



Presencia de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral en personas expuestas a agentes genotóxicos

Presence of micronuclei in exfoliated cells of the oral mucosa in people exposed to genotoxic agents

TABORGA MANRIQUE, XIMENA¹

QUISPE ARUHUITO, RICHARD¹

LARREA POMA, MONICA M.¹

FARFÁN OCHOA, PATRICIA¹

REVOLLO ZEPITA, SUSANA¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 17/09/2016

FECHA DE ACEPTACIÓN: 4/10/2016

Resumen

Los micronúcleos son utilizados como biomarcadores para determinar daño en el ADN. Este daño es causado por agentes genotóxicos y puede ser el origen de mutaciones o cáncer. Con el propósito de determinar el riesgo genotóxico debido al trabajo y hábitos nocivos (tabaco y alcohol), se analizaron muestras de 60 personas. Se coleccionaron células de la mucosa oral, se tiñeron y contaron micronúcleos en el microscopio. Las personas que participaron como voluntarios en este trabajo son varones y mujeres comprendidos entre 21 y 68 años que trabajan en curtiembres, laboratorios, oncología, radiología, en imprentas o que tienen hábitos nocivos. En todos los grupos se encontró micronúcleos, sin embargo, las personas que tienen hábitos dañinos y están expuestas a algunos otros factores de riesgo fueron las que tuvieron más cantidad de células afectadas.

Abstract

Micronuclei are used like biomarkers in order to determinate damage in the ADN. This damage is caused by genotoxic agents and they can be the origin of mutations or cancer. In order to determinate genotoxic risk due to work and harmful habits (tobacco and alcohol), 60 samples were analyzed. Cells of the oral mucosa were collected, dyed and their micronuclei were counted using a microscope. People who participated as volunteers in this study are men and women covered in a range from 21 to 68 years, who work in tanneries, laboratories, oncology, radiology, in printing houses or who have harmful habits. In all groups micronuclei were found, however, people who have unhealthy habits and are exposed to some other risk factors were those who had higher number of affected cells. On the other hand, a higher percentage of micronuclei in women and elder people was found.

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

tadas. Por otro lado, se encontró un mayor porcentaje de micronúcleos en mujeres y en personas mayores. Por tanto, se concluye que todas las actividades laborales mencionadas y los hábitos nocivos representan un riesgo para la integridad del genoma.

Therefore it is concluded that all work activities mentioned and harmful habits represent a risk to the genome integrity.

PALABRAS CLAVE

Micronúcleos, genotoxicidad

KEY WORDS

Micronucleus, genotoxicity

INTRODUCCIÓN

La división celular tiene como objetivo formar dos células hijas idénticas a la original; sin embargo algunos factores tales como sustancias genotóxicas, errores en la replicación, roturas cromosómicas, radiación y otros, pueden provocar pérdida del material genético, de modo que la célula tendrá una pequeña masa nuclear separada del núcleo, es decir, un micronúcleo. Estos genotóxicos son básicamente de dos tipos, los que tienen efecto clastrogénico, es decir, los que producen roturas en los cromosomas, originando fragmentos sin centrómero y los que tienen efecto aneuploidógeno que corresponden a cromosomas enteros que no se han podido unir al uso mitótico durante la división celular por alteraciones en el cinetocoro y han quedado fuera de los núcleos de las células hijas, o por interferencia en la formación del uso mitótico. Los micronúcleos resultantes se localizan en el citoplasma y tienen las mismas características tintoriales que el núcleo porque están formadas por cromatina sin una membrana propia (Torrez-Bugarín, Ramos-Ibarra 2013; Flores, Yamaguchi 2009).

La técnica de micronúcleos se utiliza con diversos fines, entre ellos para la determinación del daño genotóxico precoz, especialmente en salud ocupacional cuando se quiere establecer si los agentes a los que están expuestos los trabajadores están afectando al ADN; por otro lado también se la utiliza en estudios de monitoreo pues se ha demostrado que la expresión de los micronúcleos está en directa relación con la exposición a genotóxicos, cuando la exposición cesa, disminuyen y desaparecen los micronúcleos (Flores y Yamaguchi 2009; Torrez-Bugarín, et al 2013).

