

El Residente

REVISIÓN

Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral

Olivia Torres-Bugarín,^{*} María Guadalupe Zavala-Cerna,^{*} Nicole Macriz-Romero^{**}
Aurelio Flores-García,^{***} María Luisa Ramos-Ibarra[†]

RESUMEN. El estudio del riesgo laboral como consecuencia de la exposición a residuos peligrosos debe ser prioridad ya que en distintos ámbitos laborales se tiene contacto con productos mutagénicos, y en algunos casos no se atiende a las medidas de seguridad necesarias. Por otro lado, los métodos utilizados en la evaluación de este riesgo frecuentemente son costosos, complicados e invasivos. Ante este panorama, la técnica de micronúcleos y anormalidades nucleares en mucosa bucal, que consiste en observar al microscopio la morfología de las células epiteliales superficiales después de su toma, fijación y tinción, ofrece una oportunidad en el monitoreo del daño genético en las poblaciones con alto riesgo laboral por la exposición a genotóxicos. La prueba es rápida, sencilla, económica, mínimamente invasiva, relativamente indolora y bien aceptada por los pacientes; además, no es necesaria la utilización de un cultivo celular, por lo que podría ser utilizada en el diagnóstico precoz del daño genotóxico derivado de la exposición laboral o como prueba para monitorizar los efectos benéficos producidos por cambios en el estilo de vida o el efecto de algún medicamento en diversas patologías.

Palabras clave: Riesgo laboral, genotoxicidad, micronúcleos, anormalidades nucleares, mucosa bucal.

ABSTRACT. *The study of occupational risk from exposure to hazardous waste should be a priority since several occupational environments require some contact with mutagenic products and in some instances the necessary security measures are not followed. Furthermore, methods used to evaluate occupational risk are often expensive, complicated and invasive. In contrast, the micronucleus assay (MN) and nuclear abnormalities (NA) in oral mucosa allow microscopic observation of the morphology of surface epithelial cells after collection, fixation and staining. This technique provides an opportunity to monitor the genetic damage in populations with high occupational risks due to genotoxic exposure products, other than that the test is quick, simple, affordable, minimally invasive, relatively painless and well tolerated by patients, furthermore there's no need for a cellular culture, for these reasons it could be used in the early diagnosis of genotoxic damage resulting from occupational exposure or as a screening test to monitor beneficial effects as a result of changes in life style or specific treatments in diverse pathologies.*

Key words: Occupational risk, genotoxicity, micronucleus, nuclear abnormalities, buccal mucosa.

* Programa Internacional, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México.

** Estudiante de 6° Semestre de la licenciatura en medicina, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara Zapopan, Jalisco, México.

*** Unidad Académica de Medicina, Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, Nayarit, México.

† Departamento. Salud Pública, División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México.

Correspondencia:

Dra. en C. Olivia Torres-Bugarín.

Universidad Autónoma de Guadalajara, Facultad de Medicina. Av. Patria 1201, Lomas del Valle, 3a. Sección, Apartado Postal 1-440, 44100, Guadalajara, Jalisco, México. Tel: 3648-8824, exts. 33152 o 33052. E-mail: oliviatorres@hotmail.com

Recibido: 27 de febrero de 2013. Aceptado con modificaciones: 26 de abril de 2013.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: www.medigraphic.com/elresidente

ANTECEDENTES

El número de publicaciones con relación a la prueba de micronúcleos se ha incrementado exponencialmente en años recientes. Este fenómeno se debe a diversos factores, entre los que se incluyen la relativa sencillez de la prueba, el hecho de que la obtención de la muestra es mínimamente invasiva y su costo bajo. Actualmente, los micronúcleos constituyen un biomarcador de efecto genotóxico ya que éstos son cuerpos extranucleares que se formaron durante la mitosis en la transición de metafase-anafase y pueden ser cromosomas completos rezagados por daño al uso mitótico (efecto aneuploidógeno), o bien fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico); en cualquiera de los casos, no lograron incorporarse a ninguno de los núcleo de las células hijas.¹ Los micronúcleos se pueden diferenciar unos de otros por su tamaño² o la presencia del centrómero o cinetócoro.³ Estos eventos pueden ocurrir espontáneamente; sin embargo, dichos fenómenos se incrementan en presencia de ciertas condiciones endógenas⁴⁻⁶ o exógenas.⁷⁻⁹ Así, la presencia de micronúcleos puede emplearse como indicador del efecto de agentes mutágenos, genotóxicos o teratógenos, principalmente micronucleogénicos.¹⁰

