

BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y EFECTO AL HUMO DE TABACO AMBIENTAL

Aura Palencia^{1,2}, Gabriela Romero^{1,3}, Maritza Vargas¹.

¹Unidad de Investigación en Toxicología Molecular (UTM), Escuela de Bioanálisis, Sede Carabobo, Universidad de Carabobo.

²Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional. Escuela de Bioanálisis. Sede Carabobo. Universidad de Carabobo.

³Departamento de Ciencias Básicas. Escuela de Bioanálisis, Sede Carabobo. Universidad de Carabobo.

Recibido para publicación el 15 de junio 2014. Aprobado para publicación el 30 de junio 2014.

RESUMEN:

El tabaquismo representa un grave problema de salud pública, distintas investigaciones han demostrado que el potencial de contaminación del humo de tabaco en el domicilio es más importante que el grado de contaminación atmosférica urbana, debido a esto se ha impulsado la búsqueda de biomarcadores que permitan evaluar dicha exposición especialmente en poblaciones susceptibles. En este artículo se aborda la evidencia científica sobre la utilidad de los biomarcadores de exposición y efecto, para suministrar criterios que permitan seleccionar aquellos que identifiquen el riesgo de exposición al humo de tabaco y valoren los cambios bioquímicos o fisiológicos asociados a la misma. Conclusiones: el monitoreo biológico ofrece resultados objetivos a través del uso combinado de biomarcadores de exposición y efecto, en tanto que se apliquen métodos sensibles para su determinación que pongan en evidencia una disminución de la exposición, permitiendo una evaluación real de riesgo que conlleve a la aplicación de iniciativas por ambientes libres de humo de tabaco.

Palabras claves: Humo de tabaco, biomarcadores, cotinina, 1-hidroxipireno, tioéteres, aductos.

EXPOSURE AND EFFECT BIOMARKERS TO ENVIRONMENTAL TOBACCO SMOKE

SUMMARY

Smoking is a serious public health problem, different research have shown that the potential for contamination tobacco smoke at home is more important than the degree of urban air pollution, because this has prompted the search for biomarkers to evaluate such exposure especially in susceptible populations. In this paper is approached the scientific evidence on the usefulness of biomarkers of exposure and effect to provide criteria to select those that identify the risk of exposure to tobacco smoke and appreciate the biochemical or physiological changes associated with it. Conclusions: The biological monitoring provides objective results through the combined use of biomarkers of exposure and effect, while sensitive methods for its determination that demonstrate a decrease in exposure are applied, allow a realistic assessment of risk associated to the implementation of initiatives for environmental tobacco smoke free.

Keywords: Environmental tobacco smoke, biomarkers, cotinine, 1-hydroxypyrene, thioethers, adducts.

Introducción

El hábito tabáquico es una de las adicciones más extendidas en el mundo, siendo la primera causa de muerte prevenible (1). A nivel mundial representa un problema de salud pública, para el año 2000 se estimó que el 12 por ciento de las muertes ocurridas ese año fue a causa del cigarrillo, y que aproximadamente la mitad de éstas sucedieron en fumadores en etapa laboral activa (2). El consumo directo o indirecto de tabaco y en especial el de cigarrillos, constituye el factor causal de diferentes tipos de cáncer: Pulmón, cavidad oral, laringe, esófago, vejiga y riñones (3), además de ser agravante de diversas patologías respiratorias y metabólicas (4-12). La magnitud de estos efectos se ha infravalorado en niños y adolescentes debido a que el conocimiento de la prevalencia se basa en cuestionarios autoadministrados (4).

En el año 2009, la Oficina Nacional Antidrogas (ONA) de Venezuela realizó a través del Observatorio Nacional Antidrogas el Estudio Nacional de Drogas en Población Escolar (ENaDPE) (13) para conocer la magnitud y características del consumo de drogas lícitas e ilícitas en estudiantes de educación básica, media y diversificada en ciudades de más de 20.000 habitantes, con el propósito de definir políticas asertivas que alcancen un nivel de precisión acorde con la descripción de la problemática. En este informe la prevalencia de vida para el cigarrillo se ubica en 13,2 % incrementándose la incidencia en el género masculino. Asimismo se diferencia la prevalencia de año (5,4%) y de mes (3,3%). Con respecto a la edad de inicio del hábito se refiere el rango entre 9 y 11 años de edad.

Según el reporte más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicado en el año 2012, para el año

Solicitar copia a: Aura Palencia (e-mail: adpalencia@uc.edu.ve)

2004 en la República Bolivariana de Venezuela existía 11% de riesgo atribuible de mortalidad por tabaco en adultos (3). A partir de marzo del 2011, nuestro país se sumó a las iniciativas internacionales de prohibir la contaminación por el humo de tabaco ambiental (HTA) en espacios públicos (14), en concordancia con el artículo 8 de la Ley aprobatoria del convenio Marco de la OMS para el control del tabaco (15). Sin embargo, el alcance de esta legislación es limitada pues las personas pueden fumar en sus hogares o automóviles convirtiendo a los niños en la población más vulnerable a este contaminante.