La identificación de micronúcleos puede ser realizada en células de descamación de la mucosa oral, en linfocitos cultivados en el laboratorio, en eritroblastos o en cualquier tipo de célula que se divida. El estudio de las células de la mucosa oral tiene varias ventajas, entre ellas, que la toma de muestra no es invasiva, que permite conocer el efecto genotóxico de cualquier tipo de agente, inhalado o ingerido durante las últimas tres semanas (las células se dividen con cierta frecuencia lo cual refleja el efecto agresivo de cualquier tóxico), además, debido a que el 60% de la mucosa oral corresponde a epitelio no queratinizado se puede teñir fácilmente en el laboratorio facilitando la observación de los componentes estructurales celulares. A través de este estudio se puede determinar el efecto genotóxico producido por el uso

de agentes químicos y radiactivos, por ejemplo, en salud ocupacional; hábitos deletéreos para la salud como los hábitos tabáquico y alcohólico; efectos de estados fisiológicos como vejez y malnutrición, etc. (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra 2013).

El presente trabajo forma parte del proyecto “Implementación de pruebas moleculares para el diagnóstico precoz de cáncer de colon”. La determinación de daño del ADN por agentes genotóxicos a través de la técnica de micronúcleos fue agregada al proyecto como respuesta a la necesidad de los participantes de contar con la información que les permita saber si por su tipo de trabajo y/o hábitos de vida, están expuestos a desarrollar enfermedades como el cáncer; por lo tanto, el propósito del presente estudio ha sido verificar el efecto dañino sobre el ADN de sustancias que tienen que ver con la actividad laboral y hábitos de vida.

METODOLOGÍA

Población de estudio

Se incluyeron en este estudio a 60 voluntarios expuestos, por su trabajo o hábitos, a diferentes tipos de sustancias químicas: 40 trabajan en curtiembres, 5 en laboratorios, 3 en radiología, 4 en oncología, 1 en imprenta, 1 es artesano, 1 arregla impresoras y 5 no están expuestos laboralmente a genotóxicos pero tienen hábitos tabáquico, alcohólico o ambos. Del total de voluntarios, 22 eran mujeres y 38 varones, con edades comprendidas entre 21 y 68 años.

Tipo de estudio

Transversal correlacional analítico

Criterios de inclusión

Se incluyeron a todas aquellas personas que, por su trabajo o sus hábitos, están expuestas a genotóxicos y accedieron o solicitaron participar en este estudio.

Criterios de exclusión

Ninguno

Recolección de datos y muestras

El proyecto que enmarca el presente trabajo está avalado por el Comité de Ética de la UMSA, por lo tanto, antes de la toma de muestra, se informó a los voluntarios, sobre los alcances del proyecto en forma verbal y escrita y se solicitó que firmaran un consentimiento informado, además se llenó una encuesta con los datos generales de los voluntarios, exposición a sustancias

químicas o radioactivas y los hábitos que predisponen al deterioro del material genético. Finalmente se recolectó muestras de descamación de la mucosa oral, en portaobjetos, con ayuda de un bajalenguas.

Análisis de las muestras

Las muestras colectadas y fijadas en portaobjetos fueron teñidas con Giemsa. La observación de las células en el microscopio se realizó con el objetivo de 40X. Se observaron 1000 células por persona.

Para la identificación de micronúcleos se consideró los criterios planteados por *"The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations"* (HUMN PROJECT), es decir: diámetro entre 1/16 a 1/3 del núcleo, forma redonda u ovalada, no refractarios y que se puedan distinguir fácilmente de otros artefactos, que tengan la misma intensidad de tinción que el núcleo (ocasionalmente un poco más intensa), que tengan la misma textura, que se presente en el mismo plano focal que el núcleo, que las células no estén solapadas y que la membrana celular y el citoplasma se encuentren íntegros (Tolbert 1991; Torrez-Bugarín, et al 2013; Fenech, et al 2003).

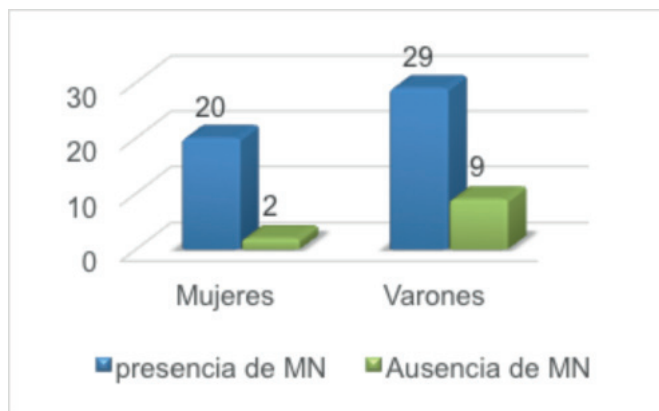
Para el análisis de los resultados se utilizó estadísticos básicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número de micronúcleos en relación al género