El conteo de los micronúcleos es llevado a cabo fácilmente en cualquier tejido que se divida,¹⁰ como en el epitelio de mucosa bucal.^{7,11} Específicamente, los micronúcleos observados en células exfoliadas de tejido epitelial se forman en las células de la capa basal que es donde se lleva a cabo la división celular; éstas migran a la superficie en el transcurso de cinco a 14 días, de tal suerte que el monitoreo de poblaciones mediante la observación de este tejido puede reflejar el daño ocurrido durante este tiempo.^{7,11}

Si bien es cierto que es posible aplicar la prueba de micronúcleos en cualquier tejido que se divida, en teoría todos los epitelios son candidatos de tejidos potencialmente utilizables; sin embargo, las características del epitelio de la mucosa oral favorecen su utilización en pruebas para evaluar genotóxicos o citotóxicos, debido a que es de fácil acceso, pero además la

mucosa oral es el punto de contacto con muchos agentes potencialmente peligrosos. De hecho, la mucosa oral representa una barrera protectora para potenciales carcinógenos que, al ser metabolizados, generarían múltiples metabolitos reactivos; este tejido protege al resto del organismo de que estos compuestos penetren a otros órganos; sin embargo, al estar expuesta a estos agentes, la mucosa es susceptible de sufrir daño. Otra característica que impulsa a utilizar este tejido como punto de estudio es el que este epitelio cuenta con una capacidad especial proliferativa, lo que permite que la población celular se mantenga constante; no obstante, esta particularidad lo vuelve más vulnerable a lesiones producidas en el ADN; por lo que cobra relevancia, ya que se calcula que el 90% de todos los tipos de cáncer tienen origen epitelial. De tal manera que la mucosa oral podría ser usada para monitorear eventos genotóxicos tempranos causados por cancerígenos inhalados o ingeridos.¹² Por otra parte, es importante considerar que aproximadamente el 60% del total de la superficie de revestimiento oral es epitelio no queratinizado, lo que favorece la absorción de colorantes y facilita a la vez la observación e identificación de características morfológicas del núcleo y la membrana celular a través del microscopio, aunado a que los queratinocitos son células muy grandes con abundante citoplasma y núcleo bien definido y sin lobulaciones.¹³

Además de los micronúcleos en células exfoliadas, Tolbert y su grupo describieron en 1991 otras anomalías nucleares que son fenómenos que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular y son indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular, ya que las alteraciones más sugestivas en la morfología de las células neoplásicas se producen en el núcleo; dichas modificaciones consisten en cambios en el tamaño, densidad y distribución de la cromatina. Estas anomalías pueden distinguirse de células normales, ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo; entre ellas se encuentran la cromatina condensada, cariorrexis, núcleo picnótico, cariólisis, núcleo

lobulado, presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas. El mecanismo de formación o el significado biológico de cada una de estas anomalías nucleares no está del todo esclarecido hasta el momento. Sin embargo, bajo condiciones patológicas (obesidad, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, diferentes tipos del cáncer; problemas hematológicos como linfoma inmunoblástico, leucemia aguda megaloblástica, linfoma Hodgkin, leucemia granulocítica crónica, anemia linfocítica, mieloma múltiple, anemia trombocitopénica, púrpura trombocitopénica idiopática, leucemia linfocítica aguda, entre otras)¹⁴ o condiciones de exposición (tabaco, alcohol, drogas, quimioterapia antineoplásica), se observan altas frecuencias. Incluso Raj y asociados describieron, al aplicar radioterapia en pacientes con cáncer oral, el efecto dosis-respuesta en la formación tanto de micronúcleos como de anomalías nucleares, fenómeno que podría ser utilizado como marcador de radiosensibilidad;¹⁵ también se observan en procesos de envejecimiento, como lo describieron Thomas y colaboradores, en donde los micronúcleos, el núcleo lobulado y las células binucleadas están elevadas tanto en pacientes con síndrome de Down como en pacientes de edad avanzada (64 a 75 años de edad).¹⁶ Por todas estas características, la prueba de identificación de anomalías nucleares es usada con mucha frecuencia como marcador de daño al ADN (micronúcleos y núcleo lobulado), defectos en la citocinesis (células binucleadas), evidencia de muerte celular (cromatina condensada, cariorrexis, núcleo picnótico, y cariólisis), indicadores de diferentes etapas de necrosis, (núcleo picnótico, cromatina condensada, cariorrexis, cariólisis), como un identificador de respuesta al daño celular (núcleo picnótico y cromatina condensada) y para su identificación se utilizan los criterios establecidos por Tolbert en 1991.¹⁶⁻¹⁹