Lo antes expuesto, denota la necesidad de establecer la prevalencia real del tabaquismo activo y pasivo, pues este conocimiento en la mayoría de los casos se ha obtenido a través de cuestionarios auto-administrados sobre los que existe cierta controversia en cuanto a su fiabilidad (16,17), al presuponer que en muchas ocasiones las respuestas pueden estar falseadas, llegando a ocultar o exagerar datos sobre las características reales del hábito común (18). Este panorama ha impulsado a nivel mundial diversos estudios destinados a establecer la condición de fumador, la exposición al humo de tabaco ambiental (HTA) y los efectos de manera objetiva a través de la medición de biomarcadores.

Biomarcadores

Según Arango (19), los biomarcadores son aquellas alteraciones moleculares, bioquímicas o celulares, mensurables por métodos biológicos, de los distintos elementos orgánicos (tejidos, células o fluidos) y que se pueden utilizar en las investigaciones epidemiológicas como indicadores de posibles enfermedades. En el área de toxicología, pueden clasificarse en biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad. Los de exposición, pueden ser usados para confirmar y evaluar la exposición de individuos o poblaciones a una sustancia particular, proporcionando un vínculo entre la exposición externa y la dosis interna; mientras que los de efecto pueden ser usados para documentar alteraciones preclínicas o efectos adversos para la salud, suscitados por exposición externa y absorción de un químico. Además el vínculo de biomarcadores entre efecto y exposición contribuye a la definición de la relación dosis respuesta. Los de susceptibilidad pueden dilucidar el grado de respuesta a la exposición manifestado por el individuo (3). La especificidad del marcador biológico es una de las principales características a considerar, además de ser fácilmente detectable usando métodos analíticos reproducibles y sensibles (20,21).

Humo de Tabaco

El humo de tabaco es una mezcla compleja de gases y partículas que contiene más de 4.000 sustancias químicas formando un aerosol (22), clasificado por la Agencia de Protección Ambiental Americana como un carcinógeno tipo A (23). El humo de tabaco ambiental (HTA) también conocido como humo de segunda mano (HSM) o humo ajeno, es generado por la combustión de cigarrillos y el humo exhalado por los fumadores, el cual puede permanecer suspendido en el aire hasta 2 horas y media (24). La concentración de algunos componentes en el humo de la corriente principal y de la corriente secundaria varía debido a que en ésta última la combustión se produce con menor presencia de oxígeno y a menor temperatura lo que genera mayores productos de desecho, se ha demostrado que la corriente secundaria es más nociva por su alto contenido de monóxido de carbono, nitrosaminas, acroleína, y metales pesados (cadmio y plomo) (25).

Recientemente se ha introducido el término de humo de tercera mano (HTM), el cual se refiere a los contaminantes residuales generados por el humo de tabaco que se adhieren a las superficies y partículas de polvo una vez que se ha dejado de fumar (26). Dichas superficies constituyen reservorios permanentes de compuestos tóxicos tales como la nicotina, formaldehído, HAPs, cresoles, fenoles y nitrosaminas específicas del tabaco. La exposición al HTA se origina por la inhalación del HSM, mientras que la exposición al HTM implica la inhalación, la ingestión y captación dérmica de estos contaminantes presentes en las fases particulada y gaseosa (27). Algunos estudios han señalado que la piel es uno de los tejidos más expuestos al HTA, ya que la epidermis y sus apéndices cuentan con células madres que son afectadas por estos contaminantes (28).

Los biomarcadores específicos para exposición a HTA son la nicotina y sus metabolitos, así como los metabolitos de 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), mientras que los inespecíficos comprenden 1-hidroxipireno, tiocianatos, carboxihemoglobina (29), monóxido de Carbono (30), ácidos fenilmercaptúrico y trans,trans-muconico (31), cabe resaltar que los inespecíficos presentan alta correlación con la exposición lo que permite que complementen el monitoreo biológico (32).

En la tabla 1 se presenta un resumen de estos marcadores biológicos y se desarrollarán a continuación los de mayor utilidad en estudios clínicos y epidemiológicos.

TABLA 1. Biomarcadores de exposición y efecto al humo de tabaco ambiental.