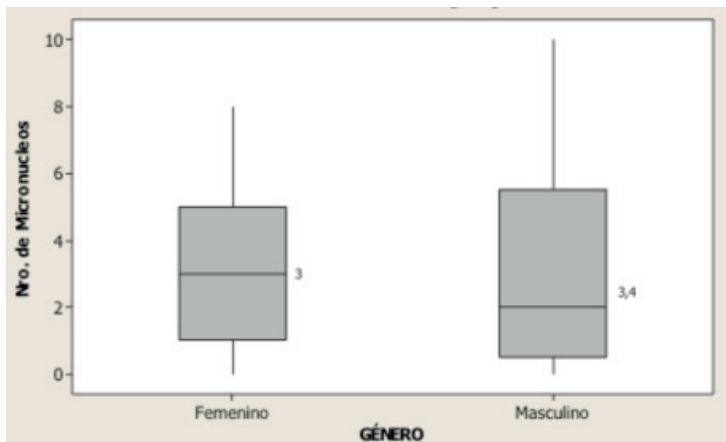
Se encontró micronúcleos en el 82% de las personas estudiadas (Gráfico 1), 91% en mujeres y 76% en varones, cabe aclarar que el número de varones era casi el doble que el de mujeres. En algunos países como Cuba se ha determinado que la incidencia en el género femenino supera al masculino entre los 25 y 50 años (edad reproductiva). Después de los 50 años la incidencia en los varones es mayor (García 1998).

Gráfico 1: Número de micronúcleos (MN) en relación al género



Se encontró mayor cantidad de micronúcleos en el género masculino como puede verse en el gráfico 2, en el que la media en este género es de 3,4 frente a 3 en el femenino. De acuerdo a este gráfico, una persona de sexo masculino tiene más tendencia a producir mayor cantidad de micronúcleos, lo cual, probablemente se debe a una mayor exposición a agentes mutágenos.

Gráfico 2: Número de micronúcleos por persona según género



Número de micronúcleos por persona

De las 1000 células observadas por cada paciente, se encontró entre 1 y 22 células con micronúcleos, el número de células que contenían micronúcleos aparece en la Tabla 1. Llamen la atención las dos cifras más altas, la de 22 micronúcleos que corresponde a una persona no expuesta laboralmente a factores de riesgo, pero que fuma y bebe con mucha frecuencia y tiene además familiares con cáncer y una persona mayor, que trabaja en radiología, en la que se encontraron 10 células con micronúcleos además de otras anomalías nucleares.

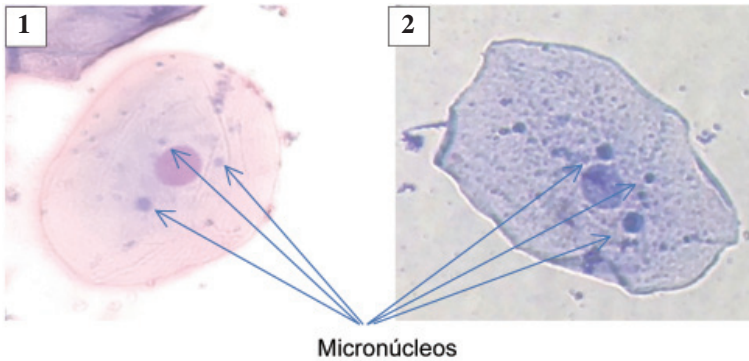
Tabla 1: N° de micronúcleos por persona

| N° de MN/1000 células | N° de voluntarios |
|-----------------------|-------------------|
| 1 | 15 |
| 2 | 8 |
| 3 | 3 |
| 4 | 6 |
| 5 | 5 |
| 6 | 3 |
| 7 | 3 |
| 8 | 3 |
| 9 | 1 |
| 10 | 1 |
| 22 | 1 |

