

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE DEPORTES

**Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad en células de
epitelio bucal en personas con obesidad.**

**TESIS PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN ENFERMERIA**

PRESENTA

CARLOS RAMÓN CÁRDENAS VALENCIA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, SEPTIEMBRE 2023



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
ESCUELA CIENCIAS DE LA SALUD
CAMPUS ENSENADA



"Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad en células de epitelio bucal en personas con obesidad"

TESIS
PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TITULO
DE:

Licenciatura en Enfermería.

PRESENTA:

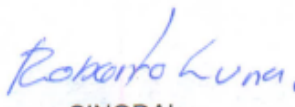
Carlos Ramón Cárdenas Valencia
351482

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P. las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rúbrica:


DIRECTOR
Dr. Balam Ruiz Ruiz


CODIRECTOR
Dr. Esteban Hernández Armas


SINODAL
Dra. María Evarista Arellano García


SINODAL
Dr. Roberto Luna Vázquez Gómez

"Por la Realización Plena del Ser"

RESUMEN

La evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad es muy importante para conocer el estado de salud de los individuos a nivel celular, el ensayo de micronúcleos y anomalías nucleares en mucosa bucal permite tener conocimiento del riesgo en la salud que tiene el individuo expuesto a diferentes factores químicos, físicos o biológicos, dicho ensayo se ha utilizado para estudiar la respuesta de diferentes biomarcadores, en personas con sobrepeso y obesidad, estas condiciones que aumentan el Índice de Masa Corporal (IMC) promueven anomalías nucleares y aumentan la frecuencia de micronúcleos. En este trabajo se evaluaron los biomarcadores de daño citotóxico y genotóxico en células del epitelio bucal, se tomó en cuenta la frecuencia de anomalías nucleares y citoplasmáticas en personas obesas y no obesas, como parte del estudio se hizo la historia médica y estudios de laboratorios a los pacientes. Los objetivos de este ensayo fueron definir si existe relación entre los biomarcadores en células de epitelio bucal y la obesidad en personas con esta condición, como parte del estudio se compararon los datos con un grupo control. Los resultados mostraron más daño citotóxico en las personas del grupo control comparados con el grupo de individuos obesos. Esto se puede atribuir al consumo de sustancias tóxicas como el alcohol o cigarrillos. Con respecto a la genotoxicidad el grupo de individuos obesos presentó mayores frecuencias de anomalías nucleares que el grupo control, con estos resultados se puede inferir que la obesidad repercute en el metabolismo celular, produciendo daño genotóxico. Basados en los resultados de este trabajo se puede concluir que los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad pueden aumentar dependiendo de los estilos de vida de las personas.

Palabras claves: Obesidad, Genotoxicidad, Citotoxicidad, Epitelio Bucal, Micronúcleos.

Resumen aprobado por:



Dr. Balam Ruiz Ruiz

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mi familia, mi padre Ramón Cárdenas, mi madre Patricia Valencia y mi hermano Brandon Cárdenas por todo el apoyo brindado en las diferentes etapas de la vida.

A mis tías Guadalupe Cárdenas y Rosa Cárdenas que han sido cómplices de nuevos conocimientos en mi formación como profesional y por último y no menos importante Cruz Cárdenas que con una plática en el año 2018 causó gran motivación a intentar cosas nuevas.

A la LE. Cynthia Herrera De la Vega por todas las experiencias que hemos pasado, pláticas amenas y sus consejos de saber esperar y darle tiempo al tiempo; siempre fuiste parte de esto.

A Elizabeth De la Vega por sus atenciones, apoyo mostrado y consejos de vida.

A mi “compare” Rogelio Alcocer alias “choco” por tantas aventuras juntos y las que faltan.

Agradecimientos

Al Dr. Balam Ruiz Ruiz por aceptar ser el director de esta tesis y siempre buscar soluciones ante cualquier problema.

A la Dra. Yanis Toledano Magaña y al Dr. Juan Carlos Garcia Ramos por brindarme la oportunidad de elaborar este trabajo de tesis, por sus consejos y ayuda incondicional. Por abrirme las puertas al área de la investigación.

A la Dra Maria Evarista Arellano Garcia por enseñarme la técnica y conteo de células de epitelio bucal.

