

Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal. Revisión sistemática

Presence of micronuclei in oral epithelium cells, as marker of chromosomal instability. Systematic review

Díaz Caballero A*, Mora Solano E**, Herrera Herrera A***

RESUMEN

Introducción. El daño genético es probablemente la causa más importante para el desarrollo de anomalías y enfermedades degenerativas pero son pocos los estudios que se centran en la medición y evaluación de los efectos genotóxicos de los productos que día a día van adquiriendo una mayor utilidad en la sociedad, las sustancias que hacen parte del ambiente, procedimientos médicos como radiación y agentes químicos, deficiencia de nutrientes como el ácido fólico, hábitos como alcoholismo, tabaquismo, drogadicción, stress, estilos de vida, al igual que factores genéticos tales como alteraciones en el metabolismo y/o reparación del DNA.

Objetivo. Conducir un análisis crítico sobre el ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética, su aplicabilidad desde la odontología y su relación con el desarrollo del cáncer.

Materiales y métodos. Se identificaron los artículos más relevantes mediante una búsqueda sistemática en bases de datos electrónicas como Ovid, Ebsco Host, Science Direct y Pubmed.

Resultados. Se obtuvo un total de 282872 artículos de los cuales se seleccionaron los que cumplieron con los requisitos de inclusión y fueron posteriormente analizados y discutidos teniendo en cuenta título, autores, revista, año, volumen, mes y páginas.

Conclusión. Los resultados del análisis de la revisión de la literatura apoyan la hipótesis que relaciona la frecuencia de micronúcleos con el desarrollo de cáncer partiendo del hecho que una proporción sustancial de la inestabilidad genética de las células cancerosas se debe a defectos estructurales específicos en la segregación cromosómica.

Palabras clave: Ensayo de micronúcleos, daño del DNA, inestabilidad cromosomal.

SUMMARY

Introduction. Damage of the genome is probably the most important cause of the development of anomalies and degenerative diseases but just few studies focus on measurement and evaluation of the genotoxic effects of products that every day are becoming more useful in our society, substances that are part of the environment, medical procedures such as radiation and chemical agents, nutrients deficiency like folic acid, habits as alcoholism, smoking, drug addiction, stress, lifestyle and genetic factors such as changes in metabolism and/or DNA repair.

Objective. To guide a critical analysis of the micronucleus test as a measure of genetic instability, its applicability from dentistry and its relationship with cancer development.

* Odontólogo Periodoncista. Docente Facultad de Odontología. Universidad de Cartagena. Colombia.

** Estudiante pregrado Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena. Colombia.

*** Odontóloga Facultad de Odontología Universidad de Cartagena. Colombia.

Materials and methods. The most relevant papers were identified through a systematic search on electronic databases such as Ovid, Ebsco Host, Science Direct and PubMed.

Results. A total of 282872 articles were obtained of which were selected which fulfilled the criteria inclusion and were subsequently analyzed and discussed taking into account title, author, journal, year, volume, month and page.

Conclusion. The results of this analysis of the literature review support the hypothesis that frequency of micronucleus is related to cancer development based on the fact that a substantial proportion of genetic instability of cancer cells is due to specific structural defects in chromosome segregation.

Key words: Micronucleus assay, DNA damage, chromosomal instability.

Fecha de recepción: 10 de julio de 2011.

Aceptado para publicación: 20 de julio de 2011.

Díaz Caballero A, Mora Solano E*, Herrera Herrera A. Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal. Revisión sistemática *Av. Odontostomatol* 2013; 29 (2): 95-102.