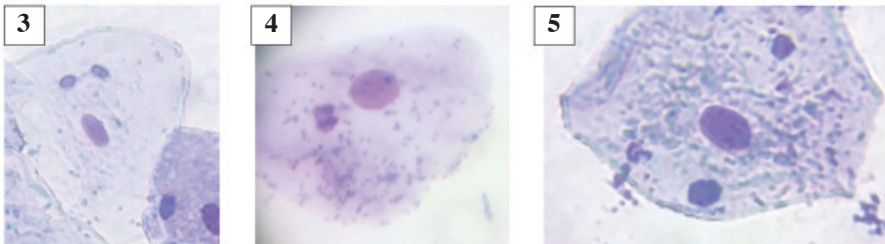
Número de micronúcleos por célula

Se encontró algunas células con tres micronúcleos (fotos 1 y 2), otras con 2 (fotos 3, 4 y 5) y en la mayoría se encontró sólo un micronúcleo por célula (fotos 6 y 7). Se hallaron variaciones en las características morfológicas de los micronúcleos especialmente en el tamaño, por ejemplo, en la foto 1 se observa 3 micronúcleos de diferente tamaño. También se encontraron diferencias en la textura, borde y la tonalidad tintorial de los micronúcleos en relación al núcleo.

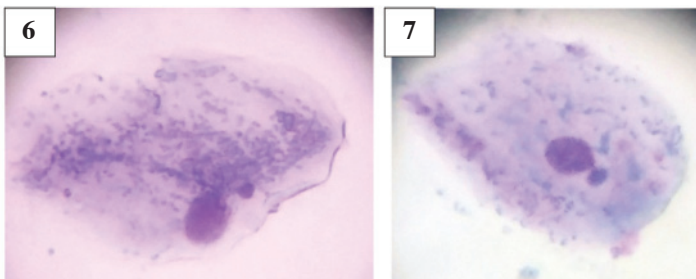
Fotos 1 y 2: Células con 3 micronúcleos



Fotos 3, 4 y 5: Células con 2 micronúcleos



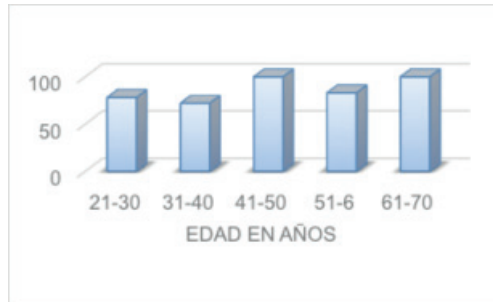
Fotos 6 y 7: Fotos de células con 1 micronúcleo



La edad como factor de riesgo

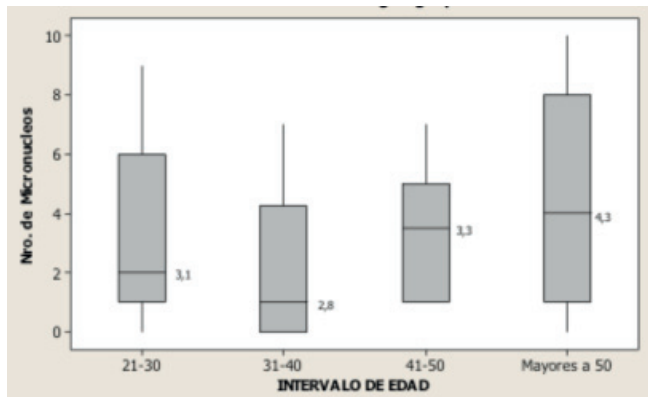
Es bien conocido el hecho de que mientras mayor sea la persona existe más posibilidad de desarrollar enfermedades neoplásicas por la acumulación de mutaciones en el genoma (De Pinho 2000). De igual modo es más fácil dañar el ADN produciendo micronúcleos en personas de mayor edad. En el Gráfico 3 se hace una relación del porcentaje de micronúcleos hallado con la edad de las personas que fueron voluntarias, mostrando un mayor porcentaje de micronúcleos en personas mayores.

Gráfico 3: Porcentaje de personas con micronúcleos según edad



Se encontró mayor cantidad de micronúcleos en el grupo de personas mayores a 50 años (gráfico 4), con una media de 4,3 micronúcleos por persona y una desviación estándar de 3,9. Las desviaciones estándar en los otros grupos fueron: de 21 a 30: 2,9; de 31 a 40: 5,2 y de 41 a 50: 2,2.

Gráfico 4: Promedio del número de micronúcleos según grupo etáreo



Actividad laboral

La mayoría de los voluntarios trabaja en curtiembres y casi todos, excepto 5 están expuestos a agentes genotóxicos por la actividad laboral que realizan. En todos los grupos, incluyendo a los que no están expuestos, se encontraron células con micronúcleos, sin embargo estos grupos no pueden ser comparados porque no se cuenta con números equivalentes de personas en cada grupo.