BIOMARCADOR	MATRIZ BIOLÓGICA	MÉTODO ANALÍTICO	PUNTO DE CORTE	POBLACIÓN DE ESTUDIO	AUTOR
EXPOSICIÓN INESPECÍFICOS					
Monóxido de Carbono (CO)	Aire exhalado	Cooximetría	≤ 6 ppm No fumadores	141 adultos no fumadores, 92 fumadores	Giraldo et al, 2001
Carboxihemoglobina (COHb)	Sangre	Cooximetría	≤ 4,7 % No fumadores	187 fumadores y 181 no fumadores	Pojer et al, 1984
Tiocianato	Suero	Colorimétrico (Reacción de Konig)	≤ 31,6 μmol.L-1 No fumadores	120 Adultos Fumadores, 128 No fumadores	Grijalba et al, 2001
	Orina		≤ 5,4 μmol.μg-1 creat. No fumadores	y no expuestos	
1-Hidroxipireno (1-OHP)	Orina	HPLC-FD	≤ 0,26 μmol. mol-1 creat. No Fumadores	Benchmark Guideline for exposure	Jongeneelen F. 2001
Tioéteres	Orina	Espectrofotometría UV	3,8 a 6,05 mmol SH.mol-1 creat	occupational	Van Welle et al. 1992
EXPOSICIÓN ESPECÍFICOS					
Nicotina	Pelo	CG-MS	≤ 2,77 ng.mg-1 No Fumador	77 adultos no expuestos, 105 fumadores pasivos, 107 fumadores activos	Kim et al, 2014
Cotina	Suero	HPLC-MS	3,08 ng.mL-1	3078 adultos fumadores y 13078 No fumadores	Benowitz et al, 2009
	Orina	CG-FID	≤ 10 ng.mL-1 No fumadores, no exp.	52 hombres y 93 mujeres	Vaccino et al, 2006
	Saliva	CG	13 ng.mL-1 Embarazadas no fum.	359 fumadoras y 261 no fumadoras	Heegard et al, 2007
	Pelo	CG-MS/MS	≤ 2,89 ng.mL-1 No fumador	77 adultos no expuestos, 105 fumadores pasivos, 107 fumadores activos	Kim et al, 2014
4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol NNAL	Orina	HPLC-API-MS/MS	≤ 0,2 ng.mg-1 Niños no expuestos y embarazadas. ≤ 0,8 ng.mg-1 No embarazadas y no exp.	36 madres fumadoras y sus hijos, 26 madres no fumadoras y sus hijos	Eliopoulos et al, 1994
		CG-IE/MS	≤ 0,0795 pmol.mL-1 No Fumadoras	117 embarazadas no fumadoras expuestas	Vardavas et al, 2013
		HPLC-API-MS/MS	299 pg.mL-1 media geométrica en Fumadores	1373 sujetos fumadores	Xia et al, 2011
EFEECTO INESPECÍFICOS					
Aductos ADN-HAPs	Semen	Immunofluorescencia indirecta	FITC	433 Hombres infértiles	Ji et al, 2013
Aductos BPDE-ADN	Sangre	HPLC-FD	< 50 ng/d	41 individuos fumadores	Lodovici et al, 2004
EFEECTO ESPECÍFICOS					
N-(2-hidroxietyl)-valina	Sangre	CG-MS	1 pg.g-1Hb	100 niños de 3 a 13 años	Bono et al, 2005
4-hidroxi-1-(3-piridil)1-butanona	Tejido pulmonar	CG-MS	≤ 6 fmol.mg-1 ADN	Muestras postmortem	Foiles et al, 1992
	Sangre	CG-IE/MS	19,8±7,8 fmol.g-1Hb	47 fumadores (21 con CA de pulmón)	Atwoodi, 2003

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, MS: espectrometría de masas, CG: cromatografía de gases, FD: detector ionización a la llama, FITC: detector de fluorescencia, UV: detector ultravioleta, API: Ionización a presión atmosférica, IE: Ionización de electrones, ppm: parte por millón, CA: cáncer, Hb: hemoglobina, creat: creatinina, FITC: Fluoresceína Isotiocianato

Nicotina

Es un alcaloide (amina terciaria) y el principal compuesto orgánico semivolátil (SCOVs) del tabaco (33-34). La absorción de la nicotina puede llevarse a cabo en los plexos sublinguales y mucosa bucal, pulmón y piel. Una vez que atraviesa la membrana alveolo-capilar llega al cerebro en 10 segundos, representando esto una de sus propiedades adictivas al unirse a los receptores colinérgicos nicotínicos (35). Tiene una vida media de 2 a 3 horas (36), metabolizándose en hígado principalmente originando diversos metabolitos, tales como cotinina, trans-3-hidroxi-cotinina, nicotine-N-glucuronido, cotinine-N-glucuronido, trans-3'-hidroxi-cotinina-O-glucuronido, nornicotina, norcotinina, nicotine-N'-oxido, cotinine-N'-oxido (37). Aunque la nicotina se puede medir en fluidos corporales (saliva, plasma, orina) (38), y es ideal para establecer el tabaquismo activo, su corta vida media es una desventaja prefiriéndose sus metabolitos para la evaluación de la exposición involuntaria al HTA, e incluso se ha referido que la nicotina en cabello (39) sería mejor indicador para la exposición crónica.

Cotinina

Es el principal metabolito no psicoactivo de la nicotina. Aparece en sangre a los pocos minutos de fumar y posee una semivida intermedia (16-18 horas) que es mayor en niños que en adultos (40). La cotinina persiste en el organismo unos 4 días desde que la persona deja de fumar, considerándose mejor que la propia nicotina para medir exposición tanto activa como involuntaria al tabaco. Es uno de los mejores marcadores y, aunque generalmente se mide en sangre, por ser los niveles más estables, también puede determinarse en orina, saliva e incluso pelo (41-42). Una desventaja potencial de los análisis en suero contra los realizados en orina es su menor sensibilidad, ya que las concentraciones de cotinina en orina suelen ser cuatro a seis veces mayor que en el suero. Sin embargo, como el suero no requiere ajuste de las diferencias de hidratación entre los individuos, proporciona una medición matricial más uniforme que la orina (43). La muestra de sangre es invasiva, por lo que la medición de cotinina en orina y saliva (44-45) representan matrices de elección.