Así, la utilización de este biomarcador se vislumbra como una herramienta útil en el monitoreo de daño genotóxico consecuencia de exposición ambiental, laboral o medicamentosa, en la prevención del desarrollo de cáncer, así como

en la detección temprana de efectos secundarios de enfermedades cronicodegenerativas, como las cardiovasculares o neurodegenerativas, y envejecimiento precoz, pudiendo ser utilizada también en estudios epidemiológicos.

PROTOCOLO BÁSICO PARA LA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS Y ANORMALIDADES NUCLEARES EN CÉLULAS EXFOLIADAS DE MUCOSA BUCAL SIN CULTIVO

Criterios éticos. Antes de la realización de cualquier procedimiento, los sujetos potenciales a incorporarse a un estudio deben recibir una explicación clara y por el tiempo que se requiera sobre los objetivos del estudio, el riesgo, los beneficios y su participación voluntaria. Posteriormente se le pide firmar un consentimiento informado por escrito, el cual deberá basarse en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y los reglamentos gubernamentales e institucionales.

Toma de muestra. Para la evaluación de la genotoxicidad en células epiteliales exfoliadas es conveniente que previo a la toma de la muestra, cada participante se enjuague suavemente la boca con agua potable, con la finalidad de remover cualquier resto de comida o artificios que interfieran con el análisis de la muestra. Se tomará la muestra de mucosa oral mediante un gentil raspado con un porta objeto de bordes esmerilados. Se realizarán los extendidos sobre portaobjetos libres de polvo o grasa y previamente codificado. Es conveniente hacer dos frotis: uno por mejilla, puede usarse la misma laminilla. Un frotis se mantendrá de respaldo (ya fijado) por si la primera se llegara a dañar o el material a analizar es insuficiente.

Codificación de muestras. Se sugiere que el código sea en orden consecutivo según la colecta de muestra y evitar cualquier clave que al lector de la muestra le permita conocer la identidad del paciente, esto para evitar algún sesgo.

Es necesario llevar un registro claro y preciso de cada código y de los pacientes, para lo cual resulta de bastante utilidad el uso de una

bitácora de laboratorio y bases de datos electrónicas para prevenir pérdidas definitivas de información.

Fijación. Los frotis se dejarán secar al aire libre, se fijarán en etanol al 80% por 48 horas y de nuevo esperar unos segundos a que se sequen por completo a temperatura ambiente, para su posterior tinción, se aconseja guardarlas hasta su utilización en cajas porta laminillas, donde se mantendrán a salvo de polvo u otros contaminantes.

Tinción. Puede emplearse cualquier colorante básico con alta afinidad al ADN que permita contraste y diferenciar artificios; se sugiere el naranja de acridina, orceína, reactivo de Shiff o bien tinción hematoxilina-eosina.

Naranja de acridina. Este colorante tiñe de color amarillo-verde limón el núcleo de las células y de naranja el RNA y proteínas.

Procedimiento: proteger el área de trabajo con papel estraza, siempre con bata y guantes, en dos contenedores preparados para tinción de laminillas, se añade medio litro de buffer de fosfatos anteriormente preparado (al preparar el buffer guardar 10 mL en una jeringa estéril). A uno de ellos se le agrega aproximadamente 0.05 g de polvo de naranja de acridina y se agita cuidadosamente con un abate lenguas de madera, una vez que se logró disolver la mayor cantidad posible el colorante, se sumergirán en el las rejillas en las que se acomodaron las laminillas a teñir; en esta solución se dejan por 3-7 minutos, para obtener resultados óptimos, es conveniente agitar suavemente en repetidas ocasiones las rejillas contenedoras de laminillas hasta completar el tiempo indicado; posteriormente se remueven las muestras y se dejan estilar por unos segundos, para luego enjuagarlas en el segundo contenedor de buffer de fosfatos, se aconseja aprovechar el mayor número de laminillas posibles en cada preparación para disminuir gastos y la contaminación ambiental. El contenido de ambos recipientes se desechará una vez que se concluyó de teñir todas las laminillas deseadas. Los frotis teñidos se deberán conservar en cajas para portaobjetos bien cerradas (no exponer a la luz), para mantener en óptimas condiciones