El tratamiento del cuero en las curtiembres requiere el uso de una gran gama de sustancias químicas, entre ellas algunas cancerígenas reconocidas como el cromo y los compuestos aromáticos y fenólicos que por oxidación en el organismo llegan a integrarse al ADN alterando la replicación, transcripción y traducción. El contacto o la inhalación de estas sustancias representa un riesgo grande para los trabajadores y cuando las aguas residuales de las curtiembres no son tratadas y no se hace un control riguroso de los desechos, las personas que viven en los alrededores también están en riesgo (Esparza 2013).

Muchos químicos usados en laboratorios y en curtiembres afectan el ciclo celular, su efecto está en relación con el grado de exposición, tiempo de exposición y tipo de agente químico, entre otros. Ejemplos del efecto de estos agentes son: 1) la formación de células binucleadas, picnóticas y con cromatina condensada que se encontró en expuestos a nafta y 2) las células binucleadas y cariolíticas producidas por la exposición a tolueno, metanol, xileno y cloroetileno (Dominguez 2006).

La radiación ionizante también representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer y leucemias, incluso la radiación ultravioleta procedente del sol se ha vinculado con el desarrollo de cáncer de piel. Entonces no es de extrañar que 2 de las 3 personas que trabajan en radiología que fueron analizadas presentaran micronúcleos. La ausencia de micronúcleos en una de estas personas probablemente pueda explicarse por el hecho de que es joven y que no ha estado expuesta por mucho tiempo a la radiación que provoca su trabajo.

En las 4 personas que trabajan en oncología, no asociadas con el consumo de alcohol ni con el hábito de fumar, se encontró micronúcleos (3 de estas personas están en contacto con medicamentos citostáticos). Un resultado similar a este fue reportado por Dominguez (2006) quien, además de encontrar un número elevado de micronúcleos, reportó también cariólisis y cromatina condensada. Los citostáticos son drogas empleadas por su propiedad de frenar la proliferación celular incontrolada en pacientes con cáncer; sin embargo la exposición frecuente puede causar mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer a los profesionales responsables de aplicar el tratamiento (Patiño 2003).

Hábitos de vida

En relación a la frecuencia de micronúcleos en personas con hábitos nocivos, de 10 que fuman habitualmente, se encontró que 9 (90%) tenían micronúcleos, la persona restante estaba adquiriendo recién este hábito. Por otro lado, 22 personas tienen la costumbre de consumir bebidas alcohólicas, entre ellas 17 (77%) presentaban micronúcleos. También se consideró a 8 personas que pensaban que habían abusado del consumo de alcohol, entre ellas 6 (75%) tenían micronúcleos.

El alto número de personas que fuman y presentan micronúcleos se explica fácilmente cuando se considera que el tabaco tiene más de 4000 compuestos químicos, 97% con actividad cancerígena, entre ellos los más activos son

los benzopirenos y dibenzoantracenos que activan componentes neutros de la fase particulada, estos son por sí mismos tóxicos, pero además sus metabolitos tienen la capacidad de unirse covalentemente al material genético formando aductos (Zalacain, et al 2005). Por otro lado, uno de los mecanismos que utiliza el organismo para defenderse es a través de sistemas enzimáticos que han sido clasificados como enzimas de fase I y enzimas de fase II; la actividad de las enzimas de fase I da lugar a metabolitos intermediarios de naturaleza electrofílica que atacan fácilmente a moléculas nucleofílicas como ácidos nucleicos y proteínas (Zalacain, et al 2005).

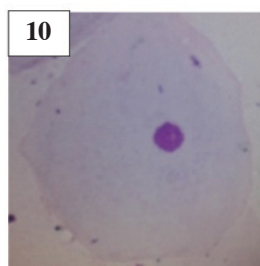
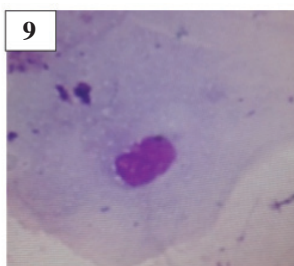
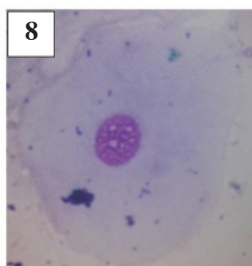
Según la Organización Mundial de la Salud, el 22% de las muertes por cualquier tipo de cáncer está relacionado con el hábito tabáquico, y el 70% de las muertes por cáncer de pulmón (WHO 2015). Uno de los antecedentes nacionales en relación al hallazgo de micronúcleos en fumadores es el reportado por Ayarde el año 2008, quien, además del tabaco, atribuyó mayor posibilidad de producir micronúcleos cuando la persona vive a mayor altura (Ayarde et al 2008).