La cotinina urinaria se ha determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector UV (HPLC-UV) (46-47), cromatografía de gases acoplada a detector de masas (48), cromatografía gas-líquido con detector de ionización de llama (CGL-FID), para este método los fumadores activos presentaron

un rango de 255,4 -1050 ng.mL⁻¹, mientras que los no fumadores valores entre 15,8 y 38,4 ng.mL⁻¹(49). Empleando el método de inmunoensayo en fumadores activos, exfumadores y no fumadores se han reportado puntos de corte de 500 ng.mL⁻¹, 100 ng.mL⁻¹ y <50 ng.mL⁻¹ respectivamente (50). Asimismo, el índice Cotinina/Creatinina ha sido utilizado para determinar la prevalencia del tabaquismo pasivo (47,51), al respecto se evaluaron 150 niños (2 a 12 años) con infecciones del tracto respiratorio y 150 niños sanos (grupo control), señalando un punto de corte de 30ng.mg⁻¹ creatinina para establecer la exposición (52).

1-Hidroxipireno

Es el metabolito urinario del pireno, hidrocarburo aromático policíclico (HAPs) no cancerígeno, considerado el mejor indicador biológico de exposición a mezclas de estos compuestos (53-55). De gran uso en el ámbito ocupacional (56-57), diversos estudios han asociado positivamente los niveles de 1-hidroxipireno con el hábito tabáquico (56,58) y particularmente en niños expuestos a HSM y HTM por hábitos de padres y familiares que fuman en el hogar o en los sitios donde permanecen los niños (59-61), relacionando igualmente altos niveles del biomarcador en madres embarazadas con bajos indicadores biométricos en recién nacidos (62).

Jongeneelen en el 2001, propuso valores del biomarcador, hasta 0,24 y 0,76 μmol.mol⁻¹ de creatinina en no fumadores y fumadores respectivamente en individuos no expuestos ocupacionalmente (56). Por otro lado, Wilhelm et al. (63), plantean valores límite de referencia para exposición ambiental a HAP en la población alemana con edades entre 3 y 69 años: 0,0022 μmol.L⁻¹ (0,157 μmol. mol⁻¹ de creatinina). Respecto a los métodos para la medición de 1-OHP, la separación cromatográfica, previa purificación de la muestra en cartuchos de extracción, ha sido sugerida como método de elección. La cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia, desde que fue propuesto por Jongeneelen en 1985, ha sido objeto de numerosas modificaciones relacionadas con cambios en la extracción en fase sólida, a fin de concentrar la muestra y cambios en la fase móvil, para acortar el tiempo de retención sin alterar la reproducibilidad, alta sensibilidad y confiabilidad del método.

Tioéteres

Son compuestos excretados por la orina o bilis como conjugados de glutatión y de cisteína, ácidos premercaptúricos y mercaptúricos, siendo su

TABLA 2. Valores de 1-hidroxipireno y Tioéteres urinarios según hábito tabáquico.

Hábito tabáquico	Tioéteres (mmol SH/molcreatinina) Mediana (rangos)	1OHP (μ mol /molcreatinina) Mediana (rangos)
Si (15)	15,17 (0,98 – 48,92)*	0,48 (0,022-0,60)
No (15)	6,61 (1,09-16,62)	0,32 (0,03-1,53)

U de Mann-Whitney *p < 0,05

determinación utilizada como biomarcador inespecífico a la exposición a compuestos electrofílicos (64-65). La determinación de tioéteres urinarios ha sido utilizada como un indicador de exposición a agentes potencialmente alquilantes, diversos estudios han señalado la utilidad de este biomarcador como un ensayo de screening a la exposición del humo del tabaco (66), y en consecuencia puede contribuir con el desarrollo de medidas o programas que aborden el tabaquismo como problema de salud pública (67-68).

Particularmente en la Unidad de Investigación en Toxicología Molecular de la Universidad de Carabobo se desarrollan actualmente estudios tendientes a establecer puntos de corte para tioéteres, cotinina y 1-OHP, a fin de manejar valores de referencia para la población venezolana. En este sentido, se ha evaluado la excreción de tioéteres urinarios en trabajadores de una institución de educación superior ubicada en el municipio Naguanagua considerando el hábito tabáquico (69), observándose valores más elevados en los fumadores, coincidiendo con los resultados de otros autores (64-66). Asimismo, en un grupo de 30 trabajadores de establecimientos de comida del municipio Naguanagua, con promedio de edad de 37 años, en su mayoría del género masculino (86%), se evaluaron los biomarcadores 1-hidroxipireno y tioéteres urinarios. Los resultados se muestran en la tabla 2.

