

ORIGINALES**DETERMINACIONES PLASMATICAS DE NICOTINA Y COTININA:
MARCADORES BIOLOGICOS DEL TABACO****M.C. García Calzado (1), J.F. García Rojas (1), A. Mangas (1), D. Martínez Izquierdo (2),
M. Repetto (2), J. Mill n (1)**

(1) Cátedra de Patología y Clínica Médicas. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.
(2) Instituto Nacional de Toxicología. Departamento regional de Sevilla.

RESUMEN

Hemos realizado determinaciones basales de nicotina (N) y cotinina (C) plasmáticas en 33 fumadores (N: 12.12 ± 3.1 ; C: 34.79 ± 14.97 ng/ml). Provocado un estímulo tabáquico agudo consistente en fumar 2 cigarrillos/1.1 mg de nicotina cada uno, las concentraciones de nicotina se elevaron inmediatamente (33.78 ± 6.53 ng/ml; $p < 0.0001$), descendiendo a los 10 minutos (24.86 ± 5.35 ng/ml), aunque aún permanecieran elevadas con respecto a basales ($p < 0.0001$). La cotinina, no sólo aumentó después de fumar (214.67 ± 39.66 ng/ml; $p < 0.0001$), sino que su elevación continu  a los 10 minutos (320.44 ± 43.88 ng/ml; $p < 0.0001$).

Nuestros resultados establecen la eficacia de las determinaciones de nicotina y cotinina como marcadores biológicos de exposición, próxima y crónica respectivamente, al humo del tabaco, aptas para llevar a cabo trabajos epidemiológicos, así como la idoneidad del modelo de sobrecarga tabáquica producido, en orden a posteriores investigaciones de los efectos agudos del tabaco en distintos sistemas orgánicos.

Palabras clave: Tabaco, marcadores biológicos del tabaco, nicotina, cotinina.

ABSTRACT**Plasma Determinations of Nicotine
and Cotinine: Biological Markers
of Tobacco**

We have effected basal determinations of nicotine (N) and cotinine (C) in plasma of 33 smokers (N: 12.12 ± 3.1 ; C: 34.79 ± 14.97 ng/ml). After an acute tobacco stimulus in the form of smoking 2 cigarettes with 1.1 mg of nicotine each, the concentrations of nicotine rose immediately (33.78 ± 6.53 ng/ml; $p < 0.0001$), decreasing ten minutes later (24.86 ± 5.35 ng/ml), although still high when compared to basal levels ($p < 0.0001$). Cotinine not only increased after smoking (214.67 ± 39.66 ng/ml; $p < 0.0001$), but also continued increasing after ten minutes (320.44 ± 43.88 ng/ml; $p < 0.0001$).

Our results establish the efficacy of nicotine and cotinine determinations as biological markers of exposure, recent and chronic respectively, to tobacco smoke, suitable for use in epidemiological studies, as well as the suitability of the tobacco overdose model produced, with a view to later research into the acute effects of tobacco on different organic systems.

Key Words: Tobacco, biological markers for tobacco, nicotine, cotinine.

INTRODUCCION

Son bien conocidas las repercusiones nocivas que sobre la salud tiene la inhalación del humo del tabaco, siendo el tabaquismo considerado como

uno de los principales factores de riesgo de cáncer de pulmón, enfermedad cardiovascular, y responsable de un incremento en las enfermedades y síntomas respiratorios, así como de la disminución de los niveles de función pulmonar¹⁻⁴. En la combustión del tabaco se viene distinguiendo entre dos corrientes de contaminación pro-

Correspondencia:
M.C. García Calzado.
C/ Fernández Ballesteros núm. 2, 11-C.
11009. CADIZ.

ducida por el humo del mismo ⁵: la principal, inhalada directamente por el fumador, y la secundaria, derivada de la combustión espontánea del tabaco y del humo expelido por el fumador tras la inhalación. Esta corriente secundaria puede ser aspirada por personas no fumadoras, dando lugar a lo que se ha dado en llamar "fumadores pasivos".