la tinción de las células, esto hasta el momento de su uso. Se sugiere que al iniciar el proceso de tinción, se tiña solo una laminilla y una vez que se verificó bajo el microscopio de fluorescencia el color deseado de las laminillas, entonces teñir el resto de los frotis.

Preparación del buffer de fosfatos. En un matraz se agrega 11.49 g de fosfato monobásico de sodio y 2.16 g de fosfato de sodio dibásico, posteriormente se afora a un litro con agua destilada, se tapa el matraz y se agita la mezcla en el agitador hasta que el polvo se disuelva por completo y se mantiene la solución en refrigeración (4 °C) por un máximo de dos semanas; al momento de su uso, verificar contaminado con bacterias o cualquier otro agente.

Preparación de los frotis para ser observados al microscopio. Usar guantes y bata de laboratorio (el colorante es mutagénico); poner una gota de buffer de fosfato sobre la muestra (del reservado en la jeringa de 10 mL); colocar un cubre objetos, evitando la formación de burbujas, envolver en una gasa y presionar suavemente, llevarlo al microscopio bajo el lente 100x, agregar una gota de aceite de inmersión y se observa en el microscopio. Es conveniente terminar la laminilla una vez iniciado el proceso, de lo contrario puede secarse sin haber terminado el procedimiento, se puede contaminar o bien podría disminuir la intensidad de la tinción favoreciendo falsos negativos.

Ventajas y desventajas del uso del naranja de acridina:

- Es importante señalar que, al utilizar este colorante, se disminuye el tiempo de análisis incluso en un 50%, tomado en cuenta que a un experto le tomará en promedio una hora el analizar una muestra con otros colorantes; esto, claro, dependiendo de la habilidad del técnico y calidad de la muestra.
- La precisión de identificación de micronúcleos es muy alta.
- Es necesario contar con microscopio equipado con fluorescencia.
- El manejo del colorante requiere medidas de extrema precaución, ya que es un reacti-

vo altamente genotóxico debido a que es un análogo de base, por lo que tiende a ser mutagénico al introducirse en el ADN y ocasionar un corrimiento en el marco de lectura.

- En cuanto al costo, se debe considerar que éste colorante y los fosfatos son más costosos que algunos otros colorantes. Por otro lado, el equipo de fluorescencia requiere de una lámpara de mercurio, la que por seguridad debe remplazarse cada 100-120 horas de uso, lo que incrementa un poco el costo.

Encuesta. Siempre se debe de procurar conocer, ya sea por entrevista, cuestionario y/o revisión de expedientes clínicos, algunos aspectos relevantes como estilo de vida del paciente, así como edad, sexo, peso, talla, estado de salud, consumo de café, tabaco, medicamentos, drogas, última visita al dentista. En la medida de lo posible, también es conveniente conocer algunos parámetros bioquímicos como índice glucémico y perfil lipídico, ya que todos estos factores podrían influir de manera trascendental en los resultados.

Análisis de las laminillas. La persona que analice las muestras deberá desconocer la codificación de las muestras. Previo al análisis de las laminillas, se coloca el buffer reservado en la platina del microscopio, eliminando excesos. Los frotis se observarán al microscopio equipado con fluorescencia con objetivo de inmersión; se realizará el conteo de al menos 2,000 células por paciente y se registrarán las células micronucleadas (CMN) o con alguna anomalía nuclear, se sugiere seguir los criterios establecidos por Tolbert.¹⁸

Criterios

Células normales (CN) (Figura 1a): El núcleo está uniformemente teñido, es redondo u oval, se distinguen de las células basales debido a que son de mayor tamaño, el núcleo es más pequeño en relación al citoplasma. No contienen ningún otro cuerpo o estructura además del núcleo que contiene gran cantidad de ADN, estas células son consideradas como células totalmente diferenciadas.

