

Micronúcleos y anomalías nucleares en mucosa bucal para evaluar población en riesgo laboral por mutágenos

Micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa to assess occupational risk population by mutagens

Olivia Torres-Bugarín¹, María Luisa Ramos Ibarra²

1 Profesor Investigador, Sistema Nacional de Investigadores CONACyT Nivel I. Programa Internacional, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, México oliviatorres@hotmail.com

2 Profesor Investigador Titular Departamento. Sistema Nacional de Investigadores (S N I), CONACyT, Nivel I. Salud pública, División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, México maluisaramos@hotmail.com

Recibido 11 Febrero 2013

Aprobado: 04 abril 2013

La utilización de biomarcadores se vislumbra como una herramienta útil en el monitoreo de riesgo laboral, en la prevención de tumores así como en la detección temprana de efectos secundarios de enfermedades y envejecimiento precoz. Por lo que los micronúcleos (MN) constituyen uno de esos biomarcadores de efecto ya que estos se forman durante la transición de metafase – anafase en mitosis y pueden ser cromosomas completos rezagados debido a un daño al uso mitótico (efecto aneuploidógeno) o bien fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico). En ambos casos, no lograron incorporarse al núcleo de las células hijas (1) pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN (2) o la presencia del centrómero o cinetócoro (3). Estos eventos pueden ocurrir espontáneamente, sin embargo, en presencia de ciertos agentes endógenos (4, 5) o exógenos (6-11) tales eventos se incrementan, ocasionando la presencia de MN. Los cuáles se transforman en indicadores del efecto de agentes mutágenos, genotóxicos o teratógenos específicamente micronucleogénicos (12).

El conteo de los MN es llevado a cabo fácilmente en cualquier tejido que se divida, como es el epitelio de mucosa bucal (12). Específicamente, los MN observados en células exfoliadas de tejido epitelial se forman en la capa basal, que es donde se lleva a cabo la división celular, estas migran a la superficie

en el transcurso de cinco a 14 días, por lo que el monitoreo de poblaciones en este tejido puede reflejar el daño ocurrido durante este tiempo, la muestra se toma mediante un raspado de la mucosa, se hace el extendido en portaobjetos perfectamente limpio y se fijan (etanol al 80 %) se tiñen y se analizan entre 500 a 4 000 células y se registran los valores de células micronucleadas (MN) y AN encontrados (12).

Además de los MN en células exfoliadas, Tolbert, et al en 1991 (13), describieron otras AN, las que además de ser fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular son indicadores de daño al DNA, citotoxicidad y muerte celular. Ya que las alteraciones más sugestivas en la morfología de las células neoplásicas se producen en el núcleo, donde las modificaciones son en el tamaño, densidad y distribución de la cromatina. Estas anomalías se pueden distinguir de células normales por sus alteraciones ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo, entre ellas se encuentran la cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), núcleo picnótico (NP), cariolisis (CL), núcleo lobulado (NL), presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas (BN).

El mecanismo de formación o su significado biológico de cada una de estas AN no está muy bien esclarecido, sin embargo se observan altas frecuencias bajo condiciones patológicas (obesidad,

artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, diferentes tipos del cáncer, problemas hematológicos como linfoma inmunoblástico; de Hodgkin; leucemia aguda megaloblástica; granulocítica crónica; linfocítica aguda; anemia linfocítica; mieloma múltiple; anemia trombocitopénica; entre otras, (7) o por exposición a: hidrocarburos, solventes, tabaco, alcohol, drogas y quimioterapia antineoplásica. Incluso Raj y cols., describieron, que al aplicar radioterapia en pacientes con cáncer oral, el efecto dosis- respuesta en la formación tanto de MN como de AN; hecho que podría utilizarse como un marcador de radiosensibilidad (14). Además, también se observan en procesos de envejecimiento, como lo describieron Thomas y cols., en donde los MN, NL y las BN, están elevadas tanto en pacientes con síndrome de Down como en pacientes de edad avanzada (64 a 75 años de edad), (15). Por todas estas características, la prueba de identificación de AN es usada con mucha frecuencia como marcador de daño al ADN (MN y NL), defectos en la citocinesis (BN), evidencia de muerte celular (CC, CR, PN, y CL), indicadores de diferentes etapas de necrosis, (PN, CC, CR, CL), como un identificador de respuesta al daño celular (PN y CC), para su identificación básicamente se usan los criterios establecidos por Tolbert (12-13). Para la evaluación de la genotoxicidad en células, es conveniente que cada participante se enjuague suavemente la boca con agua, se toma la muestra mediante un gentil raspado en cada mejilla con un porta objeto con bordes esmerilados, se realizan los extendidos sobre portaobjetos libres de polvo y grasa y previamente codificado. Los frotis se dejan secar al aire, se fijan en etanol al 80 % por 48 horas y se dejan secar perfectamente al aire para su posterior tinción, se sugiere el anaranjado de acridina, orceina, reactivo de Shiff o bien tinción hematoxilina-eosina. Quien analice las muestras debe desconocer la codificación de las muestras. Las laminillas se observan al microscopio con objetivo de inmersión; se realiza el conteo de al menos 2000 células por paciente y se registran las células micronucleadas (CMN) o con alguna anomalía nuclear (AN) como CBN, CC, CR, NL, CL y PN, es conveniente seguir los criterios establecidos por Tolbert (13).

