

PRUEBA DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS BUCALES. UNA REVISIÓN

Buccal cell micronucleus test. A review

Colchado Carhuavilca Jorge R.¹, León Morales Dilma², Luza Montero Silvia³, Medina Katia L.⁴,
Calle Gonzales Rosario⁵, Bardales Hidalgo Carmencita⁶, Figueroa Mercado Carla⁷

¹ MSc. Genética. CD. Laboratorio Bioquímica. Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² Maestrando en Gestión de los Servicios de Salud Universidad César Vallejo.

³ Mg. CD. Laboratorio Embriología e Histología Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

⁴ Mg. CD. Preventiva y Social Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

⁵ PhD. Obst. Departamento de Gineco-Obstetricia Hospital Nacional PNP Luis N. Sáenz.

⁶ PhD. Med. Departamento de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas Hospital Nacional PNP Luis N. Sáenz.

⁷ Mg. Med. Departamento de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas Hospital Nacional PNP Luis N. Sáenz.

RESUMEN

La prueba de micronúcleos se ha convertido en el método más utilizado para evaluar la genotoxicidad de diferentes factores biológicos, físicos y químicos, convirtiéndose poco a poco en un reconocido marcador de daño en el ADN para el biomonitorio de diversas entidades sistémicas. Esta revisión está enfocada principalmente en la prueba de micronúcleos en células bucales, considerado en la actualidad como una prueba prometedora para ser utilizada como biomarcador de eventos patológicos, por las características que presenta al no ser invasiva, tolerada por los pacientes y no requerir de una infraestructura compleja, como equipos de cultivo tisular, para llevarla a cabo. Como se sabe el fundamento de esta prueba es la detección de los micronúcleos, los cuales se originan a partir de cromosomas completos o fragmento de cromosomas que fueron rezagados por genotoxinas durante la mitosis.

Palabras clave: Micronúcleos, Mucosa bucal, Pruebas de Mutagenicidad, ADN.

ABSTRACT

The micronucleus test has become the most widely used method to evaluate the genotoxicity of different biological, physical and chemical factors, gradually becoming a recognized marker of DNA damage for the biomonitoring of various systemic entities. This review is mainly focused on the buccal cell micronucleus test, currently considered a promising test to be used as a biomarker of pathological events, due to the characteristics that it presents as it is non-invasive, tolerated by patients and does not require a complex infrastructure, such as tissue culture equipment, to carry it out. As is known, the basis of this test is the detection of micronuclei, which originate from complete chromosomes or a fragment of chromosomes that were lagged by genotoxins during mitosis.

Key words: Micronuclei, Mouth mucosa, Mutagenicity Tests, DNA.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la información genética es importante en todo ser vivo para perpetrar la vida, sin embargo el ADN, la unidad básica de la herencia es fácilmente susceptible al daño por agentes endógenos y exógenos.¹ El daño en el ADN de tipo endógeno surge de reacciones hidrolíticas oxidativas con especies reactivas de oxígeno, ROS; mientras que el daño exógeno es generado cuando los agentes físicos, ambientales y químicos dañan el ADN.² Todos estos daños a nivel de ADN son considerados como eventos de genotóxicos y pueden ser biomonitoreados por pruebas de genotoxicidad.³

Las pruebas de genotoxicidad valoran a nivel del ADN roturas de cadena simple y doble, mutaciones puntuales, deleciones, aberraciones cromosómicas, formación de micronúcleos, reparación del ADN e interacciones del ciclo celular.⁴ Estas pruebas pueden ser in vitro, usadas para investigar el posible efecto genotóxico de nuevos productos farmacéuticos, materiales médicos, factores químicos y físicos así como venenos; los más utilizados son la pruebas de inducción de mutación de nucleótidos, la prueba de Ames, el ensayo de mutación genética de células de mamíferos o ensayo de linfoma de ratón, pruebas de cambios genómicos más complejos mediante métodos citogenéticos, como el ensayo de intercambio de cromátidas herma-

nas, análisis de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, ensayo de micronúcleos de bloqueo de citocinesis y ensayo cometa.⁵ Por otro lado también están las pruebas de genotoxicidad in vivo que permiten investigar el impacto de los factores ambientales, entorno laboral y cambios asociados a diversas enfermedades; las más utilizadas son tres métodos citogenéticos: el ensayo cometa, el ensayo de aberración cromosómica y las pruebas de micronúcleos que incluyen bloqueo de citocinesis (CBMN), MN de eritrocitos de mamíferos (EMN) y micronúcleos en células bucales.^{4,5}