INTRODUCCIÓN

El estudio del daño del DNA a nivel cromosomal es una parte importante en la toxicología genética ya que la mutación cromosomal es fundamental en el proceso de carcinogénesis (1, 2). El nivel de integridad genética humana está cada vez más amenazado por la actividad industrial que da lugar a exposiciones a genotoxinas químicas y físicas. El daño genético es probablemente la causa más importante para el desarrollo de anomalías y enfermedades degenerativas pero son pocos los estudios que se centran en la medición y evaluación de los efectos genotóxicos de los productos que día a día van adquiriendo una mayor utilidad en la sociedad (3), las sustancias que hacen parte del ambiente, procedimientos médicos como radiación y agentes químicos, deficiencia de nutrientes como el ácido fólico, hábitos como alcoholismo, tabaquismo, drogadicción, stress, estilos de vida, al igual que factores genéticos tales como alteraciones en el metabolismo y/o reparación del DNA (4). Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (5) (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar un aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la presencia

de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas (2, 6, 7). Tercero, el origen ambiental del cáncer (8). Por estos motivos surge la utilización de ensayos a corto plazo que nos brinden información acerca de la actividad mutagénica de estas sustancias, sumándole el hecho de que la toxicología es actualmente un elemento cada vez más importante de la salud ambiental.

Durante la división celular el material genético que está en el núcleo, se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Múltiples factores pueden afectar este proceso, como errores en la replicación, roturas cromosómicas y efecto de genotóxicos, el resultado será una división del material genético no equitativo y la pérdida cromosómica parcial o total. El material genético que se desprende queda excluido del núcleo de la célula hija, formando un nuevo núcleo de menor tamaño que el principal, llamado micronúcleo, el cual es visible al microscopio óptico (9).

Actualmente hay muchas pruebas tanto de modelos in vivo como in vitro, por lo cual los organismos estudiados pueden ser virus, hongos, plantas, bacterias, insectos y mamíferos, incluidos los humanos. El ensayo de micronúcleos es uno de los estudios de preferencia para la determinación de riesgo

potencial de daños en el DNA relacionado con la exposición a agentes genotóxicos (10). Esta prueba es la más frecuentemente usada para detectar rupturas cromosomales o interferencias en el proceso de mitosis y puede ser aplicada a células de diversos tejidos como por ejemplo linfocitos de sangre periférica o células de la mucosa bucal humana, proporcionando información sobre el daño citogenético de tejidos y especialmente permitiendo evaluar aquellos lugares blanco de los agentes carcinogénicos humanos donde se podrían desarrollar neoplasias o carcinomas logrando acceder a la adecuada y suficiente toma de muestras sin causar incomodidad.

Aberraciones cromosomales

Las aberraciones cromosomales consisten en anomalías en los cromosomas respecto al número (haploide, poliploide) o cambios estructurales (translocación, duplicación). Se interpreta entonces la presencia de aberraciones cromosomales como una respuesta frecuente e importante a la exposición ante agentes mutagénicos físicos o químicos. Su importancia se basa en la relación con enfermedades genéticas hereditarias y su participación en la carcinogénesis. Los defectos segregacionales son una de las causas de inestabilidad cromosomal, cuando se forman núcleos céntricos y acéntricos durante la telofase, lo cual es de gran relevancia en los procesos oncogénicos. Las posibles consecuencias de esta inestabilidad son: alteración del número de copias de uno o más genes, un cambio en la expresión genética o cambio en la estructura genética de tal manera que la proteína es alterada, lo cual a su vez puede conducir tanto al aumento como a la disminución de la actividad de dicha proteína. Las aberraciones cromosómicas están relacionadas con un aumento del riesgo de cáncer.

La mutación cromosómica se identifica básicamente mediante ensayos citogenéticos que consisten en exponer células animales o humanas a la sustancia química en placas de cultivo, teñir cromosomas y luego visualizar directamente en el microscopio los cromosomas para detectar alteraciones en estructura o número, entre los cambios más significativos y aceptados actualmente están las aberraciones cro-

mosomales y como una subcategoría encontramos los micronúcleos.

Micronúcleos

Los micronúcleos son cuerpos pequeños, extranucleares que aparecen durante el proceso de división celular, principalmente provienen de fragmentos de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátidas acéntricas o cromosomas completos que no se incluyen exitosamente en el núcleo de las células hija en la etapa de telofase por defectos en el proceso de segregación durante la anafase.

