [citado el 28 de enero de 2022]. Disponible en:
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1666>
 25. Hutzler C, Paschke M, Kruschinski S, Henkler F, Hahn J, Luch A. Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes. *Arch Toxicol* [Internet]. 2014 [citado el 28 de enero de 2022];88(7):1295–308. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24958024/>
 26. Feirman SP, Lock D, Cohen JE, Holtgrave DR, Li T. Flavored Tobacco Products in the United States: A Systematic Review Assessing Use and Attitudes. *Nicotine Tob Res* [Internet]. el 1 de mayo de 2016 [citado el 28 de enero de 2022];18(5):739–49. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26315475/>
 27. Zhu SH, Sun JY, Bonnevie E, Cummins SE, Gamst A, Yin L, et al. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control* [Internet]. el 1 de julio de 2014 [citado el 28 de enero de 2022];23 Suppl 3(Suppl 3):iii3–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24935895/>
 28. Kreiss K, Goma A, Kullman G, Fedan K, Simoes EJ, Enright PL. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant. *N Engl J Med* [Internet]. agosto de 2002 [citado el 28 de enero de 2022];347(5):330–8. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12151470/>
 29. Behar RZ, Luo W, Lin SC, Wang Y, Valle J, Pankow JF, et al. Distribution, quantification and toxicity of cinnamaldehyde in electronic cigarette refill fluids and aerosols. *Tob Control* [Internet]. 2016 [citado el 28 de enero de 2022];25(Suppl 2):ii94–102. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27633763/>
 30. Kosmider L, Sobczak A, Prokopowicz A, Kurek J, Zaciera M, Knysak J, et al. Cherry-flavoured electronic cigarettes expose users to the inhalation irritant, benzaldehyde. *Thorax* [Internet]. el 1 de abril de 2016 [citado el 28 de enero de 2022];71(4):376–7. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26822067/>
 31. MAK Values 2012 (PDF komplett) - List of MAK and BAT Values 2012 - Wiley Online Library [Internet]. [citado el 28 de enero de 2022]. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527666034.oth01>
 32. Soussy S, El-Hellani A, Baalbaki R, Salman R, Shihadeh A, Saliba NA. Detection of 5-hydroxymethylfurfural and furfural in the aerosol of electronic cigarettes. *Tob Control* [Internet]. 2016 [citado el 28 de enero de 2022];25(Suppl 2):ii88–93. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27798321/>
 33. Herrington JS, Myers C. Electronic cigarette solutions and resultant aerosol profiles. *J Chromatogr A*. octubre de 2015;1418:192–9.
 34. Aherrera A, Olmedo P, Grau-Perez M, Tanda S, Goessler W, Jarmul S, et al. The association of e-cigarette use with exposure to nickel and chromium: A preliminary study of non-invasive biomarkers. *Environ Res*. el 1 de noviembre de 2017;159:313–20.

35. International Agency for Research on Cancer. Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. Vol. 1989, IARC Monographs: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts in a Review of Human Carcinogens. 2012. 147–168 p.
36. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* [Internet]. el 1 de junio de 2014 [citado el 29 de enero de 2022];7(2):60–72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26109881/>
37. Sandhu A, Hosseini SA, Saadabadi A. Nicotine. *Encycl Mov Disord* [Internet]. el 6 de agosto de 2021 [citado el 28 de enero de 2022];299–301. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493148/>
38. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA); 2014.
39. Gorrod JW (John W., Jacob P. Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites. 1999;758.
40. Electronic Cigarettes [Internet]. [citado el 30 de enero de 2022]. Disponible en: https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/index.htm
41. FDA’s Deeming Regulations for E-Cigarettes, Cigars, and All Other Tobacco Products | FDA [Internet]. [citado el 30 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/tobacco-products/rules-regulations-and-guidance/fdas-deeming-regulations-e-cigarettes-cigars-and-all-other-tobacco-products>
42. Alexander JP, Coleman BN, Johnson SE, Tessman GK, Tworek C, Dickinson DM. Smoke and Vapor: Exploring the Terminology Landscape among Electronic Cigarette Users. *Tob Regul Sci* [Internet]. el 26 de junio de 2016 [citado el 30 de enero de 2022];2(3):204. Disponible en: </pmc/articles/PMC4944844/>
43. Belok SH, Parikh R, Bernardo J, Kathuria H. E-cigarette, or vaping, product use-associated lung injury: a review. *Pneumonia* [Internet]. diciembre de 2020 [citado el 30 de enero de 2022];12(1). Disponible en: </pmc/articles/PMC7585559/>
44. Mohamed S, Sabita U, Rajendra S, Raman D. Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Glob J Pharm Pharm Sci*. el 27 de abril de 2017;1(5).