Para establecer con precisión el grado de exposición real al humo del tabaco, se han medido en fluidos y líquidos corporales de fumadores y no fumadores algunas de las más de 4.000 sustancias que lo componen, como el monóxido de carbono, carboxihemoglobina, tiocianatos, nicotina y cotinina ⁶. Excluidos los dos primeros por su falta de especificidad —pudiendo proceder de combustiones orgánicas y contaminación ambiental— y su corta vida media ^{7,8}, pese a que su metodología sea sencilla, barata y eficaz ^{9,10}, y los tiocianatos no sólo por la falta de especificidad, sino por su baja sensibilidad ^{11,12} —que ha determinado incluso en algunos supuestos la no diferenciación entre no fumadores y fumadores de menos de 10 cigarrillos al día ¹³—, aunque su vida media sea más larga (hasta 15 días) ^{14,15}, únicamente nos restan la nicotina, alcaloide procedente exclusivamente del tabaco y causante de una parte de los efectos biológicos del mismo, y la cotinina, principal metabolito de aquella y fuente a su vez de al menos tres metabolitos conocidos ¹⁶ (cotinina N-óxido, trans-3'-hidroxicotinina y γ -(3-piridil)- γ -oxo-N-metilbutitámid), como marcadores idóneos específicos de exposición al humo del tabaco ¹⁷.

El objetivo del presente estudio ha consistido en tratar de establecer un método fiable, reproducible y eficaz para la cuantificación de nicotina y

cotinina plasmáticas, estudiando sus características cinéticas, con el fin de que puedan ser utilizadas en ulteriores trabajos de carácter epidemiológico.

MATERIAL Y METODO

Hemos estudiado un total de 33 voluntarios, de ambos sexos y con edades comprendidas entre 21 y 39 años. Todos eran fumadores habituales de más de 10 cigarrillos/día, quedando excluidos quienes fumasen exclusivamente puros o pipa. A todos ellos, a las 9 de la mañana, en condiciones basales y habiéndoseles advertido que se abstuvieran de fumar al menos 10 horas antes, se les tomó una vía venosa en el brazo izquierdo, dejando insertada una cánula con obturador, y extrayéndoles una primera muestra basal, de 5 cc de sangre venosa (minuto 0 de la prueba) para las determinaciones de nicotina y cotinina plasmáticas. A continuación se les invitó a fumar dos cigarrillos con filtro, de 80 mm de largo, con un contenido total de 2.2 mg de nicotina (1.1 mg por cigarrillo), en un intervalo de 10 minutos. Al finalizar la inhalación del tabaco (minuto 10) y 10 minutos después (minuto 20 de la prueba) se repitieron las extracciones sanguíneas con el mismo fin.

Las muestras para las determinaciones fueron recolectadas en tubos de vidrio con dos gotas heparina al 1 por 100, como anticoagulante, realizándose la cuantificación por cromatografía de gas líquida. Fue utilizado un Cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5.890, con detector nitrógeno-fósforo o de llama alcalina (NPD), y un integrador, también Hewlett-Packard, modelo 3.392 A. La columna empleada fue una CP-Sil 5 CB (metil silicona),