Los micronúcleos fueron identificados por primera vez en los glóbulos rojos por los hematólogos Howell y Jolly, de ahí que también reciben el nombre de cuerpos de Howell-Jolly⁶, en pacientes esplenectomizados con anemia megaloblástica y anemia de células falciformes, en donde los micronúcleos se encontraban aumentados en aquellos expuestos a radiación ionizante y deficiencias de vitamina B-12⁷, la medida de micronúcleos en glóbulos rojos tanto de médula como de sangre periférica es llevada a cabo en la prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos in vivo, sobre todo en la evaluación genotóxica en roedores.⁸ Los micronúcleos son fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que se forman durante el anafase y quedan cuando el núcleo se divide después de la telofase, estos fragmentos de cromosoma pueden no incluirse en los núcleos de las células hijas, sino que forman micronúcleos únicos o múltiples en el citoplasma.⁹ La presencia de micronúcleos es sinónimo de genotoxicidad. El ensayo de micronúcleo (MN) de células bucales, es útil, como un biomarcador de daño genético, causado por, hábitos de vida como consumo de productos del tabaco y el alcohol, deficiencia de micronutrientes, exposición a contaminantes ambientales como pesticidas, arsénico, formaldehído, etc., procedimientos médicos (radio y/o quimioterapia), así como, defectos genéticos heredados.¹⁰ La naturaleza no invasiva de esta técnica hace que sea un candidato atractivo para el biomonitorio de poblaciones humanas o de individuos.^{10,11}

ESTADO DEL ARTE

Células de la mucosa bucal

La mucosa bucal es una membrana de tejido epitelial que recubre la cavidad oral, es utilizado en estudios de cito y genotoxicidad por ser de fácil acceso, no invasiva y tolerada por los pacientes.¹² Proporciona una barrera fisiológica a los carcinógenos, que ingresan a nuestro cuerpo todo esto añadido que el 90% de los cánceres son de origen epitelial resulta beneficioso que se emplee la mucosa bucal como medio para biomonitoriar eventos genotóxicos tempranos como resultado de tratamientos con radioterapia, exposición ocupacional a sustancias químicas así como para estudios de prevención del cáncer¹³, es así

que en los estudios sobre radiación realizados por Moore et al., se pudo detectar un aumento de 16 veces en la frecuencia de micronúcleos en pacientes con cáncer oral después de completar el tratamiento con fotones.¹⁴

La mucosa bucal es un epitelio escamoso estratificado que consta de cuatro capas distintas, externamente se encuentra el estrato córneo o capa celular queratinizada, es aquella que recubre la cavidad oral que comprende aquellas células que continuamente se van exfoliando como resultado del desgaste del tejido superficial, a continuación se encuentra el estrato granulosum o también llamada capa celular granular, seguidamente está el estrato espinoso, o también conocida como capa de células prickle, la cual contiene poblaciones de células diferenciadas, apoptóticas y necróticas, por último debajo de todas las capas se encuentra las clavijas rete o estrato germinativum, que contienen las células basales así como células madre en división activa, la utilización de células de la mucosa bucal permite indirectamente estudiar la capacidad regenerativa del tejido epitelial en seres humanos.¹⁵

Diferenciación celular en la mucosa bucal

Células basales: estas células presentan un núcleo grande y uniformemente teñido, son más pequeñas y ovaladas, que las células diferenciadas; no se observan estructuras que contengan ADN aparte del núcleo¹⁶, se observa en la figura 1a.

Células normales “diferenciadas”: presentan un núcleo uniformemente teñido de forma redonda u ovalada, son más pequeñas y ovaladas; son más grandes que las células basales; no se observan estructuras que contengan ADN aparte del núcleo², se muestra en la figura 1b.