- a. *Formación de micronúcleos a partir de fragmentos de cromátidas y cromosomas:* las rupturas del DNA de doble cadena, sin reparación, pueden producir cromátidas simétricas y asimétricas e intercambio de cromosomas al igual que fragmentos tanto de cromátidas como de cromosomas, pero esto es solo posible cuando el nivel de daño del DNA supera la capacidad reparativa de la célula en un periodo de tiempo determinado (11). Otro mecanismo consiste en la escisión simultánea de la reparación de los daños del DNA o incorporación inapropiada de bases al DNA en lugares opuestos de la doble hélice (12).
- b. *Formación de micronúcleos a partir de malsegregación de cromosomas completos:* Cuando se detectan micronúcleos en células sin previa exposición a genotoxinas se deduce que son originados a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos o pérdida de cromosomas completos en una proporción de 30% y 70% respectivamente, dependiendo de la edad y el género, siendo mayor en mujeres que en hombres (13). Los cromosomas sexuales contribuyen a la mayoría de los eventos de pérdida cromosomal con relación al incremento de la edad (14). En las mujeres, el cromosoma X se puede relacionar con el 72% de los micronúcleos observados, de los cuales un 37% parecen carecer de un cinetocoro funcional, lo cual sugiere que el defecto puede ser a nivel del ensamblaje del cinetocoro debido a la inactivación del cromosoma X (15). Hay una serie de posibles mecanismos que conducen a la formación de micronúcleos a partir de cromosomas completos, por defectos en la segregación durante la etapa de

anafase. Uno de ellos es la hipometilación de citosina (15), el proceso normal de metilación consiste en transferencia de grupos metilos a algunas de la bases citosinas situadas previa y contiguamente a una guanina; el grado de transcripción es inversamente proporcional al grado de metilación. Al producirse errores en la transcripción genética se altera la secuencia del DNA, la pérdida de metilación o hipometilación se asocia al riesgo de cáncer. Otra posibilidad para la formación de micronúcleos se da cuando se pierden los cromosomas debido a mutaciones producidas por defectos en la dinámica de interacción entre el cinetocoro y los microtúbulos (16). Otra variable que probablemente aumente la incidencia de micronúcleos por pérdida cromosomal son los defectos en el ensamblaje del huso mitótico, defectos en el punto de verificación y amplificación anormal de los cromosomas (17). Un estudio reciente, sugiere que los cromosomas dicéntricos resultantes de las fusiones finales de los telómeros pueden estar involucrados en los eventos de malsegregación; esto puede ocurrir cuando los centrómeros del cromosoma dicéntrico son atraídos hacia los polos opuestos de la célula durante la anafase con tal fuerza que separan el cromosoma del huso (18).

Predictividad de los micronúcleos

La relación entre la presencia de micronúcleos y el desarrollo del cáncer está soportada por múltiples estudios. La mayoría de los argumentos incluyen:

- a. La alta frecuencia de este biomarcador en pacientes con cáncer sin tratamiento, individuos con enfermedades congénitas que predisponen al cáncer (6).
- b. La presencia de alta frecuencia de micronúcleos en la mucosa oral, usado como biomarcador de cáncer en ensayos clínicos de quimioprevención (19).
- c. La correlación existente entre los agentes genotóxicos inductores de micronúcleos y la carcinogénesis (20).
- d. La relación inversa entre la frecuencia de micronúcleos y la concentración sanguínea y/o ingesta de los micronutrientes asociados a la prevención del cáncer como calcio, vitamina E, entre otros (21).