De este estudio, que está preparándose para su publicación, es importante resaltar que los valores promedio de cada uno de los biomarcadores están más elevados en los trabajadores que fuman, no obstante, estas diferencias no tienen significancia estadística para el 1-hidroxipireno. Vanio et al. (70), así como Feng et al. (71) encontraron elevada excreción de tioéteres en individuos con hábito tabáquico. Estos autores refieren que ambos biomarcadores pueden ser utilizados para diferenciar entre fumadores y personas que han dejado el hábito tabáquico. En este sentido Kawamoto et al. (55), refieren que el 1-hidroxipireno es un biomarcador

más sensible para evaluar la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Aductos

Son considerados marcadores de dosis efectiva pues indican la cantidad de sustancia que actuó sobre un sitio biológico (53), son el resultado de reacciones generadas a través del metabolismo al interactuar los compuestos electrofílicos con el ácido desoxirribonucleico (ADN), produciéndose lesiones premutagénicas, que en muchos casos se fijan y producen mutaciones puntuales, tales como sustituciones de bases, transiciones y transversiones. Existen evidencias de que las nitrosaminas presentes en el HTA son carcinogénicas, entre ellas se encuentran la N-nitrosornicotina (NNN), N-nitrosoanabasina (NAB), N-nitrosoanabatina (NAT) y 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona también conocida como nitrosaminoketona (NNK), esta última ha sido asociada con el cáncer de pulmón (72,73) y sus metabolitos pueden determinarse en orina como indicador de exposición. Asimismo, estas nitrosaminas son capaces de formar aductos de ADN y de Hemoglobina que son indicadores específicos de la dosis interna de dichos xenobióticos (12, 74,75).

Por su parte, los HAPs compuestos electrofílicos también presentes en el HTA pueden reaccionar con los sitios nucleofílicos de molécula biológicas como ADN, ARN, Albumina y Hemoglobina, formando macromoléculas que pueden ser consideradas precursoras del proceso de carcinogénesis química, tales como Benzo(a)pyrenediolepoxide (76-79). Los métodos para la medición de aductos varían desde RIA, inmunofluorescencia, HPLC acoplada a detector de fluorescencia, y Cromatografía de Gases acoplada a detector de masa (CG-MS) resultando éste ultimo de elección por su sensibilidad (74-79).

Conclusiones

La tendencia a no declarar el status de fumador parece estar incrementándose debido a la decreciente aceptabilidad

de fumar en la sociedad, esto se hace más evidente cuando dicha información es destinada a investigaciones sobre exposición al humo de tabaco ambiental en la población infantil, adolescentes y embarazadas, por tanto es probable que exista un infra-registro de los datos de prevalencia en estos grupos etarios a nivel mundial. Aun cuando deben ser tomadas en cuenta las implicaciones bioéticas relacionadas con la información aportada por estos estudios, la OMS considera que no hay niveles seguros de exposición al humo del tabaco por lo que es necesario e imprescindible disponer de técnicas analíticas que permitan cuantificarla, pues en muchos casos la percepción que tienen los sujetos de la exposición no se corresponde con la realidad. El monitoreo biológico permite diferenciar fumadores de no fumadores, así como expuestos de no expuestos, según se confirma a través de los resultados reportados en numerosas investigaciones a nivel internacional. Cabe resaltar que la capacidad diagnóstica se incrementa con el uso combinado de los biomarcadores, ya que permite una definición más precisa de la relación dosis respuesta.