Célula micronucleada (CMN) (Figura 1b): Se caracteriza por la presencia de un nú-

cleo principal y uno o más pequeñas estructuras nucleares denominadas micronúcleos. Un micronúcleo tiene forma redonda o almendrada y mide entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, presenta la misma intensidad, textura y plano focal que el núcleo.

Células binucleadas (BN) (Figura 1c): Son células que contienen dos núcleos principales; usualmente los núcleos están muy próximos entres sí e incluso podrían hacer contacto, ambos con morfología y tinción similar a un núcleo normal. Estas estructuras no parecen tener una interacción directa con el ADN, sino que se asocian con interferencia en el proceso final de la división celular.

Cariorrexis (CR) (Figura 1d): Presentan un núcleo que se caracteriza por agregación de



Figura 1a. Células normales, núcleo normal. Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam Icc 1, imágenes capturadas a 1,000 aumentos reales (AR).

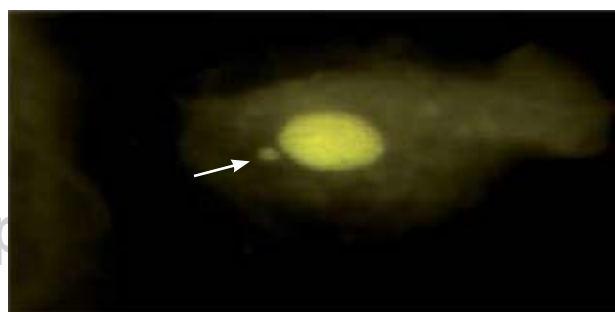


Figura 1b. Célula micronucleada (CMN), flecha micronúcleo (MN). Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam Icc 1, imagen capturada a 1,000 aumentos reales (AR).

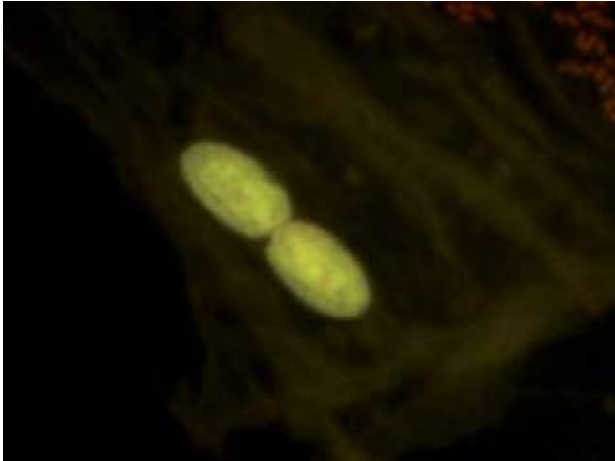


Figura 1c. Célula binucleada (BN). Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara AxioCam Icc 1, imagen capturada a 1,000 aumentos reales (AR).

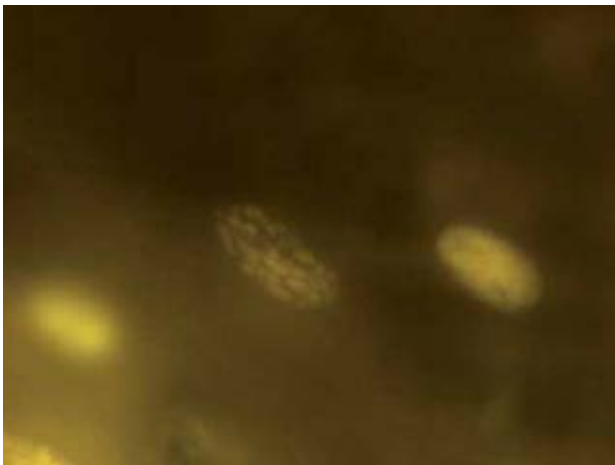


Figura 1d. Cariorrexis (CR). Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara AxioCam Icc 1, imagen capturada a 1,000 aumentos reales (AR).

la cromatina nuclear con respecto a las células de cromatina condensada; ellas tienen un patrón moteado nuclear indicativo de la fragmentación nuclear conducente a la eventual desintegración del núcleo. Estas células tal vez están pasando por una fase avanzada de apoptosis, pero esto no ha sido comprobado.