Micronúcleos en la cavidad bucal

El ensayo de micronúcleos se puede realizar en células del epitelio bucal y otras células exfoliadas provenientes de la rápida división del tejido epitelial; para el caso de la cavidad bucal su utilidad se basa en estudios citogenéticos resaltando que son mínimamente invasivos al tratarse de células exfoliadas de distintas partes de la cavidad oral y nos permite monitorear el daño genético de las poblaciones humanas (4, 22). Este método se usa desde 1980 para demostrar los efectos resultantes de exposiciones ambientales y ocupacionales, estilos de vida, deficiencias alimenticias y otras alteraciones (22). Las células de la cavidad bucal son la primera barrera en la ruta de inhalación o ingestión y son capaces de metabolizar cancerígenos a productos reactivos (23, 24). Aproximadamente el 90% del cáncer en humanos se produce a partir de células epiteliales, las cuales además, representan un blanco preferido para los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que entran al cuerpo por inhalación o ingestión (22).

El epitelio oral está compuesto por 4 estratos de poblaciones celulares estructurales, progenitoras y de maduración, incluyendo la lámina propia o tejido conectivo, las células basales o lámina basal, capa o estrato espinoso y una capa superficial de queratina. Una serie de estructuras parecidas a dedos, conocidas como "rete pegs" proyectados desde el tejido conectivo hacia la capa epidérmica produciendo un efecto ondulante de las células de la capa basal. En el epitelio oral se produce una constante renovación de células, en el cual las células que se desprenden son reemplazadas por nueva células resultantes de la mitosis que se produce en la capa basal. Es en la capa basal donde se encuentran las células madre capaces de expresar alteraciones genéticas durante la división celular tales como micronúcleos. Las células hijas, que pueden o no incluir micronúcleos, se diferencian en la capa espinosa y la queratinizada para luego exfoliar en la cavidad bucal. Algunas de estas células puede degenerar en células con cromatina condensada, núcleos fragmentados, núcleos pignóticos o pueden perder por completo su material nuclear (22). Estos biomarcadores de daño genético y muerte celular se pueden observar tanto en linfocitos como en células de la cavidad bucal proporcionando mayor información sobre el daño del genoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda electrónica sistemática de literatura en bases de datos como: Ovid, Ebscohost, Science Direct y Pubmed, desde el año 2000 hasta el año 2011. Con palabras clave como: micronuclei, DNA damage, gingival tissue y resins. La búsqueda se limitó a documentos en inglés que cumplieran los requisitos de inclusión. Los títulos y resúmenes de cada artículo fueron estudiados, de acuerdo a la relevancia, luego de tener acceso a los artículos de texto completo.

Los criterios de inclusión fueron: publicaciones en inglés, estudios que incluyeran descripción de la metodología y/o protocolo del ensayo de micronúcleos.

RESULTADOS

En la búsqueda sistemática en las bases de datos Ovid, Ebsco Host, Science Direct y Pubmed se obtuvo un total de 282.872 artículos de los cuales se seleccionaron los que cumplieron con los requisitos de inclusión y fueron posteriormente analizados y discutidos teniendo en cuenta título, autores, revista, año, volumen, mes y páginas.

Búsqueda sistemática:

PALABRAS CLAVE	OVID	EBSCO HOST	SCIENCE DIRECT	PUBMED	TOTAL
1 Micronuclei	1.201	1.451	1.488	2.676	6.816
2 DNA Damage	6.347	22.405	60.648	51.317	140.717
3 Gingival tissue	3.724	925	7.076	4.553	16.278
4 Resins	4.583	31.453	21.191	17.082	74.309
1 y 2	7.472	435	967	1.010	9.884
1 y 3	3.925	67	36	2	4.030
1 y 4	6.913	11	92	17	7.033
2 y 3	4.859	7	689	29	5.584
2 y 4	6.389	25	6.566	45	13.025
3 y 4	3.895	19	1.203	79	5.196
Total	49.308	56.798	99.956	76.810	282.872

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el potencial para detectar los efectos precoces de diversos mutagénicos y cancerígenos, su capacidad para identificar las alteraciones hereditarias y su predictividad para el cáncer la identificación y cuantificación de micronúcleos se convertirá, con el paso del tiempo, en un criterio cada vez más importante. Además el alto nivel de validación internacional alcanzado por este biomarcador y la perspectiva de aplicación de alto rendimiento mediante sistemas automatizados demuestra la importancia de la citogenética. Sin duda los efectos genotóxicos de los agentes que implican un riesgo para las poblaciones humanas serán evaluados con mayor eficiencia.