45. Nagarathna PKM, Wesley M, Reddy P, Reena K. Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. *Int J Pharm Sci Rev Res*. el 1 de octubre de 2013;22:236–43.
46. Mohamed S, Sabita U, Rajendra S, Raman D. Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Glob J Pharm Pharm Sci*. abril de 2017;1(5).
47. Lerner CA, Sundar IK, Yao H, Gerloff J, Ossip DJ, McIntosh S, et al. Vapors produced by electronic cigarettes and E-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS One*. el 6 de febrero de 2015;10(2).
48. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes (Basel)* [Internet]. el 1 de octubre de 2020 [citado el 31 de enero de 2022];11(10):1–13. Disponible en: </pmc/articles/PMC7602810/>
49. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* [Internet]. 2007;2(5):1084–104. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
50. Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nozima BHN, Ito ET, et al. Using the

- comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.* el 1 de mayo de 2015;72:74–82.
51. Thomas P, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2011 [citado el 22 de enero de 2022];682:217–34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21057931/>
 52. *Environmental Mycology in Public Health. Environ Mycol Public Heal.* 2016;
 53. Oobatake Y, Shimizu N. Double-strand breakage in the extrachromosomal double minutes triggers their aggregation in the nucleus, micronucleation, and morphological transformation. *Genes, Chromosom Cancer* [Internet]. el 1 de marzo de 2020 [citado el 31 de enero de 2022];59(3):133–43. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gcc.22810>
 54. Ae DKM, Whitelaw E. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans.
 55. David Allis C, Caparros M-L, Jenuwein T, Reinberg D, Lachner M. *Epigenetics*, Second edition. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, editor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
 56. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429(6990):457–63.
 57. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23–38.
 58. Chlamydas S, Papavassiliou AG, Piperi C. Epigenetic mechanisms regulating COVID-19 infection. *Epigenetics.* 2020;16(3):263–70.
 59. Zhang X, Zhang R, Yu J. New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. *Front cell Dev Biol* [Internet]. el 7 de agosto de 2020;8:657. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850797>
 60. Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran J V. LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2011;12:187–215. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21801021>
 61. Benard A, van de Velde CJH, Lessard L, Putter H, Takeshima L, Kuppen PJK, et al. Epigenetic status of LINE-1 predicts clinical outcome in early-stage rectal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2013;109(12):3073–83. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.654>
 62. Park SJ, Walser TC, Perdomo C, Wang T, Pagano PC, Licican EL, et al. Abstract B16: The effect of e-cigarette exposure on airway epithelial cell gene expression and transformation. *Clin Cancer Res.* el 15 de enero de 2014;20(2 Supplement):B16–B16.
 63. Cressey D. E-cigarettes affect cells. Vol. 508, *Nature.* 2014. p. 159.
 64. Ganapathy V, Manyanga J, Brame L, McGuire D, Sadhasivam B, Floyd E, et al. Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. *PLoS One.* el 1 de mayo de 2017;12(5).
 65. Tommasi S, Bates SE, Behar RZ, Talbot P, Besaratinia A. Limited mutagenicity of electronic cigarettes in mouse or human cells in vitro. *Lung Cancer.* el 1 de octubre de 2017;112:41–6.
 66. Martin EM, Clapp PW, Rebuli ME, Pawlak EA, Glista-Baker E, Benowitz NL, et al. E-cigarette use results in suppression of immune and inflammatory-response genes in nasal epithelial cells similar to cigarette smoke. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* el 1 de julio de 2016;311(1):L135–44.
 67. Lechasseur A, Jubinville E, Routhier J, Erub E J-CB, Elanie Hamel-Auger M, Talbot M, et al.

- Exposure to electronic cigarette vapors affects pulmonary and systemic expression of circadian molecular clock genes. *Physiol Rep* [Internet]. 2017 [citado el 10 de abril de 2020];5(19). Disponible en: <https://doi.org/10.14814/phy2.13440>
68. Khan NA, Yogeswaran S, Wang Q, Muthumalage T, Sundar IK, Rahman I. Waterpipe smoke and e-cigarette vapor differentially affect circadian molecular clock gene expression in mouse lungs. *PLoS One*. el 1 de febrero de 2019;14(2).
 69. Solleti SK, Bhattacharya S, Ahmad A, Wang Q, Mereness J, Rangasamy T, et al. MicroRNA expression profiling defines the impact of electronic cigarettes on human airway epithelial cells. *Sci Rep*. el 1 de diciembre de 2017;7(1).