Por otro lado, no hay una base científica que establezca que el alcohol por sí mismo tiene actividad genotóxica y, por tanto, predisponga al desarrollo de cáncer; sin embargo se sabe que aumenta la permeabilidad celular al alterar la morfología y disolver los lípidos, esta actividad facilita el ingreso de otras sustancias químicas que tienen actividad genotóxica. Además, el primer producto metabólico del alcohol es el acetaldehído que es capaz de producir mutaciones puntuales e interferir con la síntesis y reparación del ADN al inhibir la O metilguaniltransferasa que repara normalmente daños causados por agentes alquilantes (Seitz 2001, Figuero 2004).

Anormalidades nucleares

Aunque no es tema de estudio del presente artículo, llamó fuertemente la atención la alta frecuencia de células con núcleo en cariorrexis (desintegración nuclear) y otras anomalías nucleares de una persona mayor cuya ocupación es la radiología (fotos 8-10)

Fotos 8: Cariorrexis, 9: núcleo lobulado y 10: núcleo de bordes irregulares.



CONCLUSIONES

Todas las actividades laborales exploradas además de los hábitos deletéreos (tabaquismo y alcoholismo) se constituyen en factores de riesgo para la aparición de micronúcleos en las células.

La identificación de micronúcleos es sencilla y útil para el biomonitoreo del efecto genotóxico producido por agentes ambientales.

La presencia de micronúcleos en células exfoliadas de la cavidad oral es una señal de alerta que indica que los factores medioambientales, hábitos o la interacción de ambos está incidiendo sobre la integridad del genoma y por tanto es una señal de alerta para evitar el desarrollo de neoplasias.

REFERENCIAS

- Ayarde Romero, B., Cuti, M., Ascarrunz González, M. E., y Tirado Bustillos, N. (2008). Efecto genotóxico del consumo de tabaco en estudiantes de la Facultad de Medicina de la UMSA que habitan en la altura. *Biofarbo*, 16, 67.
- Castro, R., Ramírez, V., y Cuenca, P. (2004). Micronúcleos y otras anomalías nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Revista de biología tropical*, 52(3), 611-621.
- DePinho, R. A. (2000). The age of cancer. *Nature*, 408(6809), 248-254.
- Domínguez Odio, A., Rojas Vázquez, E. I., Romero García, L. I., Rodríguez Tito, J. C., y Pérez, A. I. (2006). Lesiones genéticas y citológicas inducidas por la exposición a químicos en centros de trabajo. *Salud de los Trabajadores*, 14(1), 51-59.
- Esparza, E., y Gamboa, N. (2013). Contaminación debida a la industria curtiembre. *Revista de Química*, 15(1), 41-63.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., y Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 65-75.
- Figuro Ruiz, E., Carretero Peláez, M., Cerero Lapiedra, R., Esparza Gómez, G., y Moreno López, L. A. (2004). Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 9(1), 14-23.
- Flores, M., y Yamaguchi, M. U. (2009). Teste do Micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. *Saúde e Pesquisa*, 1(3), 337-340.
- García, J. L., Galán, Y., y Luaces, P. (1998). Incidencia en Cuba del cáncer en la tercera edad. *Rev Cubana Oncol*, 14(2), 121-28.
- Patiño, A., López, R., Sierrasesúмага, L. (2003). Alteraciones genéticas inducidas por los tratamientos antitumorales en pacientes pediátricos con cáncer: carcinogénesis química. www.cfnavarra.es/salud/anales/textos.
- Peláez, M., Cerero Lapiedra, R., Esparza Gómez, G., y Moreno López, L. A. (2004). Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 9(1), 14-23.
- Seitz, H., Matsuzaki, S., Yokohama, A., Homann, N., Väkeväiene, S., y Dong, X. (2001). Alcohol and cancer. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25:137-143.
- Torres-Bugarín, O., y Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650-657.
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M. G., Flores-García, A., y Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente*, 1, 4-11.
- WHO. (2015). Datos y cifras.
- Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del sistema sanitario de Navarra* 28(2) 227-236.