específica para alcaloides, de 10 m x 530 μ D.I. En cuanto a la técnica utilizada, se siguió el método descrito por Verebey et al.¹⁸ y Kogan et al.¹⁹, con algunas modificaciones introducidas por el Dr. Martínez Ruiz. La temperatura inicial de la columna fue de 120° C, manteniéndose la misma durante un minuto, e incrementándose ésta a razón de 10° C por minuto hasta alcanzar una temperatura final de 220° C. La temperatura del detector e inyector fue de 250° C. El gas portador empleado fue el helio, a razón de 15 ml por minuto. En cuanto al procedimiento de extracción, a 1 ml de plasma se le añadieron 50 μ l de solución de ketamina, como estandar interno (10 μ g/ml), y una gota de octanol, para evitar emulsiones. A continuación se acidificó la muestra con una gota de ácido sulfúrico 3 N. Posteriormente se le añadió 1 ml de cloroformo, agitándose los tubos durante un minuto para eliminar aquellas sustancias que pudieran interferir los resultados. Se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm, recogiendo el sobrenadante (fase acuosa) y eliminándose la parte inferior (fase orgánica). El sobrenadante acuoso recogido se alcalinizó con hidróxido potásico (KOH) al 20 por 100, hasta un pH igual a 10, añadiéndosele 1 ml de eter etílico. Todo ello se agitó durante 1 minuto, volviéndose de nuevo a centrifugar durante 5 minutos a 3.000 rpm, recogiendo la fase etérea (superior) en un pequeño vial, evaporándose hasta la sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituyó con 0.1 ml de cloroformo, para su posterior determinación cromatográfica. El rendimiento en la extracción fue del 92 al 99 por 100. Un volumen de 2 μ l de la solución, fue inyectado en el cromatógrafo para llevar a cabo las determinaciones, siendo el tiempo de retención para la nicotina de 3,66 minutos, para la cotinina de 7,66 minutos y para el estandar interno, la ketamina, de 9,70 minutos. El

coeficiente medio de variación tuvo un rango aproximado del 6,5 por 100, siendo los límites mínimos de sensibilidad en la detección, de 1ng/ml para la nicotina y 5 ng/ml para la cotinina.

Todos los resultados de este estudio se expresan como medias y desviaciones standars, habiéndose utilizado el test de la t de Student para datos apareados para determinar la significación estadística de las diferencias observadas y el coeficiente de correlación de Pearson. Las diferencias se estimaron significativas a partir de un nivel de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Todas las personas integrantes del estudio presentaron niveles basales detectables de nicotina y cotinina y con una alta correlación entre ambas ($y = 2.11 + 2.68x$; $r = 0.556$; $p < 0.001$). Una vez realizado el estímulo (2.2 mg de nicotina), las concentraciones plasmáticas de nicotina se elevaron significativamente de forma inmediata (tabla 1), para luego disminuir rápida y significativamente, aunque aun permanecieran asimismo significativamente elevados con respecto a valores basales (figura 1). Con relación a la cotinina, inmediatamente después de finalizar el estímulo se produjo una elevación altamente significativa de la misma, continuando un paulatino y progresivo incremento a los 10 minutos del mismo (figura 2), existiendo una correlación, si bien pequeña, entre los valores de nicotina a los 10, y cotinina a los 20 minutos de la prueba ($y = 246.66 + 218x$; $r = 0.325$; $p < 0.05$). En ningún momento de la prueba, se detectaron diferencias significativas por razón de sexo o edad.

TABLA 1
NIVELES DE NICOTINA Y COTININA PLASMATICOS EN FUMADORES ANTES Y DESPUES DE LA INHALACION DE HUMO DE TABACO, CONTENIENDO 2.2 MG DE NICOTINA

	<i>Nicotina (ng/ml)</i>	<i>Cotina (ng/ml)</i>
Fumadores n = 33		
Basal :	12.12 ± 3.10	34.79 ± 14.97
intervalo	(7.2 - 19.4)	(13.6 - 80.4)
10 minutos :	33.78 ± 6.53	214.67 ± 39.66
intervalo	(19.8 - 49.5)	(150.2 - 315.2)
20 minutos :	24.86 ± 5.35	320.44 ± 43.88
intervalo	(16.2 - 37.8)	(219.4 - 410.4)
Basal vs. 10 minutos	p < 0.0001	p < 0.0001
Basal vs. 20 minutos	p < 0.0001	p < 0.0001
10 min. vs 20 min.	p < 0.0001	p < 0.0001

FIGURA 1

VARIACIONES DE LA NICOTINA PLASMATICA EN FUMADORES, TRAS LA INHALACION DE 2.2 MG DE NICOTINA. A: BASAL. B: 10 MINUTOS. C: 20 MINUTOS