Referencias

- Peto R, López A, Boreham J, Thun M, Heath C. Mortality from smoking in developed countries 1950-2000. Indirect estimates from national vital statistics. *Am J Epidemiol* 1996;143(3):529-530.
- Ezzatti M, López AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet* 2003;362(9387):847-852.
- Organización Mundial de la Salud [Internet]. WHO Global Report: Mortality attributable to tobacco. [consultado 26 Mayo 2014] disponible en: http://www.who.int/fctc/text_download/es/index.html
- Pérez-Trullen A, Bartolomé C, Barrueco M, Herrero I, Jiménez C. Nuevas perspectivas en el diagnóstico y evolución del consumo de tabaco: marcadores de exposición. *Prevención del tabaquismo* 2006;8(4):164-173.
- Supervía A, Enjuanes A, Vila J, Mellibovsky L, Nogués X, Díez-Pérez A. Efecto del tabaquismo sobre los valores séricos de leptina y su relación con las hormonas esteroideas y la densidad mineral ósea. *Med Clin (Barc)* 2007;127(17):645-647.
- Medrano J, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodríguez M. Factores de riesgo cardiovascular en la población española: Meta-análisis de estudios transversales. *Med Clin* 2005;124(16):606-612
- Fernández BJ, Sanz BV, Garrido MP, López SE. Riesgo cardiovascular: evaluación del tabaquismo y revisión en atención primaria del tratamiento y orientación sanitaria. *Atención Primaria*. 2011;43(11):595-603.
- Kohler E, Sollich V, Schuster R, Thal W. Passive Smoke Exposure in infants and children with respiratory tract diseases. *Human Experiment Toxicol* 1999;18(4):212-217.
- Jurado D, Muñoz C, Luna J, Fernández M. Environmental tobacco smoke exposure in children: parental perception of smokiness at home and other factors associated with urinary cotinine in preschool children. *J Exp Anal Environ Epidemiol*. 2004;14:330-336.
- Boyaci H, Etiler N, Duman C, Basyigit I, Pala A. Environmental tobacco smoke exposure in school children: Parent report and urine cotinine measures. *Pediatr Inter* 2006;48:382-389.
- Goldaracena CA, Raffo AC, Piaggio OL, Ríos JH, Gómez JM, Córscico F, et al. Presencia de cotinina en niños expuestos al HTA. *Acta toxicol Argent* 2007;15:71.
- Bono R, Vicenti M, Schiliro T. Cotinine and N-(2-hydroxyethyl) valine as markers of passive exposure to tobacco smoke in children. *J Exp Anal Environ Epidemiol* 2005;15:66-73.
- Estudio Nacional de Drogas en Población Escolar (ENaDPE). Oficina Nacional Antidrogas, 2009. Disponible en la Página web www.ona.gob.ve
- Gaceta oficial de la República Bolivariana de Venezuela. Número 39.627, fecha 2 de marzo 2011. Resolución 030.
- Resolución WHA56.1 Convenio Marco de la OMS para el control del tabaco. 21 de mayo 2003. [consultado 2 de febrero 2014] disponible en: www.paho.org/Spanish/DD/PUB/sa56r1.pdf
- Kehl D, Thyrian JR, Lüdemann J, Nauck P, Ulrich J. A descriptive analysis of relations between parents self-reported smoking behavior and infants daily exposure to environmental tobacco smoke. *BMC Public Health* 2010; 10,424 doi:10.1186/1471-2458-10-424. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/10/424>
- Puebla S, Buñuel J. Los cuestionarios autocumplimentados tienden a producir una infradeclaración del consumo de tabaco en adolescentes. *Evidencias en pediatría* 2008; 4(4): 78-79. Disponible en http://www.aepp.org/evidpediat/numeros/vol4/2008_numero_4/2008_
- López M, Neubot M. La medición de la nicotina como marcador aéreo del humo ambiental del tabaco. *Gac Sanit* 2003;17(3):15-22.
- Arango S. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev Fac Nac Salud Pública* 2012;30(1):75-82.
- Apelberg BJ, Hepp L, Avila-Tang E, Gundel L, Hammond SK, Hovell MF, et al. Environmental monitoring of secondhand smoke exposure. *Tob Control* May 2013; 22(3):147-155.
- Organización Mundial de la Salud. Biomarkers in risk assessment: Validity and Validation. *Environmental Health Criteria* 2001; 222. Disponible en: www.inchem.org
- Bello S, Michalland S, Soto M, Contreras C, Salinas J.