Células con micronúcleos: estas células presentan un núcleo principal y una estructura nuclear más pequeña llamada micronúcleo, este debe tener un diámetro de 1/3 a 1/6 del núcleo principal, tincionados con la misma intensidad y textura; el micronúcleo debe estar ubicado dentro del citoplasma celular¹⁷, se puede observar en la figura 1c y d. **Células con brotes nucleares:** son células que presentan núcleos con una constricción aparentemente aguda en un extremo del núcleo que sugiere un proceso de gemación; originalmente fueron llamados “óvulos rotos”; el brote nuclear (NBUD) y el núcleo están generalmente muy cerca y parecen estar unidos entre sí, la yema nuclear tiene la misma morfología y propiedades de tinción que el núcleo; sin embargo, su diámetro puede variar de la mitad a un cuarto del núcleo principal; el mecanismo que conduce a la formación de brotes nucleares no se conoce, pero puede estar relacionado con la eliminación del ADN amplificado o la reparación del ADN¹⁸, se muestra en la figura 1e.

Células binucleadas: estas células presentan dos núcleos principales, suelen estar muy cerca e incluso pueden tener contacto¹⁹, como se indica en la figura 1f.

Células con cromatina condensada: son células que muestran un patrón nuclear más o menos estriado en el que la cromatina agregada se tiñe intensamente; en estas células es evidente que la cromatina se está agregando en algunas regiones del núcleo mientras que se pierde en otras áreas; cuando la agregación de cromatina es extensa, el núcleo puede parecer fragmentado; estas células pueden estar experimentando las primeras etapas de la apoptosis²⁰, se presenta en la figura 1g.

Células cariorreicas: estas células tienen núcleos que se caracterizan por una agregación de cromatina nuclear más extensa en relación con las células de cromatina condensadas; además su patrón nuclear se caracteriza por ser densamente moteado indicativo de fragmentación

nuclear que conduce a la eventual desintegración del núcleo; una característica adicional en estas células es la posible experimentación de una etapa tardía de apoptosis²¹, se observa en la figura 1h.

Células picnóticas: estas células se caracterizan por presentar un pequeño núcleo encogido, con una alta densidad de material nuclear que se tiñe de forma uniforme e intensamente, el diámetro nuclear es generalmente de uno a dos tercios de un núcleo en células normales diferenciadas; aparentemente estas células pueden estar experimentando una forma única de muerte celular por un mecanismo aún desconocido²², se muestra en la figura 1i.

Células cariolíticas: son células en las que el núcleo está completamente agotado de ADN y es evidente como una imagen fantasmal que no tiene tinción; estas células parecen no tener núcleo y representan una etapa muy tardía en el proceso de muerte celular²³, se observa en la figura 1j.