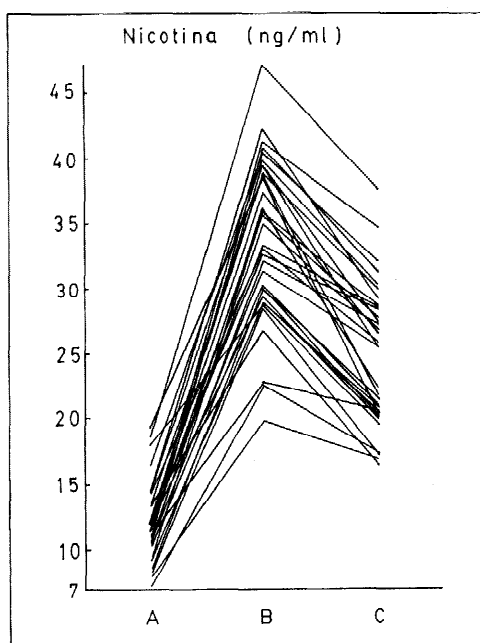
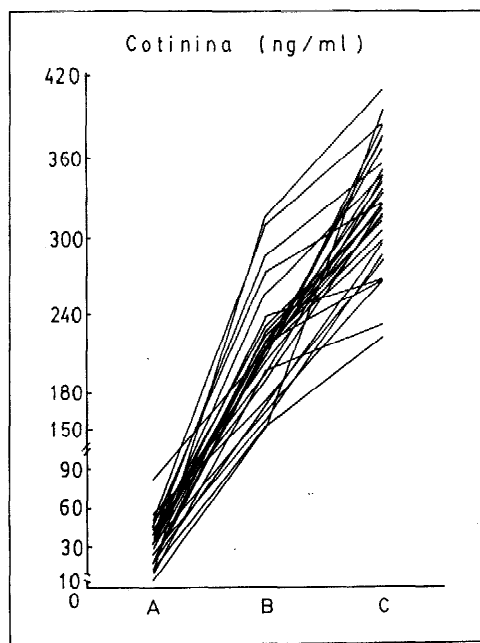


FIGURA 2

VARIACIONES DE LA COTININA PLASMATICA EN FUMADORES, TRAS LA INHALACION DE 2.2 MG DE NICOTINA. A: BASAL. B: 10 MINUTOS. C: 20 MINUTOS



DISCUSION

A la vista de los resultados obtenidos y la diferencia de concentraciones plasmáticas de ambas sustancias entre fumadores y no fumadores, detectadas por nosotros en trabajos anteriores^{20,21} y que corroboran los datos obtenidos por otros autores^{22,23}, podemos concluir la eficacia de ambas determinaciones como marcadores específicos del humo del tabaco, tanto de exposición, como de inhalación del mismo. No obstante, a la hora de optar por una de ellas habrá de tenerse en cuenta sus particulares características cinéticas y el tipo de estudio a realizar. La nicotina con una corta vida media (de 30 a 110 minutos)²⁴ y rápida metabolización, como se observa por el descenso significativo de sus concentraciones a los 10 minutos de haber fumado, pudiera valer como un marcador próximo o de exposición aguda, apto para estudios experimentales, pues por su rápida degradación puede dar lugar a resultados solapados. Así, las concentraciones en fumadores leves, al cabo de cierto tiempo, pueden ser semejantes a las de no fumadores que hayan sufrido una fuerte y reciente exposición al humo ajeno. Por el contrario, la cotinina, procedente únicamente del metabolismo oxidativo de aquella y con una vida media bastante más larga (de 15 a 40 horas en adultos y de 27 a 160 horas en niños),^{8,16,23,25,26} sí resultaría un marcador idóneo de exposición crónica. Las concentraciones de cotinina dependen de la totalidad de nicotina inhalada, ya que es precisamente la degradación de aquella la fuente de su producción, por lo cual no se solaparán los resultados con los de no fumadores aunque estén expuestos, pues la cantidad total de nicotina absorbida por éstos siempre será mucho menor (corriente secundaria) que la de fumadores (corriente principal). En nuestro estudio, todos los fumadores presentaron niveles basales elevados de cotinina, siendo el