 70. Kennedy AE, Kandalam S, Olivares-Navarrete R, Dickinson AJG. E-cigarette aerosol exposure can cause craniofacial defects in *Xenopus laevis* embryos and mammalian neural crest cells. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185729.
 71. Heckathorn DD. Comment: Snowball versus respondent-driven sampling. *Sociol Methodol* [Internet]. agosto de 2011 [citado el 21 de enero de 2022];41(1):355–66. Disponible en: </pmc/articles/PMC3250988/>
 72. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O’Neal L, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform*. julio de 2019;95:103208.
 73. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. abril de 2009;42(2):377–81.
 74. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2009 [citado el 22 de enero de 2022];192(192):29. Disponible en: </pmc/articles/PMC2953858/>
 75. Benowitz NL, Bernert JT, Caraballo RS, Holiday DB, Wang J. Optimal Serum Cotinine Levels for Distinguishing Cigarette Smokers and Nonsmokers Within Different Racial/Ethnic Groups in the United States Between 1999 and 2004. *Am J Epidemiol* [Internet]. el 15 de enero de 2009 [citado el 22 de enero de 2022];169(2):236–48. Disponible en: <https://academic.oup.com/aje/article/169/2/236/95727>
 76. Andersen AM, Dogan M V., Beach SRH, Philibert RA. Current and Future Prospects for Epigenetic Biomarkers of Substance Use Disorders. *Genes (Basel)* [Internet]. el 14 de octubre de 2015 [citado el 22 de enero de 2022];6(4):991. Disponible en: </pmc/articles/PMC4690026/>
 77. Biomonitoring Summary | CDC [Internet]. [citado el 1 de febrero de 2022]. Disponible en: https://www.cdc.gov/biomonitoring/Cotinine_BiomonitoringSummary.html
 78. Lobo TM, Bolaños A. Micronúcleos: Biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*. 2014;18(2):18–26.
 79. Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. *Curr Protoc Hum Genet* [Internet]. 2015 [citado el 22 de enero de 2022];85:8.7.1. Disponible en: </pmc/articles/PMC4408609/>
 80. García-Ortiz MV, Torre-Aguilar MJ de la, Morales-Ruiz T, Gómez-Fernández A, Flores-Rojas K, Gil-Campos M, et al. Analysis of Global and Local DNA Methylation Patterns in Blood Samples of Patients With Autism Spectrum Disorder. *Front Pediatr*. el 5 de octubre de 2021;9:1066.
 81. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* [Internet]. octubre de 2009 [citado el 23 de enero de 2022];10(10):691. Disponible en: </pmc/articles/PMC2884099/>

82. Šestáková Š, Šálek C, Remešová H. DNA Methylation Validation Methods: A Coherent Review with Practical Comparison. *Biol Proced Online* [Internet]. el 1 de octubre de 2019 [citado el 23 de enero de 2022];21(1):1–11. Disponible en: <https://biologicalproceduresonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12575-019-0107-z>
83. Fazio C, Covre A, Cutaia O, Lofiego MF, Tunici P, Chiarucci C, et al. Immunomodulatory properties of DNA hypomethylating agents: Selecting the optimal epigenetic partner for cancer immunotherapy. *Front Pharmacol* [Internet]. el 1 de enero de 2018 [citado el 23 de enero de 2022];9. Disponible en: </pmc/articles/PMC6293200/>
84. Li C, Yang X, Xu M, Zhang J, Sun N. Epigenetic marker (LINE-1 promoter) methylation level was associated with occupational lead exposure. *Clin Toxicol (Phila)* [Internet]. mayo de 2013 [citado el 23 de enero de 2022];51(4):225–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23528182/>
85. Nance R, Delaney J, McEvoy JW, Blaha MJ, Burke GL, Navas-Acien A, et al. Smoking intensity [pack/day] is a better measure than pack-years or smoking status for modeling cardiovascular disease outcomes. *J Clin Epidemiol* [Internet]. el 1 de enero de 2017 [citado el 24 de enero de 2022];81:111. Disponible en: </pmc/articles/PMC5318261/>
86. Ebersole J, Samburova V, Son Y, Cappelli D, Demopoulos C, Capurro A, et al. Harmful chemicals emitted from electronic cigarettes and potential deleterious effects in the oral cavity. *Tob Induc Dis* [Internet]. el 8 de mayo de 2020;18:41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32435175>
87. Yamaguchi NH. Smoking, immunity, and DNA damage. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2019 [citado el 1 de febrero de 2022];8(Suppl 1):S3. Disponible en: </pmc/articles/PMC6546629/>
88. Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, Van Loo P, Martincorena I, Nik-Zainal S, et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*. noviembre de 2016;354(6312):618–22.