Suhas, Ganapathy, Gayatrivedi y Ramesh en el 2004, en un estudio para demostrar la relación del tabaquismo con la incidencia de cáncer reportan que la frecuencia de células micronucleadas refleja la capacidad de los tejidos de activar procarcinógenos en especies reactivas o inactivar o atrapar los carcinógenos finales tras aplicar el ensayo de micronúcleos en muestras epiteliales de la mucosa bucal de 50 pacientes fumadores y no fumadores. Dichos autores además establecen la posibilidad de cuantificar el daño genético en diferentes tejidos le brinda al ensayo de micronúcleos mayor aplicabilidad, por lo cual tiene predilección ante muchos otros estudios (25).

Existen criterios para la selección de las células estudiadas, las cuales incluirán células binucleadas y micronúcleos, definidos por el HUMN-Project (26) entre los cuales se determina que las células binucleadas deben tener un citoplasma fácilmente diferenciable, las membranas nuclear y citoplásmica deben estar intactas, los núcleos con similar grado de condensación de la cromatina, igual tamaño, forma y patrón de tinción, pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos, pueden tocarse pero no solaparse y que ninguno de los núcleos se encuentre en etapa de apoptosis. Los criterios para los micronúcleos son que la tinción tenga una intensidad similar o mayor a la del núcleo principal, que su forma sea similar a la de los núcleos de la célula binucleada, que no estén conectados con los núcleos de la célula binucleada, puede tocar los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse en ellos. Estas consideraciones generales actúan como guía y podrán ser aplicados a todas las muestras con fines de determinar presencia de micronúcleos y otras alteraciones genéticas (27).

Las diferencias entre estudios in vivo e in vitro apuntan a una mayor dificultad a la hora de interpretar el tipo de efecto en la medición del riesgo. Los efectos que se producen in vitro no necesariamente se producen también in vivo o se producen en niveles diferentes como, por ejemplo, la división celular, las células se multiplicarán a un ritmo diferente in vivo e in vitro en función de las condiciones fisiológicas, genéticas y la cantidad de micronutrientes (2).

Para el tópico de las variables que influyen en el nivel de micronúcleos encontrados tanto en linfocitos como en células epiteliales, según la revisión sistemática se puede concluir:

- Rickes y cols. demuestran que las variables sociodemográficas ejercen una marcada influencia sobre la incidencia de micronúcleos en células del epitelio bucal (4).
- En cuanto a la influencia del sexo y la edad, hay múltiples estudios sobre la relación entre el cromosoma X, edad y la incidencia de micronúcleos ya que es de amplio conocimiento que es mucho más marcada la presencia de alteraciones genéticas en mujeres que en hombres (14, 28). Para analizar la variable de edad se deben considerar dos factores importantes:

- a. El efecto acumulativo de la adquisición de mutaciones en genes implicados en la reparación del DNA, segregación cromosomal y puesto de control del ciclo celular.
 - b. Aberraciones cromosomales numéricas y estructurales causados por exposición a genotoxinas endógenas nutrición, exposición a genotoxinas ambientales u ocupacionales y demás factores de estilo de vida poco saludables.
- La nutrición como variable en el estudio de la presencia de micronúcleos y sus niveles en linfocitos se sugieren que los suplementos de vitaminas antioxidantes y ciertas vitaminas del complejo B pueden causar una reducción sustancial de la frecuencia de micronúcleos (29). Al comparar los niveles en plasma de micronutrientes como ácido fólico, vitamina B12, C y E no se encontraron diferencias significativas en los niveles sanguíneos de estos micronutrientes específicos (28).