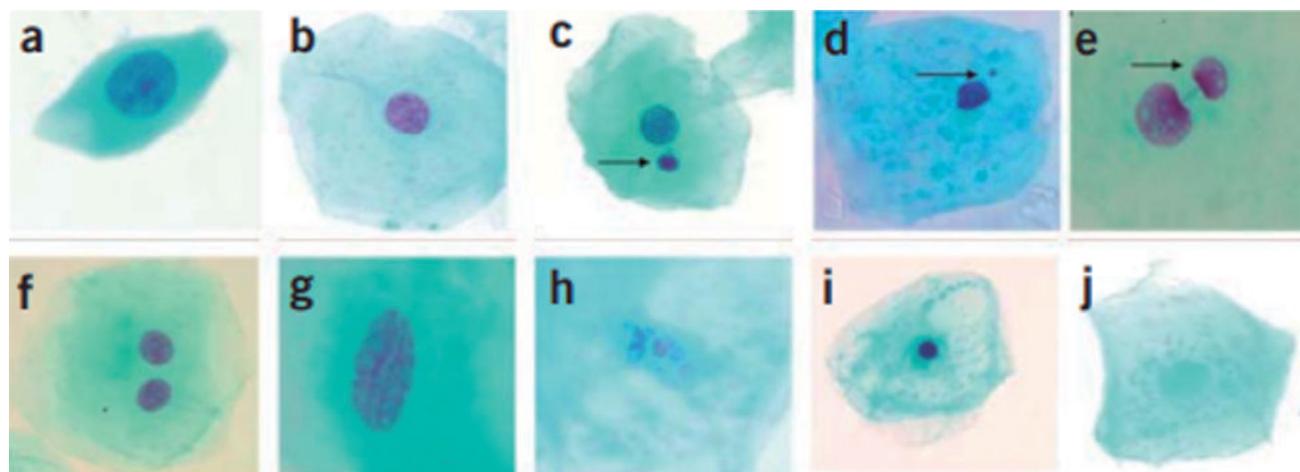


Figura 2. Imágenes de diferentes tipos de células de la mucosa bucal normales y con anomalías nucleares. (a) célula basal; (b) célula diferenciada; (c) célula con diferenciación temprana y con micronúcleo (flecha); (d) célula con diferenciación tardía y con micronúcleo (flecha); (e) célula diferenciada con yema nuclear (flecha); (f) célula binucleada; (g) célula de cromatina condensada; (h) célula cariorreica; (i) célula picnótica; (j) Célula cariolítica. Tomado de Thomas P, Holland N, Bolognesi C.

Pruebas de Micronúcleos

Es una de las pruebas de genotoxicidad que puede aplicarse tanto *in vitro* como *in vivo* y evalúa los efectos mutagénicos de los contaminantes, puede aplicarse fácilmente en diferentes células y tejidos.²⁴ La prueba de micronúcleos detecta efectos tanto clastogénicos (rotura de cromosomas) como aneugénicos (número anormal de cromosomas) y es adecuada para detectar la genotoxicidad de una amplia gama de compuestos.²⁵ Este método se utiliza ahora de forma rutinaria para medir la rotura de cromosomas, la reparación alterada del ADN, la pérdida de cromosomas, la no disyunción, la necrosis, la apoptosis y la citostasis, además es fácil de puntuar y tiene ventajas sobre otros métodos citogenéticos, como los intercambios de cromátidas hermanas o las aberraciones cromosómicas.²⁶

Tipos de pruebas de micronúcleos

Prueba de Micronúcleo por Bloqueo de Citocinesis (CBMN)

Esta prueba utiliza células de humanos, roedores, conejos, peces, perros, primates, etc. linfocitos o líneas celulares, con la finalidad de poder biomonitorar la dosimetría biológica y la genotoxicidad *in vitro* o *in vivo*, como experimentos biológicos donde se evalúa el daño citogenético; la característica principal de esta prueba es la puntuación de células binucleadas e inhibición de la citocinesis mediante el tratamiento de cultivos celulares con citocalasina B (Cyt-B) durante 24 a 30 h.²⁷

Prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos in vivo

Esta prueba utiliza células humanas, roedores, conejos, peces, perros, primates, eritrocitos inmaduros; el propósito principal de esta prueba es determinar la genotoxicidad in vivo de productos químicos, drogas o condiciones nocivas, se caracteriza porque se utiliza para la detección del daño inducido por la sustancia de ensayo en los cromosomas o el aparato mitótico de los eritroblastos, mediante el análisis de eritrocitos extraídos de la médula ósea y/o células de sangre periférica de animales, generalmente roedores como ratones o ratas.²⁸

Pruebas de micronúcleos en otros tipos de células

Las pruebas en micronúcleos pueden llevarse a cabo en células de la mucosa nasal, células derivadas del tracto urinario, el objetivo de esta prueba es el biomonitorio y la genotoxicidad, de ciertos tipos de cáncer.²⁹

Prueba de micronúcleos en células bucales

Esta prueba es conocida como Ensayo de Citoma de Micronúcleo Bucal (BMCyt), como se sabe, los micronúcleos en células bucales se forman en el organismo, en tejido epitelial bucal que se divide rápidamente, considerando que las células de la cavidad oral están expuestas a factores genotóxicos o citotóxicos por inhalación e ingestión de alimentos en mayor medida que los linfocitos de sangre periférica³⁰; para la realización de esta prueba se emplean células epiteliales de la mucosa bucal de humanos, cuyo objetivo es determinar el impacto de la nutrición; hábitos de estilo de vida, como fumar y beber alcohol, exposición genotóxica, exposición citotóxica, riesgo de envejecimiento acelerado, ciertos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas³¹, por otro lado, la prueba de micronúcleos en células bucales tiene el potencial de ser utilizado para identificar la inestabilidad genómica heredada como el síndrome de Bloom³²; además una de las principales características de esta prueba es no ser invasiva, tolerada por los pacientes y apta para el biomonitorio.³³

Biomarcadores y anomalías nucleares en la prueba de micronúcleos en células bucales