- Efectos de la exposición al humo de tabaco ambiental en no fumadores. *Rev Chil Enf Respir* 2005;21(3):179-192.
23. Environmental Agency Protection [Internet]. Washington, DC: Six Principal Pollutants. [citado 15 Enero 2014] disponible en: <http://www.epa.gov/airtrends/sixpoll.html>.
 24. Narkowicz S, Polkowska Z, Namienisk J. Analysis of markers of exposure to constituents of Environmental Tobacco Smoke (ETS). *Crit Rev Anal Chem* 2012;42:16-37.
 25. Banegas JR, Estapé J, González-Enriquez J, López V, Pardell H, Salvador T, et al. Exposición involuntaria al humo ambiental de tabaco: Revisión actualizada y posibilidades de actuación. *Semergen* 1998;25(8):702-711.
 26. Ferrante G, Simoni M, Cibella F, Ferrara F, Liotta G, Malizia V. Third-hand smoke exposure and health hazards in children. *Monaldi Arch Chest Dis* 2013;79(1):38-43.
 27. Matt G, Quintana P, Destailats H, Gundel L, Sleiman M, Singer B. Third-hand tobacco smoke: Emerging evidence and arguments for a multidisciplinary research agenda. *Env Health Persp* 2011;119(9):1218-1226.
 28. Kolanko E, Czka P. Skin and dermal appendages stem cells exposure to tobacco smoke. *Przegl Lek* 2013;70(10):858-864.
 29. Pojer R, Whitfield JB, Poulos V, Eckhard IF, Richmond R, Hensley WJ, et al. Carboxyhemoglobin, cotinine, and thiocyanate assay compared for distinguishing smokers from non-smokers. *Clin Chem* 1984;30:1377-1380.
 30. Giraldo H, Arenas MC, Porras I, Dueñas R. Niveles de monóxido de carbono en aire espirado de fumadores activos y pasivos y no fumadores a la altura de Bogotá (2540mts). *Rev Colomb Neumonol* 2001;13:26-31.
 31. Wang J, Liang Q, Mendes P, Sarkar M. Is 24h nicotine equivalents a surrogate for smoke exposure based on its relationship with other biomarkers of exposure? *Biomarkers* 2011;16(2):144-154.
 32. Scherer G. Carboxyhemoglobin and thiocyanate as biomarkers of exposure to carbon monoxide and hydrogen cyanide in tobacco smoke. *Exp Toxicol Pathol* 2006;58(2-3):101-124
 33. Singer BC, Coleman BK, Destailas H, Lunden MM, Hodgson AT, Weschler CJ, et al. Indoor secondary pollutants from cleaning products and freshener use in the presence of ozone. *Atmosf environ* 2006; 40:6696-6710.
 34. Weschler CJ, Nazaroff WW. SVOC exposure indoors: fresh look at dermal pathways. *Indoor Air* 2012;22(5):356-377.
 35. Rosenthal D, Weitzman M, Benowitz N. Nicotine Addiction: Mechanisms and Consequences. *Intern J of Mental Health* 2011;40(1):22-38.
 36. Benowitz N, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handbook of Experimental Pharmacology* [serial online]. 2009;(192):29-60.
 37. Piller M, Gilch G, Scherer G, Scherer M. Simple, fast and sensitive LC-MS/MS analysis for the simultaneous quantification of nicotine and 10 of its major metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;951-952:7-15.
 38. Benowitz NL, Bernert JT, Caraballo RS, Holiday DB, Wang J. Optimal serum cotinine levels for distinguishing cigarette smokers and nonsmokers with different racial/ethnic groups in the United States between 1999 and 2004. *Am J Epidemiol* 2009;169:236-248.
 39. Tzatzarakis MN, Vardavas CI, Terzi I, Kavalakis M, Kokkinakis M, Liesivuori J, Tsatsakis AM. Hair nicotine/cotinine concentrations as a method of monitoring exposure to tobacco smoke among infants and adults. *Hum Exp Toxicol* 2012;31(3):258-65.
 40. Benowitz NI, Jacob P, Ahijevych K, Hall S, Le Houezec J. Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine Tobacco Res* 2002;4:149-159.
 41. Grijalba A, Uriarte F, Logroño J, Rivero A, García M. Tiocianato en suero y orina y cotinina en orina como marcadores bioquímicos de tabaquismo. *Quim Clin.* 2001;20(6):419-424.
 42. Eliopoulos C, Klein J, Phan MK, Knie B, Greenwald M, Chitayat D, Koren G. Hair concentrations of nicotine and cotinine in women and their newborn infants. *JAMA* 1994;271(8):621-623.
 43. Thompson SG, Barlow RD, Wald NJ, Van Vunakis H. How should urinary cotinine concentrations be adjusted for urinary creatinine concentration? *Clinica Chimica Acta* 1990;187(15):289-295.
 44. Martínez-Sánchez J, Fu M, Ariza C, López MJ, Saltó E, Pascual JA, et al. Punto de corte óptimo de la concentración de cotinina en saliva para discriminar entre fumadores y no fumadores en la población adulta de Barcelona. *Gac Sanit* 2009; 23 (6). Disponible en http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S021391112009000600003&script=sci_arttxt
 45. Kim S, Apelberg BJ, Avila-Tang E, Hepp L, Yun D, Samet JM, Breyse PN. Utility and cutoff value of hair nicotine as a biomarker of long-term tobacco smoke exposure, compared to salivary cotinine. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11(8):8368-8382.
 46. Lopez C, Sassone M, Rodriguez G. Quantification of Cotinine in Plasma and Urine by HPLC-UV Detection. *J of Liq Chrom Rel Techn* 2004;27(15):2371-2379.
 47. Zielinska-Danch W, Wardas W, Sobczack A, Szoltysek-Boldys I. Estimación of urinary cotinine cut-off points distinguishing non-smokers, passive and active smokers. *Biomarkers* 2007;12(5):484-496.
 48. Hegaard HK, Kjaergaard H, Møller LF, Wachmann H, Ottesen B. Determination of a saliva cotinine cut-off to distinguish pregnant smokers from pregnant non-