Al Dr Gener Jose Aviles Rodriguez por sus consejos acertados, su disponibilidad para aclarar cualquier duda y por permitirme interpretar resultados en su laboratorio de Medicina Computacional.

A la Bioing. Karla Iliana Juarez Herrera por ayudarme con cualquier duda que se presente en la redacción de esta tesis, por los consejos y hacer más ameno el tiempo en la realización de la misma.

Al Dr. Roberto Luna Vazquez Gomez por aceptar ser sinodal de esta tesis.

Al LE. Jesus Israel Agúndez Páramo por ser cómplice en el servicio social e impulsarme a realizar esta investigación.

*“La suerte favorece sólo a la mente preparada”
- Louis Pasteur*

- Índice

1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1 Genotoxicidad y citotoxicidad.	3
2.1.1 Técnica para determinar genotoxicidad (citología exfoliativa)	3
2.2 Estudios previos	3
2.2.1 Cigarrillos	3
2.2.2 Pesticidas.	4
2.2.3 Alcohol	4
2.3 Obesidad.	4
2.3.1 Parámetros físicos de la obesidad	5
2.3.2 Obesidad como problema de salud pública, <i>Estadísticas a nivel global.</i>	5
2.4 Morbilidades asociadas con la obesidad.	5
2.4.1 Diabetes.	5
2.4.2 Hipertensión.	6
2.4.3 Dislipidemias.	6
2.5 Factores asociados con la obesidad.	7
2.5.1 Alimentación.	7
2.5.2 Estilo de vida sedentaria.	7
2.5.3 Dislipidemias.	8
2.5.4 Niveles de colesterol.	8
3. Justificación	9
4. Marco teórico	11
4.1 Mitosis	11
4.2 Migración de células del estrato basal al estrato córneo.	11
4.3 Tipos de células del epitelio bucal.	12
4.3.1 Células diferenciadas.	12
4.3.2 Células no diferenciadas.	12
4.3.3 Células con micronúcleos.	12
4.3.4 Células con gemas.	13
4.3.5 Células binucleadas.	13
4.3.6 Células de cromatina condensada.	13
4.3.7 Células en cariorrexis.	13
4.3.8 Células picnóticas.	13

4.3.8 Células cariolíticas.	14
5. Hipótesis	15
6. Objetivos	16
7. Metodología	17
7.1 Rotulación de laminillas (Ligandos).	17
7.2 Toma de muestra.	17
7.3 Fijación de toma de muestra.	18
7.4 Tinción de las células.	18
7.5 Conteo de células por campos.	19
8. Resultados y discusión.	20
8.1 Resultados de citotoxicidad	21
8.2 Resultados de genotoxicidad.	23
9. Conclusión.	28
10. Referencias	29
11. Anexos	33

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del procedimiento.	19
Figura 2. Biomarcadores de citotoxicidad.	22
Figura 3. Biomarcadores de genotoxicidad.	25
Figura 4. Frecuencia de micronúcleos.	26

Índice de tablas

Tabla 1 Características del grupo control y del grupo de obesos.	20
Tabla 2 Valores de los conteos de citotoxicidad y genotoxicidad.	21
Tabla 3. Relación de Frecuencia de células con micronúcleos e IMC.	26

1. Introducción.

La evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad es muy importante para conocer el estado de salud de los individuos a nivel celular. El ensayo de micronúcleos y anomalías nucleares en mucosa bucal permite tener conocimiento del riesgo en la salud que tiene el individuo expuesto a diferentes factores químicos, físicos o biológicos. Además, es un ensayo de muy bajo costo y alta confiabilidad, una de sus mayores ventajas es que es mínimamente invasivo, por lo cual, las personas son más accesibles a participar en los estudios que involucran esta técnica [1].

El ensayo de micronúcleos se ha utilizado para estudiar la respuesta de diferentes biomarcadores, en personas con sobrepeso y obesidad los micronúcleos se han establecido en cifras más altas que en personas con un Índice de Masa Corporal (IMC) elevado en comparación con un IMC normal. El daño al material genético es un indicador de un mayor riesgo de cáncer [2]. La aparición de micronúcleos se relaciona con la exposición a agentes tóxicos, estilos de vida sedentarios y la alimentación. Además, están relacionados con el envejecimiento acelerado [3].