Esta prueba no solo visualiza la presencia de células con micronúcleos, sino también permite el hallazgo de otras anomalías nucleares, cuya presencia indica diversos eventos:

1. La presencia de micronúcleos y/o brotes nucleares, es un biomarcador de daño en el ADN.²⁶

2. La presencia de células binucleadas es un biomarcador de defectos citocinóticos.³⁴
3. La presencia de células basales es un biomarcador de potencial proliferativo.³⁵
4. La presencia de cromatina condensada, karyorrhexis, células picnóticas y cariolíticas; son biomarcadores de muerte celular.³⁶

Aumento en el número de micronúcleos

Básicamente, existen seis causas principales para el aumento de la formación de micronúcleos²⁷:

1. defectos genéticos en las proteínas necesarias para la mitosis y sus puntos de control.
2. Defectos genéticos en las enzimas reparadoras del ADN,
3. exposición excesiva a genotoxinas químicas,
4. excesiva exposición a radiaciones ionizantes,
5. genotoxinas endógenas excesivas generadas por procesos metabólicos estresados, y
6. deficiencia en los micronutrientes necesarios como cofactores para la replicación y reparación del ADN.

DISCUSIÓN

Una de las primeras investigaciones en realizar la prueba de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa bucal fue realizado por Stich *et al.*, en 1982, donde sugieren que el ensayo de micronúcleos en células exfoliadas es más ventajoso, sobre el ampliamente utilizado test de micronúcleos en linfocitos, de esta forma el tejido diana puede ser estudiado directamente, evitando la extrapolación, en este estudio consideraron que, las células epiteliales no necesitan ser estimuladas para hallarlas en mitosis, como ocurre en los linfocitos; además que los micronúcleos en células exfoliadas reflejaban los eventos genotóxicos que ocurrían en la capa basal, en las semanas 1 y 3 antes de la división celular.¹³ Posteriormente, en 1983 Stich *et al.*, consideraron a la prueba de micronúcleos, como una técnica aceptable, no invasiva y que no requiere la toma de muestras repetidas, además sugirieron como sitios potenciales de estudio a la cavidad oral y nasal, bronquios, vejiga, esófago, cuello del útero y riñones.³⁷ En las investigaciones realizadas por Sarto *et al.*, en 1987, consideraron a la prueba de micronú-

cleos realizadas en células exfoliadas del carrillo de la mucosa bucal humana como una prueba validada, muy sensible y capaz de detectar el efecto carcinógeno/genotóxico de diversas sustancias aún a exposiciones bajas de las mismas.³⁸

Por otro lado, Tolbert *et al.*, en 1991, realizaron modificaciones al ensayo de micronúcleos, proponiendo mejoras en los criterios de puntuación de estos y la inclusión de otras anomalías nucleares en el sistema de puntuación, de esta manera se pudo evidenciar la presencia de otras anomalías nucleares tan comunes como la micronucleación.³⁹ No fue hasta el 2007 cuando los estudios de Fenech *et al.*, establecieron que la naturaleza no invasiva de la prueba de micronúcleos en células bucales, lo convertían en un candidato atractivo para el biomonitorio de poblaciones humanas con daño genético, causado por malos hábitos de vida, exposición a contaminantes ambientales, procedimientos médicos, así como, defectos genéticos heredados en la reparación del ADN.⁴⁰

El estudio realizado por Martínez-Pérez *et al.*, en el 2007, describe un aumento en la frecuencia de micronúcleos en células bucales en diabéticos tipo 2 en comparación con un control sano; en esta investigación los autores sugieren que los micronúcleos pueden ser considerados biomarcadores útiles de daño citotóxico en individuos que padecen de diabetes mellitus tipo 2 y puede reflejar un mayor riesgo de cáncer.²⁴ En ese mismo año Zúñiga-González *et al.*, realizaron un estudio en donde consideraron al ácido fólico en la reducción de micronúcleos en personas que padecen de diabetes mellitus tipo 2, en esta investigación concluyeron que la diabetes mellitus propicia un aumento en la frecuencia de micronúcleos y que el ácido fólico puede proteger contra el incremento de estos.⁴¹