valor inferior de 13.2 ng/ml, corroborando lo indicado por Benowitz et al²⁵, en el sentido de que valores superiores a 10 ng/ml son determinantes de la condición de fumador. No obstante, los valores extremos obtenidos son muy amplios, dependiendo del número de cigarrillos fumados, intensidad de la inhalación, forma de fumar, etc.

Provocado el estímulo tabáquico la nicotina se incrementó inmediatamente, obteniendo unas concentraciones medias semejantes a las descritas por otros autores utilizando nicotina i.v. (2 µg/kg/min.durante 10 minutos)²⁴ y bastante superiores a los resultantes después de masticar chicle conteniendo 2 mg de nicotina²⁷. Se ha referido por otros autores²⁸ una correlación entre los niveles de nicotina plasmática y la cantidad de nicotina obtenida en cada cigarrillo, así como entre la cantidad diaria total de nicotina inhalada y las concentraciones plasmáticas de cotinina, a lo que debemos añadir las correlaciones basales obtenidas entre ambas determinaciones. La elevación de nicotina descrita va acompañada de un incremento de cotinina, debido a que la metabolización de aquella se inicia desde la primera inhalación. Diez minutos después de fumar, la nicotina ya ha iniciado su descenso —aunque aún permanezca elevada en relación a cifras basales—, en cuyo momento persiste una fuerte elevación de cotinina que continuará aumentando hasta la plena degradación de aquella, que se producirá más tarde, dependiendo del metabolismo individual de cada sujeto. Considerando el número de cigarrillos, que normalmente consumen los fumadores, y teniendo en cuenta la vida media de la cotinina, es evidente que, a lo largo del día, los niveles de éstos serán muy superiores a los de los no fumadores o “fumadores pasivos, resultando de ello la idoneidad de tal determinación para acreditar la exposición crónica al tóxico.

A la vista de todo lo anterior nos parece acreditada la eficacia de tales pruebas, lo que nos lleva a pensar que sería interesante realizar posteriores trabajos de carácter epidemiológico en personas expuestas al tabaco ajeno, preferentemente en niños, a fin de determinar su grado real de exposición, al mismo tiempo que se podrían comparar los resultados obtenidos con la mayor o menor incidencia en éstos, de enfermedades propias del fumador.