Algunos estudios realizados han demostrado que una mayor frecuencia de micronúcleos es un biomarcador para predecir patologías cardíacas y está altamente relacionado con el número de padecimientos relacionados con esto. Estas patologías están fuertemente relacionadas con el síndrome metabólico y la diabetes, lo que a su vez aumenta el riesgo de padecer un evento cerebrovascular (ECV) [4].

La inestabilidad genómica puede ser provocada por la radiación ionizante y el daño genómico se puede observar mediante el incremento en la frecuencia de micronúcleos [5]. Una práctica que se asocia al daño genético es la exposición a petróleo y sus derivados, un ejemplo muy común en este sentido se da en las personas que trabajan como despachadores de gasolina. Estas personas presentan mayor cantidad de micronúcleos en comparación con personas que no están expuestas de manera constante al petróleo y/o sus derivados [6].

Para determinar la genotoxicidad y citotoxicidad en células de epitelio bucal se analiza la frecuencia de algunas estructuras como los micronúcleos, además, se evalúa la morfología de las células para comprobar la salud a nivel celular de los individuos. El ensayo permite conocer en cuál estadio de los nueve que existen se encuentra la célula (célula diferenciada, célula basal, célula cariolítica, célula en cariorrexis, célula con cromatina condensada, célula con gemas, células binucleadas, célula picnóticas y células con micronúcleos) [7].

Los estudios demuestran que las personas con obesidad tienen mayor probabilidad de desarrollar cáncer, ya que la obesidad provoca cambios metabólicos que alteran la fisiología normal del cuerpo humano y, por consiguiente, promueve cambios en la genética de las células. Los cambios en el metabolismo provocados por la obesidad involucran la disfunción e inflamación del tejido adiposo y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS pueden producir cambios en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y una mala reparación de este al inhibir los sistemas moleculares encargados de ello, lo que propicia un alto riesgo de padecer cáncer. Algunos otros cambios metabólicos producidos por la obesidad se reflejan en una microbiota intestinal alterada o niveles alterados de ácidos biliares [8].

La genotoxicidad se asocia con la obesidad al reportarse que a mayor IMC se encuentra una mayor cantidad de micronúcleos que es un biomarcador de punto final de daño genotóxico. El estudio menciona que del grado 1 de obesidad hacia el grado 2 existe un incremento del 100% de daño genético en el grado 2 respecto al grado 1, es decir el doble de daño. Así mismo, el grado de obesidad 3 tiene 100% más daño genético que el grado 2. La tendencia indica que por cada grado de obesidad subirá un 100% el daño genético [9].

2. Antecedentes.

2.1 Genotoxicidad y citotoxicidad.

La genotoxicidad se define como el resultado del daño genético a las células. Esta se da por la interacción de un agente potencialmente tóxico y los ácidos nucleicos de la célula; es decir que es dañina para el ADN de las células. El agente tóxico puede actuar directa o indirectamente en la estructura o funcionamiento del ADN; ya que puede afectar a las proteínas y enzimas que están involucradas directamente en la replicación celular o modificar los componentes del ácido nucleico. No todas las sustancias genotóxicas son necesariamente cancerígenas, pero en su mayoría pueden crear mutaciones en la división celular y de esta forma poder desarrollar algún tipo de cáncer en el organismo [10]. La citotoxicidad es el conjunto de los efectos adversos provocados por agentes físicos, químicos o biológicos que resultan en una interferencia de la estructura o procesos celulares que son esenciales para el funcionamiento, supervivencia y proliferación celular [11].

2.1.1 Técnica para determinar genotoxicidad (citología exfoliativa)

Una de las técnicas para poder detectar el daño genotóxico es la citología exfoliativa, la cual permite observar los diferentes estadios celulares al fijar la muestra en una laminilla. La técnica consiste en tomar una muestra de epitelio del carrillo utilizando una laminilla esmerilada o bien un cepillo para posteriormente hacer un frotis sobre una laminilla nueva, fijar la muestra con etanol, teñirla, observar y cuantificar la frecuencia de los diferentes biomarcadores de daño celular utilizando el microscopio [12].