Posteriormente, Shaik *et al.*, en el 2010, consideraron utilizar a la prueba de micronúcleos en células bucales como biomarcador para evaluar el daño genotóxico en la diabetes mellitus tipo 2 bajo terapia farmacológica antihiperglicémica a largo plazo, al estudiar paciente con tratamiento a largo plazo de pioglitazona y glimepirida.⁴² Unos años más tarde, Bharathi *et al.*, en el 2015, después de desarrollar un estudio en diabéticos y fumadores, concluye que, en el diabético tipo 2 el tabaquismo y el aumento en los niveles de glucosa, genera un aumento en la frecuencia de micronúcleos.⁴³

Los resultados fueron más alentadores cuando en el 2016 Gómez-Meda *et al.*, llevaron a cabo un estudio en donde consideraron que la ingesta de suplementos vitamínicos como el ácido fólico, reducen el número de micronúcleos y otras anomalías nucleares en el paciente con diabetes mellitus tipo 1 y 2.⁴⁴ En ese mismo año Rathod *et al.* 2016, llegaron a concluir que la prueba de micronúcleos

en células bucales puede considerarse un biomarcador de daño en el ADN no sólo en pacientes diabéticos tipo 2 sino también en aquellos que padecen de Parkinson.⁴⁵

En los estudios realizados por Biswas *et al.*, 2017, llegaron a la conclusión que en el diabético tipo 2 el aumento en el número de micronúcleos estaba relacionada severo daño del ADN, posiblemente por el estrés oxidativo que conduce a la inestabilidad genómica, la cual puede provocar progresión de la diabetes y que, sus complicaciones pueden provocar en el futuro riesgo de padecer cáncer.⁴⁶

Al año siguiente Ojeda *et al.*, en el 2018, llevaron a cabo una investigación sobre la genotoxicidad por medio de la prueba de micronúcleos en células bucales en diabéticos tipo 1 con tratamiento de insulina y en diabéticos tipo 2 con tratamiento de metformina, hallando un incremento de micronúcleos tanto en el diabético tipo 1 y el 2.⁴⁷ Finalmente, Gupta *et al.*, en el 2018, hallaron que el porcentaje de micronúcleos fue significativamente mayor en diabéticos no controlados en comparación con diabéticos controlados y no diabéticos, de esta manera concluyeron que, la diabetes mellitus induce cambios morfológicos y morfométricos definidos en las células de la mucosa del carrillo bucal.⁴⁸

CONCLUSIONES

La prueba de micronúcleos en células bucales es una prueba de genotoxicidad que paralelamente al hallazgo de los micronúcleos en sí permite visualizar múltiples anomalías nucleares, pudiendo de esta manera biomonitoriar el estado del paciente de acuerdo a los hallazgos encontrados. En vista de lo mencionado en esta revisión es necesario la realización de futuras investigaciones enfocadas a las diversas patologías, con la finalidad de determinar su utilidad en el biomonitorio de estas. Se espera que esta prueba sea de uso común por los profesionales de salud por las características que presenta.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiamiento: Fue autofinanciada, no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiamiento en los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

Contribuciones de los autores: Colchado J., León D., Luza S., Medina K., Calle R., Bardales C., Figueroa C., contribuyeron en la concepción, diseño, adquisición, análisis, redacción, revisión crítica y aprobación final del manuscrito. Todos los autores acordaron ser responsables de todos los aspectos del trabajo.

Correspondencia:

Jorge R. Colchado Carhuavilca

Correo electrónico:

jcolchadoc@unmsm.edu.pe
Lima, Perú.