Se considera de acuerdo a lo expuesto y analizado a lo largo del presente artículo, que la presencia de micronúcleos en tejidos de la cavidad oral, puede ser contemplada como un marcador o un proceso que permita evaluación de la calidad e integridad del material genético de las células de los tejidos en la cavidad oral. Se propone como un enfoque investigativo importante dentro de la odontología. Los resultados del análisis de la revisión sistemática apoyan la hipótesis que relaciona la frecuencia de micronúcleos con el desarrollo de cáncer partiendo del hecho que una proporción sustancial de la inestabilidad genética de las células cancerosas se debe a defectos estructurales específicos en la segregación cromosómica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fenech M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* 2005; 111:3-32.
2. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.
3. Rocco L, Peluso C, Stingo V. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish

- genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. *Environ Toxicol* 2011 Mar 7.
4. Rickes LN, Alvarengo MC, Souza TM, Garcias GL, Martino-Roth MG. Increased micronucleus frequency in exfoliated cells of the buccal mucosa in hairdressers. *Genet Mol Res* 2010;9(3): 1921-8.
 5. Ghanayem BI, Witt KL, El-Hadri L, Hoffler U, Kissling GE, Shelby MD, et al. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *Biol Reprod* 2005 Jan;72(1):157-63.
 6. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today* 2002 Nov 15;7(22):1128-37.
 7. Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jan 4;97(1):303-8.
 8. Moretti M, Bonfiglioli R, Feretti D, Pavanello S, Mussi F, Grollino MG, et al. A study protocol for the evaluation of occupational mutagenic/carcinogenic risks in subjects exposed to antineoplastic drugs: a multicentric project. *BMC Public Health* 2011;11:195.
 9. Sellappa S, Balakrishnan M, Raman S, Palanisamy S. Induction of micronuclei in buccal mucosa on chewing a mixture of betel leaf, areca nut and tobacco. *J Oral Sci* 2009 Jun;51(2):289-92.
 10. Roth JM, Restani RG, Goncalves TT, Sphor SL, Ness AB, Martino-Roth MG, et al. Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. *Genet Mol Res* 2008;7(2):433-43.
 11. Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys* Feb;98(2): 234-43.
 12. Bull C, Fenech M. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or 'nutriomes' for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. *Proc Nutr Soc* 2008 May;67(2):146-56.
 13. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007;2(5):1084-104.
 14. Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003 May;18(3):221-33.
 15. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* Jan;26(1):125-32.
 16. Bakhoum SF, Genovese G, Compton DA. Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability. *Curr Biol* 2009 Dec 1;19(22):1937-42.
 17. Gisselsson D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma* 2008 Dec;117(6):511-9.
 18. Pampalona J, Soler D, Genesca A, Tusell L. Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Genes Chromosomes Cancer* Apr;49(4):368-78.
 19. Van Schooten FJ, Besaratinia A, De Flora S, D'Agostini F, Izzotti A, Camoirano A, et al. Effects of oral administration of N-acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker study in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002 Feb;11(2):167-75.
 20. Bettega D, Calzolari P, Doneda L, Belloni F, Tallone L, Redpath JL. Differential effectiveness of solar UVB subcomponents in causing cell death, oncogenic transformation and micronucleus induction in human hybrid cells. *Int J Radiat Biol* 2003 Mar;79(3):211-6.
 21. Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S, Ceppi M, et al. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-

- carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 2005 May;26(5):991-9.
22. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 2008 Jul-Aug;659(1-2):93-108.
23. Vondracek M, Xi Z, Larsson P, Baker V, Mace K, Pfeifer A, et al. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis* 2001 Mar;22(3):481-8.
24. Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, Kumar SV, Aldous KM, Gierthy JF, et al. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res* 2004 Sep 15;64(18):6805-13.
25. Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi M, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat Res* 2004 Jul 11;561(1-2):15-21.
26. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003 Jan 10;534(1-2):65-75.
27. Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis* 2011 Jan;26(1):239-45.
28. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011 Jan;26(1):43-9.
29. Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2011 Jan;26(1):69-76.

CORRESPONDENCIA

Antonio Díaz Caballero
 Correo electrónico: adiazc1@unicartagena.edu.co,
 antoniodiazc@yahoo.com.