Además de los datos implicados directamente en la investigación, de cada paciente es necesario conocer ya sea por entrevista, un cuestionario y/o revisión de expedientes clínicos algunos aspectos relevantes como estilos de vida, edad, sexo, peso, talla, estado de salud, consumo de café, tabaco, medicamentos, drogas, última visita al dentista y en la medida de

lo posible resultados de estudios de laboratorio como índice glucémico y perfil lipídico, ya que todos estos factores podrían estar influyendo de manera trascendental en los resultados (6).

CONCLUSIÓN

Por lo tanto, ante la gran necesidad de proteger la salud del trabajador además de promover y facilitar el uso de medidas de seguridad en cualquier empresa, sería extraordinariamente útil contar con diferentes técnicas económicas, prácticas y confiables que permitan estar continuamente monitoreando a los trabajadores para prevenir posibles daños derivados de la exposición laboral y la técnica de MN y AN ofrece en gran parte esa oportunidad, además de ser un método sencillo, no agresivo y relativamente indoloro para los pacientes, por lo que resulta ser bien aceptada por los mismos. Todas estas ventajas, hacen que esta herramienta sea útil en el diagnóstico precoz del daño genotóxico por exposición laboral.

REFERENCIA

- 1.- Schmid W. The Micronucleus Test. *Mutat. Res.* 1975; 31:9-15.
- 2.- Migliore L, Cocchi L, Scarpato R. Detection Of The Centromere In Micronuclei By Fluorescence In Situ Hybridization: Its Application To The Human Lymphocyte Micronucleus Assay After Treatment With Four Suspected Aneugens. *Mutagenesis.* 1996; 11(3): 285-290.
- 3.- Afshari A, Mc Gregor P, Allen J, Fuscoe J. Centromere analysis of micronuclei induced by 2-aminoanthraquinone in cultures mouse splenocytes using both a gammasatellite DNA probe and anti-kinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 1989; 24: 96-102.
- 4.- Ramos-Remus C, Dorazco-Barragan G, Aceves-Ávila FJ, Alcaraz-López F, Torres-Bugarin O, Ventura-Aguilar A, Zúñiga-González G. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clinic. Exp. Rheumatol.* 2002; 208-212.
- 5.- Rodríguez-Vázquez M, Sánchez-Ortiz A, Ramos-Remus C, Zúñiga G, Torres-Bugarín O. Evaluación de la genotoxicidad de la ciclofosfamida mediante prueba de micronúcleos en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Rev. Mex. Rheumatol.* 2000; 15(2): 41-45.
- 6.- Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The Human Micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res.* 2011; 728(3):88-9.
- 7.- Torres Bugarin O. Evaluación de la genotoxicidad de las drogas antineoplásicas mediante el conteo de micronúcleos y otras anomalías nucleares en mucosa bucal y micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica". Tesis de Doctorado. Realizada en el Laboratorio de Mutagénesis,

División de Medicina Molecular, CIBO, IMSS. Doctorado en Genética Humana. Universidad de Guadalajara. 2000.

8.- Torres-Bugarín O, Fernández-García A, Torres-Mendoza BM, Zavala-Aguirre JL, Nava-Zavala A, Zamora-Perez AL. Genetic profile of overweight and obese school-age children. *Toxicol. Environ. Chem.* 2009; 91(4): 789–795.

9.- Torres-Bugarín O, Ventura Aguilar A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Morgan-Villela G, et al. Evaluation of cisplatin + 5-FU, Carboplatin + 5FU, and ifosfamida + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the bucal mucosa. *Mutat Res, Corrigendum; Mutat. Res.* 2004; 31; 565(1):91-101.

10.- Torres-Bugarín O, Covarrubias-Bugarín R, Zamora-Perez AL, Torres-Mendoza BMG, García-Ulloa M, Martínez-Sandoval FG. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. 2007; *BJSM*, 41: 592-596.

11.- Torres-Bugarín O, De Anda-Casillas A, Ramírez-Múñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat. Res.* 1998; 413(3): 277-281.

12.- Holland N, Bolognesi C, Kirsh-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMAN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.* 2008; 659, 93-108.

13.- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 1992; 271: 69-77.

14. - Raj, V, Mahajan, S. Dose response relationship of nuclear changes with fractionated radiotherapy in assessing radiosensitivity of oral squamous cell carcinoma. *J. Clin. Exp. Dent.* 2011; 3(3): e193-200.

15.- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat. Res.* 2008; 638: 37-47.