Referencias Bibliográficas

1. Chatterjee N, Walker G. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* [Internet]. 2017; 58: 235–263. Doi: 10.1002/em.22087
2. Friedberg E, McDaniel L, Schultz R. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev.* [Internet]. 2004; 14: 5–10. Doi: 10.1016/j.gde.2003.11.001
3. Kang S, Kwon J, Lee J. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J Cancer Prev.* [Internet]. 2013; 18: 277–288. Doi: 10.15430/jcp.2013.18.4.277
4. Turkez H, Arslan M, Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* [Internet]. 2017; 13: 1089–1098. Doi: 10.1080/17425255.2017.1375097
5. Mohamed S, Sabita U, Rajendra S, Raman D. Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods. *Glob J Pharmaceu Sci.* [Internet]. 2017;1(5):555575. Doi: 10.19080/gjpps.2017.01.555575
6. Sears D, Udden M. Howell-Jolly bodies: a brief historical review. *Am J Med Sci.* [Internet]. 2012; 343: 407–409. Doi: 10.1097/MAJ.0b013e31823020d1.
7. Bain B. Prominent Howell-Jolly bodies when megaloblastic anemia develops in a hyposplenic patient. *Am J Hematol.* [Internet]. 2014;89(8): 852. Doi:10.1002/ajh.23747.
8. Hayashi M, Tice R, MacGregor J, Anderson D, Blakey D, Kirsh-Volders M. et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res.* [Internet]. 1994; 312(3): 293–304. Doi: 10.1016/0165-1161(94)90039-6.
9. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* [Internet]. 2000; 455(1): 81–95. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
10. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* [Internet]. 2007;455(2): 1084–1104. Doi:10.1038/nprot.2007.77
11. Thomas P, Hecker J, Faunt J. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis.* [Internet]. 2007; 22(6): 371–379. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/gem029>
12. Sarto F, Tomanin R, Giacomelli L. The micronucleus assay in human exfoliated cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chromic acid and ethylene oxide. *Mutat Res.* [Internet]. 1990; 244(4): 345–351. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90083-V](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90083-V)
13. Stich H, Curtis J, Parida B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer.* [Internet]. 1982; 30(5): 553–559. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910300504>
14. Moore L, Warner M, Smith A, Kalman D, Smith M. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen.* [Internet]. 1996; 27(3): 176–184. Disponible en: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)27:3<176::AID-EM2>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:3<176::AID-EM2>3.0.CO;2-D)
15. Squier C, Brogden K. *Human Oral Mucosa: Development, Structure and Function.* John Wiley & Sons, 2010.
16. Sabharwal R, Syed M, Sharma T, Subudhi S, Mohanty S, Gupta S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. *Indian J Med Paediatr Oncol.* [Internet]. 2015; 36(4):212–218. Doi: 10.4103/0971-5851.171541
17. Tolbert P, Shy C, Allen J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* [Internet]. 1992; 271(1): 69–77. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116159>
18. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan A. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* [Internet]. 2011; 26(1): 125–132. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
19. Xanthopoulou L, Delhanty J, Mania A. The nature and origin of binucleate cells in human preimplantation embryos: relevance to placental mesenchymal dysplasia. *Reprod Biomed Online.* [Internet]. 2011; 22(4): 362–370. Doi: 10.1016/j.rbmo.2011.01.001
20. Kiraly G, Simonyi A, Turani M. Micronucleus formation during chromatin condensation and under apoptotic conditions. *Apoptosis.* [Internet]. 2017; 22(22): 207–219. Doi:10.1007/s10495-016-1316-4
21. Teshiba R, Kawano S, Wang L, He L, Naranjo A, London W, et al. Age-dependent prognostic effect by Mitosis-Karyorrhexis Index in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol.* [Internet]. 2014; 17: 441–449. Doi: 10.2350/14-06-1505-OA.1
22. Naga M, Gour S, Nallagutta N, Reddy K, Velindandla S, Manikya S. Buccal Micronucleus Cytome Assay in