89. Ravegnini G, Sammarini G, Hrelia P, Angelini S. Key Genetic and Epigenetic Mechanisms in Chemical Carcinogenesis. *Toxicol Sci* [Internet]. el 1 de noviembre de 2015 [citado el 2 de febrero de 2022];148(1):2–13. Disponible en: <https://academic.oup.com/toxsci/article/148/1/2/1659557>
90. Koturbash I, Beland FA, Pogribny IP. Role of epigenetic events in chemical carcinogenesis—a justification for incorporating epigenetic evaluations in cancer risk assessment. <http://dx.doi.org/10.3109/153765162011557881> [Internet]. mayo de 2011 [citado el 2 de febrero de 2022];21(4):289–97. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15376516.2011.557881>
91. Canistro D, Vivarelli F, Cirillo S, Marquillas CB, Buschini A, Lazzaretti M, et al. E-cigarettes induce toxicological effects that can raise the cancer risk. *Sci Reports* 2017 71 [Internet]. el 17 de mayo de 2017 [citado el 3 de febrero de 2022];7(1):1–9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-02317-8>
92. Yu V, Rahimy M, Korrapati A, Xuan Y, Zou AE, Krishnan AR, et al. Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines. *Oral Oncol* [Internet]. el 1 de enero de 2016 [citado el 3 de febrero de 2022];52:58. Disponible en: </pmc/articles/PMC4891196/>
93. Kawanishi M, Matsuda T, Yagi T. Genotoxicity of formaldehyde: Molecular basis of DNA damage and mutation. *Front Environ Sci*. el 16 de septiembre de 2014;2(SEP):36.
94. Barros SB de M. Toxicologia. *Rev Bras Ciências Farm*. 2002;38(4):500–500.

95. Huang M, Blair IA, Penning TM. Identification of stable benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA adducts in human lung cells. *Chem Res Toxicol* [Internet]. el 20 de mayo de 2013 [citado el 3 de febrero de 2022];26(5):685–92. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/tx300476m>
96. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama K ichi, Masumura K. In vivo and in vitro mutagenicity of perillaldehyde and cinnamaldehyde. *Genes Environ* [Internet]. el 1 de diciembre de 2021 [citado el 3 de febrero de 2022];43(1):1–11. Disponible en: <https://genesenvironment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41021-021-00204-3>
97. Gajski G, Gerić M, Oreščanin V, Garaj-Vrhovac V. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in peripheral blood lymphocytes of the general population: Contribution of age, sex, seasonal variations and lifestyle factors. *Ecotoxicol Environ Saf.* el 1 de febrero de 2018;148:561–70.
98. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A, Zalacain Díez M. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An Sist Sanit Navar* [Internet]. 2005 [citado el 3 de febrero de 2022];28(2):227–36. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
99. Mohammed AM, Hussien DF, Rashad H, Hasheesh A. The Micronuclei Scoring as a Biomarker for Early Detection of Genotoxic Effect of Cigarette Smoking. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. el 1 de enero de 2020 [citado el 3 de febrero de 2022];21(1):87. Disponible en: </pmc/articles/PMC7294033/>
100. Hiemstra PS. The Adaptive Response of Smokers to Oxidative Stress. <https://doi.org/101164/rccm2205024>. el 20 de diciembre de 2012;166(5):635–6.
101. Ganapathy V, Manyanga J, Brame L, McGuire D, Sadhasivam B, Floyd E, et al. Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. *PLoS One*. el 1 de mayo de 2017;12(5):e0177780.
102. Yang AS, Estécio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JPJ. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 [citado el 3 de febrero de 2022];32(3). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14973332/>
103. Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, et al. Changes in DNA Methylation Patterns in Subjects Exposed to Low-Dose Benzene. *Cancer Res* [Internet]. el 1 de febrero de 2007 [citado el 3 de febrero de 2022];67(3):876–80. Disponible en: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/67/3/876>
104. Chen H, Li SF, Liu J, Diwan BA, Barrett JC, Waalkes MP. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. el 1 de septiembre de 2004 [citado el 3 de febrero de 2022];25(9):1779–86. Disponible en: <https://academic.oup.com/carcin/article/25/9/1779/2475973>
105. Zal F, Yarahmadi A, Totonchi H, Barazesh M, Moradi Sarabi M. Nicotine attenuates global genomic DNA methylation by influencing DNMTs gene expression in human endometrial stromal cells. *Genes Environ* [Internet]. el 5 de febrero de 2020 [citado el 3 de febrero de 2022];42(1):1–8. Disponible en: <https://genesenvironment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41021-020-0144-5>