2.2 Estudios previos

2.2.1 Cigarrillos

La frecuencia de fumar cigarro produce cambios a nivel celular que se pueden evidenciar por citología exfoliativa. Esto se da porque los cigarrillos contienen sustancias potencialmente cancerígenas, como nicotina, nitrosaminas, y níquel, entre otras. En un estudio realizado se demostró que las personas que fuman cigarrillos electrónicos tienen más daño celular y genético que los fumadores de

tabaco. Los compuestos químicos usados en los cigarrillos electrónicos como el propilenglicol y el glicerol, así como los compuestos orgánicos volátiles derivados de su descomposición por calor como formaldehído, acetaldehído y acroleína promueven el daño al ADN, generando estrés oxidativo e induciendo a una aceleración en la apoptosis y otros cambios en la fisiología celular [13].

2.2.2 Pesticidas.

El daño genotóxico que se presenta en personas que están comúnmente expuestas a pesticidas se refleja en un mayor porcentaje de daño celular en comparación con personas que no están expuestas a este tipo de sustancias. Un ejemplo son los resultados mostrados por Anguiano y colaboradores en población infantil con y sin exposición a pesticidas organoclorados, los autores demostraron que existe un mayor número de micronúcleos en epitelio bucal cuando se presenta una mayor concentración de pesticida organoclorado en las muestras de cabello de los niños. Esto muestra el potencial daño genotóxico de los pesticidas en personas que están expuestas de manera continua [14].

2.2.3 Alcohol

En los últimos años se ha asociado fuertemente el consumo de alcohol y el cáncer. Se desconoce el mecanismo molecular por el cual sucede, pero se cree que el primer metabolito del etanol es el responsable de esto. Este metabolito es el acetaldehído; al cual, se le asocia la genotoxicidad y un aumento de micronúcleos en las células [15]. El etanol y el acetaldehído producen cambios hormonales, estrés oxidativo e inflamación, por ello se cree que estos tienen una estrecha relación con el aumento de la genotoxicidad [16]; algo similar a lo que sucede con los cigarrillos electrónicos.

2.3 Obesidad.

La obesidad es el exceso de tejido adiposo en el cuerpo de las personas, basados en el índice de masa corporal (IMC), un IMC mayor de 30 indica obesidad. Existen tres grados de obesidad; el grado 1 se asocia cuando la persona tiene un IMC de

entre 30 a 34.9, el grado 2 es cuando la persona tiene un IMC de entre 35 a 39.9, y el grado 3 es cuando la persona tiene un IMC mayor de 40 [17].

2.3.1 Parámetros físicos de la obesidad

El Índice de Masa Corporal (IMC) relaciona el peso y la talla. Este se calcula dividiendo el peso en kilos de la persona entre el cuadrado de su talla. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) los valores para detectar la presencia de obesidad es un IMC mayor de 30 [18]. Fórmula para identificar el IMC:

$$Imc = \text{Peso (kilogramos)} \div \text{Altura}^2 \text{ (Metros)}.$$

2.3.2 Obesidad como problema de salud pública, *Estadísticas a nivel global.*

En el año 2016 aproximadamente el 13% de la población mundial mayores de 18 años eran obesos, es decir, más de 650 millones de personas tenían el padecimiento. Entre el año 1975 y el año 2016 la población con obesidad casi se ha triplicado [19]. Actualmente México ocupa el quinto puesto en obesidad en el mundo respecto al número de personas con obesidad. Desde 1988 hasta 2016 la obesidad aumentó un 260% en mujeres. Por otra parte, en el periodo de 2000 a 2016 la obesidad en hombres se incrementó en un 49.7% [20]. En el año 2012 en Baja California se tenía un 39.5% de la población con obesidad de acuerdo con datos de ENSANUT [20].

2.4 Morbilidades asociadas con la obesidad.

2.4.1 Diabetes.

Existen dos tipos de diabetes, la diabetes tipo 1 es cuando el páncreas no produce insulina y por consiguiente la persona tiene que administrarse insulina de forma alterna. La diabetes tipo 2 comienza principalmente con la resistencia a la insulina, y por consiguiente el paciente tiene un exceso de glucosa circulante en el torrente sanguíneo, mientras que la insulina que produce el cuerpo puede ser poca y/o de mala calidad. [21]. La diabetes es la principal morbilidad asociada con la obesidad. En este sentido hubo un aumento del 6.7% en 1993 al 12.9% en el año 2016 a nivel

nacional. Además, en el año 2015 hubo más de 62,000 muertes por diabetes [20]. De acuerdo con los datos recabados por ENSANUT, en el año 2016 se registró que existe una mayor probabilidad de padecer diabetes si se tiene obesidad en comparación de las personas que no tienen obesidad, es decir que se mantienen con un IMC menor que 25 [20].