- Sickle Cell Disease. *J Clin Diagn Res.* [Internet]. 2016; 10(6): ZC62–64. Doi: 10.7860/JCDR/2016/19984.7998
23. Fink S, Cookson B. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* [Internet]. 2005; 73(4): 1907–1916. Doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005
 24. Martínez L, Cerda R, Gallegos E, Dávila M, Ibarra E, Cortés E. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep.* [Internet]. 2007; 108(3): 248–255.
 25. Rosefort C, Fauth E, Zankl H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis.* [Internet]. 2004; 19: 277–284.
 26. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutat Res - Rev Mut Res.* [Internet]. 2020; 786: 108342.
 27. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes.* [Internet]. 2020;11(10):1203. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/genes11101203>
 28. Oecd, OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. [Internet]. 2014. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264224292-en>
 29. Nersesyan A, Kundi M, Fenech M, Bolognesi C, Misik M, Hartmann M, et al. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. *Mutat Res - Rev Mut Res.* [Internet]. 2014; 762: 37–51. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.04.004
 30. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Roggeri P, Ceppi M, Bruzzone M, et al. Inter-laboratory consistency and variability in the buccal micronucleus cytome assay depends on biomarker scored and laboratory experience: results from the HUMNxl international inter-laboratory scoring exercise. *Mutagenesis.* [Internet]. 2017; 32(1): 257–266. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/gew047>
 31. Fenech M, Holland N, Zeiger E. The HUMN and HUMNxl international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis.* [Internet]. 2011; 26(1): 239–245. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq051>
 32. Rosin MP, German J. Evidence for chromosome instability in vivo in Bloom syndrome: increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. *Hum Genet.* [Internet]. 1985; 71: 187–191. Doi:10.1007/BF00284570
 33. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol.* [Internet]. 2011; 682: 235–248. Doi:10.1007/978-1-60327-409-8_17
 34. Ursini C, Di Basilio M, Ciervo A, Fresegna A, Maiello R, Buresti G, et al. Biomonitoring of workers employed in a titanium dioxide production plant: use of buccal micronucleus cytome assay as noninvasive biomarker to evaluate genotoxic and cytotoxic effects. *Environ Mol Mutagen.* [Internet]. 2021; 62(4): 242–251. Doi: doi:10.1002/em.22431
 33. Gusterson B, Eaves C. Basal-like breast cancers: from pathology to biology and back again. *Stem Cell Reports.* [Internet]. 2018; 10(5): 1676–1686. Doi: 10.1016/j.stemcr.2018.04.023
 36. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* [Internet]. 2007; 35: 495–516. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
 37. Stich H, San R, Rosin M. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann N Y Acad Sci.* [Internet]. 1983; 407(1): 93–105. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb47816.x>
 38. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* [Internet]. 1987; 2(1): 11–17. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/2.1.11>
 39. Tolbert P, Shy C, Allen J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol.* [Internet]. 1991; 134(8): 840–850. Doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a116159.
 40. Fenech M, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, et al. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells--a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis.* [Internet]. 2007; 22(1): 3–4. Doi: 10.1093/mutage/gel056.
 41. Zuniga G, Batista C, Gómez B, Ramos M, Zamora A, Muñoz T, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat. Res.* [Internet]. 2007; 634(1-2) 126–134. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.06.006.
 42. Shaik N, Shaik J, Ali S, Imram A, Rao D. Increased frequency of micronuclei in diabetes mellitus patients using pioglitazone and glimepiride in combination. *Food Chem Toxicol.* [Internet]. 2010; 48(12): 3432–3435. Doi: 10.1016/j.fct.2010.09.016.
 43. Bharathi Gheena. Micronuclei in Diabetics and Smokers. *J Adv Pharm Technol Res.* [Internet]. 2015; 8: 1173. Doi: 10.5958/0974-360X.2015.00213.9
 44. Gómez B, Zamora A, Muñoz T, Sánchez M, García J, Guerrero C, et al. Nuclear abnormalities in buccal mucosa cells of patients with type I and II diabetes treated with folic acid. *Mutat Res Genet Toxicol*

- Environ Mutagen. [Internet]. 2016; 797: 1–8. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.12.003
45. Rathod S, Raj A, Jadhav P, Sarda T. Assessment of cytogenic damage in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus subjects through micronucleus test. Saudi J Oral Sci. [Internet]. 2016; 3:75-80. Doi: 10.4103/1658-6816.188075
46. Biswas P, Banerjee N, Bhattacharya P, Adhikari A, Shankarashis M, De M. Micronuclei in exfoliated buccal cells: a biomarker for dna damage leading to progression of late diabetic complications in type 2 diabetes mellitus patients. Int J Curr Adv Res. [Internet]. 2017; 6: 2366–2371. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.24327/ijcar.2017.2371.0011>
47. Quintero J, Aguilar M, Olimón V, García R, Ayala A, Romero J. Increased micronuclei frequency in oral and lingual epithelium of treated Diabetes Mellitus patients. BioMed Res Int. [Internet]. 2018; 9: 1–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/4898153>
48. Gupta A, Ahmed J, Shenoy N. Buccal Smear: A promising tool in the diagnosis of diabetes mellitus. Trav Hum. [Internet]. 2018; 1: 1675–1680. Disponible en: <http://eprints.manipal.edu/id/eprint/151483>

Recibido: 03 Agosto 2021

Aceptado: 15 Diciembre 2021