Cromatina condensada (CC) (Figura 2a): Estas células tienen núcleos intensamente teñi-

dos, con regiones condensadas o cromatina agregada que exhiben un patrón nuclear moteado o estriado; es evidente que la cromatina se está agregando en algunas regiones del núcleo, mientras que se pierde en otras áreas; cuando la condensación es extensa da la apariencia de un núcleo fragmentado. Estas células, al igual que las células en cariorrexis, terminan con la fragmentación del núcleo, lo que conlleva la desintegración eventual y algunas veces aparecen como estructuras similares a los micronúcleos, pero éstas no deben contabilizarse como micronúcleos, ya que su origen aún no está determinado. Se piensa que estas células están en etapas tempranas de la apoptosis, aunque esto no es concluyente.

Núcleo lobulado (NL), o prolongación nuclear o *broken eggs* (BE) (Figura 2b): El núcleo presenta una fuerte constricción en un extremo, sugestiva de un incipiente proceso de eliminación de material nuclear por gemación, el lóbulo presenta las mismas características morfológicas y de tensión que el núcleo, pero el tamaño es de un tercio a un cuarto del núcleo. Tolbert y otros los definieron como *broken eggs*,¹⁷ en 1998 Bhattathiri y colaboradores describieron en células exfoliadas estos fenómenos y los denominaron como *nuclear buds* (brotes nucleares), reconociéndolas como anomalías nucleares;²⁰ ellos describen estos fenómenos como gemaciones de material nuclear muy próximas al núcleo sin una separación clara de éste. Posteriormente, en 2004, Cerqueira describe estos eventos como diferentes.²¹ El origen y significado biológico de los *broken eggs* (BE) en células exfoliadas aun no es totalmente comprendido y existen muy pocas publicaciones concernientes a este tema. Algunos investigadores consideran a los brotes nucleares en linfocitos como indicadores de genotoxicidad; sin embargo, en células exfoliadas no es claro ya que frecuentemente en diversos procesos de salud y enfermedad aparece en mayor frecuencia las células micronucleadas y *bud cells* disminuidas, o viceversa; por lo tanto se puede asumir que los BE no están asociados a eventos genotóxicos, clastogénicos o aneuploidogénicos, pero probablemente si estén produciéndose como consecuencia de proce-

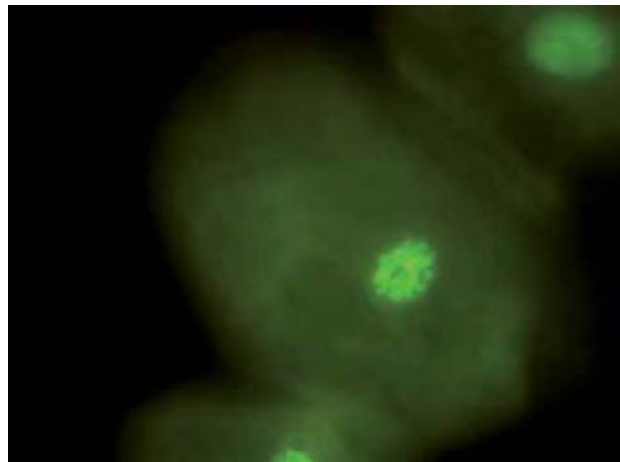


Figura 2a. Cromatina condensada (CC). Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam Icc 1, imagen capturada a 1,000 aumentos reales (AR).

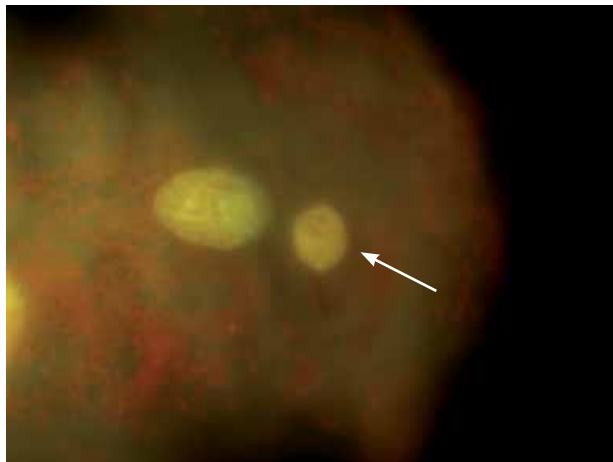


Figura 2c. Núcleo picnótico, flecha (PN). Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam Icc 1, imagen capturada a 1,000 aumentos reales (AR).