2.4.2 Hipertensión.

La hipertensión es el aumento de la presión contra las paredes de los vasos sanguíneos cuando la sangre circula por el organismo. La hipertensión es una de las morbilidades fuertemente asociadas a la obesidad y a los problemas del corazón [22]. La relación entre la obesidad y la hipertensión es el aumento del gasto cardiaco por la gran cantidad de tejido adiposo en el cuerpo del individuo obeso, condición que requiere un mayor volumen sanguíneo y una mayor cantidad de vascularización.

En el año 2016 la prevalencia de hipertensión en adultos en México fue de 31.5%. Aunque se mantuvo el mismo porcentaje 6 años anteriores al 2016 la cifra sigue siendo elevada, colocando a la población mexicana como una de las que presenta las prevalencias más altas en el mundo. De la misma manera que la diabetes, existe una probabilidad mayor de padecer hipertensión en las personas obesas en comparación con las personas que mantienen un IMC menor que 25 [20].

2.4.3 Dislipidemias.

Las dislipidemias son el exceso de lípidos (grasas) en sangre, principalmente colesterol y triglicéridos. Las dislipidemias aumentan el riesgo de padecer aterosclerosis, derrames cerebrales, infartos y algunas otras complicaciones relacionadas con el sistema circulatorio. En México, las dislipidemias son el principal factor de riesgo (infartos, aterosclerosis, entre otros) entre los adultos y, por consiguiente, uno de los principales problemas que han elevado la mortalidad en ese sector de la población. Cabe mencionar que solo el 8.6% de ese sector de la población sabía que tenía el padecimiento. El principal factor de riesgo

cardiovascular entre los adultos de 20 a 60 años en México es la hipercolesterolemia con un 43.5% [20].

2.5 Factores asociados con la obesidad.

2.5.1 Alimentación.

Los principales alimentos que consume la mayoría de la gente que tiene obesidad son alimentos con una alta densidad calórica y una baja densidad nutricional. Estos alimentos de alta densidad calórica movilizan dopaminas que estimulan la ingesta de azúcares y grasas, lo cual promueve la dependencia de las personas a estos alimentos. Algunos ejemplos son galletas, pan dulce, cereales de caja, botanas saladas, y postres [20].

Otro grupo de alimentos con mayor cantidad de grasa y energía son las carnes rojas y alimentos procesados; estos alimentos tienen una alta relación con la promoción de enfermedades como el cáncer. Los nitratos añadidos a los alimentos procesados los hacen potencialmente carcinogénicos y mutagénicos. Algunos ejemplos de alimentos procesados pueden ser, salchichas, chorizo y algunos jamones. Por otra parte, los alimentos de baja densidad energética y altos en fibra como los cereales enteros, las frutas, verduras y las leguminosas, en especial las de cáscara verde son las que principalmente aportan más fibra. Estos también aportan vitaminas, antioxidantes y minerales. El aporte de fibra en la dieta ayuda a saciar por más tiempo el hambre [20].

2.5.2 Estilo de vida sedentaria.

El sedentarismo está fuertemente asociado con enfermedades crónico-degenerativas como lo son la diabetes, hipertensión y el colesterol alto, que provoca aterosclerosis [9]. Además, el sedentarismo también se asocia con que la persona tenga mayores posibilidades de desarrollar algún tipo de cáncer [23].

En México los estilos de vida sedentaria son muy comunes, se dice que uno de cada cuatro adultos y cuatro de cada diez adolescentes son físicamente inactivos; el término físicamente inactivos hace referencia a que estos individuos no cumplen con

los requerimientos mínimos de actividad física. La mayor parte de la actividad física en México es debido a la necesidad, es decir para trasladarse a pie o en bicicleta a sus hogares o trabajos; esto se debe a que la mayor parte de la población no dispone de un automóvil de uso particular para sus necesidades o actividades diarias. El estilo de vida sedentario afectó al 58.3% de los mexicanos mayores de 18 años en el año 2019. Para poder contrarrestar ese porcentaje la Organización Mundial de la Salud recomienda al menos 150 minutos de actividad física moderada por semana (30 minutos por 5 días) en adultos mayores de 18 años [24].