- smokers. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(4):401-406.
49. Vacchino M, Velurtas S, Salinas G, Garcialoredo H. Determinación de cotinina y exposición a tabaco. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006;40(002):181-185.
 50. Barceló B, Ruiz O, Puiguriguier J, Castanyer B. Comisión toxicovigilancia, servicios de análisis clínicos y urgencias. Hospital Son Dureta. Palma de Mayorca. XVI congreso español de toxicología. *Revista toxicología* 2005;22(002):142-145.
 51. Keskinoglu PP, Cimrin DD, Aksakoglu G. The impact of passive smoking on the development of lower respiratory tract infections in children. *J Trop Pediatr* 2007; 53(5) :319-324.
 52. Keskinoglu P, Cimrin D, Aksakoglu G. Relationship between cotinine, lower respiratory tract infection, and eosinophilic cationic protein in children. *Eur J Pediatr Int* 2007;166:455-459.
 53. Mastandrea C, Chichizola C, Ludueña B, Sánchez H, Álvarez H, Gutiérrez A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgo para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2005;39(1):27-36.
 54. Toriba A, Hayakawa K. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and related compounds. *J Health Sci* 2007;53(6):631-638.
 55. Kawamoto T, Yang M, Kim Y-D. Effects of lifestyle on urinary 1-hidroxypyrene concentration. *J Occup Health* 2007;49:183-189.
 56. Jongeneelen F. Benchmark guideline for urinary 1-hidroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 2001;45(1):3-13.
 57. Choosong T, Phakthongsuk P, Tekasakul S, Tekasakul P. Urinary 1-hidroxypyrene levels in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon from rubber wood burning. *Saf Health Work* 2014;5:86-90.
 58. Lee KH, Byeon SH. The biological monitoring of urinary 1-hidroxypyrene by PAH exposure among smokers. *Int J Environ Res* 2010;4(3):439-442.
 59. Freire C, Abril A, Fernández MF, Ramos R, Estarlich M, Manrique A, et al. Urinary 1-hidroxypyrene and PAH exposure in 4-year old spanish children. *Sci Total Environ* 2008;407:1562-1569.
 60. Mucha A, Hryhorczuk D, Serdyuk A, Nakonechny J, Zvinchuk A, Erdal S, et al. Urinary 1-hidroxypyrene as a biomarker of PAH exposure in 3-year old ukrainian children. *Environ health Perspect* 2006;114(4):603-609.
 61. Tsai HT, Wu MT, Hauser R, Rodrigues E, Ho CK, Liu CL, et al. Exposure to environmental tobacco smoke and urinary 1-hidroxypyrene levels in preschool children. *Kaohsiung J Med Sci.* 2003;19(3):97-104.
 62. Polanska K, Hanke W, Sobala W, Brzezniccki S, Ligocka D. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and newborn biometric indicators. *Int J Occup Med Environ Health* 2010;23(4):339-346.
 63. Wilhelm M, Hardt J, Schulz C, Angerer J. New reference value and the background exposure to the PAH metabolites 1-hidroxypyrene and 1- and 2-naphthol in urine of the general population in Germany: Basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. *Int J Hyg Env Health* 2008;211(3-4):447-453.
 64. Ghosh S, Bhatnagar V, Doctor P, Shah M, Amin R, Kulkarni P, et al. Cotinine, thioether, and glucuronide excretion among active and passive bidi smokers in India. *Arch Environ Health* 2003;58(6):368-372.
 65. Leif A, Vitauts I. Influence of diet and other factors on urinary levels of thioethers. *Occup Environ Health* 1988;61:123-130
 66. Sinues B, Izquierdo M, Pérez J. Chromosome and urinary thioethers in smokers. *Mutat Res* 1990;24(2):289-293.
 67. Patel J, Shukla Sh, Patel H, Kothari K, Shah P, Prabhudas S, et al. Utility of Urinary Biomarkers in Oral Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2007;8:229-235.
 68. Scherer G, Urban M, Hagedorn HW, et al. Determination of methyl-, 2-hidroxylethyl- and 2-cyanoethylmercapturic acids as biomarkers of exposure to alkylating agents in cigarette smoke. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:2520-2528.
 69. Álvarez C, Blanco C, Rivero E, Palencia A, Romero G. Hábito tabáquico y tioéteres urinarios en personal de la Escuela de Bioanálisis, Valencia 2010. *Avances en Ciencias de la Salud.* 2012;1(2):27-31. Disponible en: servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/avances/vol1n2/art5.pdf
 70. Vainio H, Savolainen H, Kilpikari I. Urinary thioether of employees of a chemical plant. *Brit J Ind Med* 1978;35:232-234.
 71. Feng S, Roethig H, Liang Q. Evaluation of urinary 1-hidroxypyrene, S-phenylmercapturic acid, Trans, trans-muconic acid, 3-methyladenine, 3-ethyladenine, 8-hidroxyl-2'-deoxyguanosine and thioethers as biomarkers of exposure to cigarette smoke. *Biomarkers* 2006;11(1):28-52.
 72. Xia Y, Bernert J, Jain R, Ashley D, Pirkle J. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in smokers in the United States: NHANES 2007-2008. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* [serial on the Internet]. (2011, Mar), [citado enero, 2014];16(2):112-119.
 73. Vardavas C, Fthenou E, Patelarou E, Bagkeris E, Murphy S, Kogevinas M, et al. Exposure to different sources of second-hand smoke during pregnancy and its effect on urinary cotinine and tobacco-specific nitrosamine (NNAL) concentrations. *Tobacco Control* [serial on the Internet]. 2013;22(3):194-200.

74. Foiles P, Murphy Sh, Peterson L, Carmella S, Hecht S. DNA and hemoglobin adducts as markers of metabolic activation of tobacco-specific carcinogens. *Cancer Res.* 1992;52:2698s-2701s.
75. Atawodi S. Tobacco-specific nitrosamines, hemoglobin adducts and exposure to environmental tobacco smoke. *Biokemistri* 2003;15(2):44-49.
76. Ludovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci Ch, Akpan V, Fonnesi ML, et al. Benzo (a)pyrenediolepoxide (BPDE)DNA adduct levels in leukocytes of smokes in relation to polymorphins of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1 and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(8):1342-1348
77. Ji G, Yan L, Wu Sh, Liu J, Wang L, Zhang Sh, Shi L, Gu A. Bulky DNA adducts in human sperm associated with semen parameters and sperm DNA fragmentation in infertile men: a cross-sectional study. *Environ Health* 2013;12:82. Disponible en www.ehjournal.net/content/12/1/82
78. Alexandrov K, Rojas M, Rolando Ch. DNA Damage by benzo(a)pyrene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing Rosemary extract, which lowers free radicals. *Cancer Res* 2006;66(24):11938-11945.
79. Yeowell-O'Connell K, Rothman N, Waidyanatha S, Smith M, Hayes R, Li G, Bechtold W, Dosemecci M, Zhang L, et al. Protein adducts of 1,4-benzoquinone and benzene oxide among smokers and nonsmokers exposed to benzene in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:831-833.