Figura 2b. Núcleo lobulado típico (NL). Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam Icc 1, imagen capturada a 1,000 aumentos reales (AR).

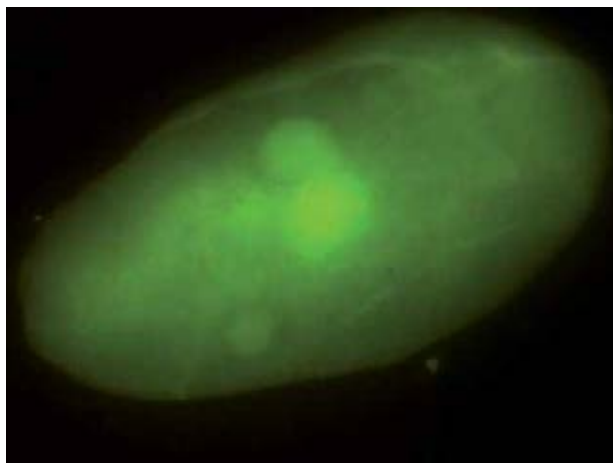


Figura 2d. Cariolisis (CL). Microscopio binocular Mca. Carl Zeiss Mod. Axiostar Plus. Fluorescencia IVFL. Filtro de 450 a 490 nanómetros. Objetivo planacromático 100x/1.25 oil, cámara Axiocam Icc 1, imagen capturada a 1,000 aumentos reales (AR).

ses degenerativos en la primera capa de células epiteliales (estrato germinativo).²²

Núcleo picnótico (PN) (Figura 2c): Estas células se caracterizan por un núcleo pequeño, con alta densidad de material nuclear que es uniforme, pero intensamente teñido. El diámetro del núcleo es aproximadamente de un tercio del núcleo normal; el significado biológico se desconoce, pero este fenómeno se ha asociado

con una forma de muerte celular; no obstante, el mecanismo preciso permanece desconocido. Se correlaciona con diferenciación y maduración de las células epiteliales.

Cariolisis (CL) (Figura 2d): En estas células el núcleo está completamente vacío, es decir, hay ausencia total de ADN y, por lo tanto, no puede considerarse como núcleo ver-

dadero. Es probable que estas células representen una fase muy avanzada en el proceso de muerte celular. La correlación positiva entre células picnóticas y células con cariólisis

sugiere que las células con cariólisis derivan directamente a partir de células con cromatina condensada o indirectamente a través de células picnóticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975; 31 (1): 9-15.
- 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.
- Afshari AJ et al. Centromere analysis of micronuclei induced by 2-aminoanthraquinone in cultured mouse splenocytes using both a gamma-satellite DNA probe and anti-kinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen.* 1994; 24 (2): 96-102.
- Migliore L, Bevilacqua C, Scarpato R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis.* 1999; 14(2): 227-231.
- Ramos-Remus C et al. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20 (2): 208-212.
- Rodríguez-Vázquez OA, 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 Reumat.* 2000; 15(2): 41-45.
- Bonassi 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.* 728(3): 88-97.
- Torres-Bugarín O et al. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res.* 1998; 413 (3): 277-281.
- Torres-Bugarín O et al. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *Br J Sports Med.* 2007; 41 (9): 592-596.
- Heddle JA et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen.* 1991; 18 (4): 277-291.
- Torres-Bugarín O et al. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res.* 2003; 539(1-2): 177-186.
- Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science.* 2000; 287 (5457): 1431-1433.
- Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001; 29: 7-15.
- Torres-Bugarín 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, Doctorado en Genética. Universidad de Guadalajara; 2000.
- Raj VM et al. 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.
- Thomas P et al. 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 (1-2): 37-47.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol.* 1991; 134 (8): 840-850.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992; 271 (1): 69-77.
- Thomas P et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009; 4 (6): 825-837.
- Bhattathiri NV et al. Radiation-induced acute immediate nuclear abnormalities in oral cancer cells: serial cytologic evaluation. *Acta Cytol.* 1998; 42 (5): 1084-1090.
- Cerqueira EM et al. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res.* 2004; 562 (1-2): 111-117.
- Nersesyan AK. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutat Res.* 2005; 588 (1): 64-68.