BIBLIOGRAFIA

1. Fielding JE. Smoking: health effects and control. *N Engl J Med* 1985; 313: 491-498.
2. Kaufman DW, Helmrich SP, Rosenberg L, Miettinen OS, Shapiro S. Nicotine and carbon monoxide content of cigarette smoke and the risk of myocardial infarction in young men. *N Engl J Med* 1983; 308: 409-413.
3. Pardell Alenta H. El tabaquismo: epidemia de nuestro tiempo. *Med Clin (Barc)* 1985; 85: 539-541.
4. Janoff A, Pryor WA, Bengali ZH. Effects of tobacco smoke components on cellular and biochemical processes in the lung. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1058-1064.
5. Weiss ST, Tager IB, Schenker M, Speizer FE. The health effects of involuntary smoking. *Am Rev Respir Dis*. 1983; 128: 933-942.
6. García Calzado MC, Cobo I. Marcadores biológicos del tabaco. *Med Clin (Barc)* 1989; 93: 186-188.
7. Alvarez-Sala JL, Tello JM, Villegas A, Montero J, Montero E, Espinós D. Carboxihemoglobina en sangre en fumadores pasivos. *N Arch Fac Med*. 1985; 43: 377.
8. Linch C. Half-lives of selected tobacco exposure markers. *Eur J Respir Dis (Suppl)*. 1984; 65: 63-67.
9. Jarvis MJ, Russell MAH, Saloojee Y. Expired air carbon monoxide: a simple breath test of tobacco smoke intake. *Br Med J*. 1980; 281: 484-485.
10. Jarvis MJ, Belcher M, Vesey C, Hutchinson DCS. Low cost carbon monoxide monitors in smoking assessment. *Thorax*. 1986; 41: 886-887.
11. Haley NJ, Axelrad CM, Tilton KA. Validation of self-reported smoking behavior: biochemical analyses of cotinine and thiocyanate. *Am J Public Health*. 1983; 73: 1.204-1.207.
12. Luepker RV, Pechacek TF, Murray DM, Johnson CA, Hund F, Jacobs DR. Saliva thiocyanate: a chemical indicator of cigarette smoking in adolescents. *Am J Public Health*. 1981; 71: 1320-1324.
13. Vogt TM, Selvin S, Widdowson G, Hullely SB. Expired air carbon monoxide and serum thiocyanate as objective measures of cigarette exposure. *Am J Public Health*. 1977; 67: 545-549.
14. Riboli E. Passive smoking and lung cancer: epidemiological evidence and ongoing international collaborative studies. *Toxicology Letters*. 1987; 35: 19-27.
15. Wilcox RG, Hughes J, Roland J. Verification of smoking history in patients after infarction using urinary nicotine and cotinine measurements. *Br Med J* 1979; 2: 1.026-1.028.
16. Langone JL, Gjika HB, Van Vunakis H. Nicotine and its metabolites. Radioimmunoassays for nicotine and cotinine. *Biochemistry*. 1973; 12: 5.025-5.030.
17. García Calzado MC, Cobo I. La cotinina: marcador biológico del tabaco en niños. *An Esp Pediatr*. 1989; 30: 503-506.
18. Verebey KG, De Pace A, Mule SJ, Kanzler M, Jaffe JH. A rapid, quantitative GLC method for the simultaneous determination of nicotine and cotinine. *J Anal Tox*. 1982; 6: 294-296.
19. Kogan MJ, Verebey KG, Jaffe JH, Mule SJ. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in human plasma by nitrogen detection gas-liquid chromatography. *J Forensic Sci*. 1981; 26: 6-11.

20. García Calzado MC, García Rojas JF, Mangas A, Millán J. Determinaciones plasmáticas de nicotina y cotinina: marcadores biológicos del tabaco en fumadores y no fumadores. *Med Clin (Barc)*. 1990; 95: 716-717.
21. García Calzado MC, García Rojas JF, Mangas A, Martínez D, Reppeto M, Millán J. Tabaco y tensión arterial (I): modificaciones hormonales en un modelo de sobrecarga aguda de nicotina. *An Med Intern (Madrid)*. 1990; 7: 340-344.
22. Russell MAH, Feyerabend C. Blood and urinary nicotine in nonsmokers. *Lancet*. 1975; 1: 179-181.
23. Pattishall EN, Strobe GL, Etzel RA, Helms RW, Haley NJ, Denny FW. Serum cotinine as a measure of tobacco smoke exposure in children. *Am J Dis Chil*. 1985; 139: 1.101-1.104.
24. Rosenberg J, Benowitz NL, Jacob P, Wilson KM. Disposition kinetics and effects of intravenous nicotine. *Clin Pharmacol Ther*. 1990; 28: 517-522.
25. Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, Jones RT, Osman AL. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther*. 1983; 34: 604-611.
26. Etzel RA, Greenberg RA, Haley NJ, Loda FA. Urine cotinine excretion in neonates exposed to tobacco smoke products in utero. *J Pediatr*. 1985; 107: 146-148.
27. Russell MAH, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine level after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *Br Med J*. 1976; 1: 1.043-1.046.
28. Hill P, Marquardt H. Plasma and urine changes after smoking different brands of cigarettes. *Clin Pharmacol Ther*. 1980; 27: 652-658.