2.5.3 Dislipidemias.

Un estudio de nutrición en los Estados Unidos de América demostró que las personas que son obesas tienen una tendencia más alta a tener dislipidemias en comparación con las personas que no lo son. Se observó que en las personas obesas el colesterol total y el colesterol contenido en lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) eran mayores. La relación que existe es que entre más grasa tenga la persona, tiene una mayor propensión a las dislipidemias y con ello un mayor porcentaje de padecer síndrome metabólico. Entre los grupos de jóvenes con obesidad y adultos con obesidad (hombres y mujeres) existe un alto nivel de colesterol total, un bajo nivel de colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés) y un alto nivel de colesterol LDL [25].

2.5.4 Niveles de colesterol.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, los niveles de colesterol para un caso probable de dislipidemia son los siguientes: Colesterol total mayor o igual a 200 mg/dL, Triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dL, C-HDL menor que 40 mg/dL, Colesterol no HDL mayor o igual a 160 mg/dL (ver anexo 1).

3. Justificación

En México la obesidad afecta a casi un tercio de la población. La obesidad presenta consigo comorbilidades como hipertensión, diabetes, problemas cardiovasculares, trastornos óseos y algunos tipos de cáncer. La obesidad es una enfermedad que en el año 2014 afectó a uno de cada tres adultos y las cifras van en aumento. Los estilos de vida sedentario, y una mala alimentación son los principales factores para desarrollar obesidad. Las personas obesas no sólo tienen un IMC elevado, son más propensas a padecer múltiples enfermedades, por ejemplo, las personas con obesidad tienen un mayor porcentaje de riesgo para desarrollar patologías cardíacas, esto debido a los altos niveles de colesterol que generalmente presentan [20].

El cáncer es otra patología que se puede presentar si se tiene obesidad. Esto se da porque la obesidad provoca cambios en el metabolismo, lo cual puede aumentar en la producción de hormonas, aumento en la producción de insulina y retención de líquidos entre muchas otras modificaciones.

El metabolismo de las personas con obesidad promueve el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y como resultado de esto se puede presentar daño genético y daño citotóxico. El daño a nivel celular puede monitorearse por lo que se puede llevar un control adecuado. Se puede tener un conteo estandarizado de células de cualquier morfología para conocer la salud a nivel celular.

Uno de los estudios estandarizados a nivel mundial para detectar el daño genotóxico es el conteo de micronúcleos en células del epitelio bucal. Los micronúcleos proporcionan información acerca de cómo se están comportando las células ante un estímulo tóxico para ellas; además del conteo de micronúcleos también se puede observar la morfología celular en otros biomarcadores asociados a daño genotóxico como son las células binucleadas y los brotes nucleares. Aunado a esto se puede observar el daño citotóxico con el conteo de células en cariorrexis, células con cromatina condensada, células carioplíticas y células picnóticas.

El monitoreo de micronúcleos y anormalidades nucleares proporciona información acerca del estado de salud a nivel celular de los individuos. Uno de los puntos clave es que las células de la mucosa bucal se duplican más rápido que algunas otras células. Lo importante de esto es que al monitorear estas células del epitelio bucal también se puede saber cómo se encuentran otros tipos de células, por ejemplo, espermatozoides, óvulos, linfocitos. Por lo anterior en este trabajo se evaluaron los niveles de citotoxicidad y genotoxicidad en células de epitelio bucal de personas obesas, estos resultados se compararon con los datos de personas que no son obesas según su IMC.

4. Marco teórico

Para poder comprender mejor la biología celular, es importante conocer el método de proliferación, es de vital importancia saber que es la mitosis ya que este proceso nos permite conocer el mecanismo por el cual las células pueden multiplicarse de una forma genéticamente correcta, es decir, sin errores [26].

4.1 Mitosis

La mitosis es el proceso por el cual una célula replica su ADN para formar dos células con una carga genética idéntica entre ellas. La mitosis se subdivide en cuatro etapas, profase, metafase, anafase y telofase.

Profase: en esta fase los cromosomas se condensan, la membrana nuclear se rompe y se forman las fibras del huso mitótico (ver anexo 2).

Metafase: en esta segunda fase los cromosomas una vez replicados se ordenan al centro de la célula y una vez aquí forman la placa ecuatorial (ver anexo 2).

Anafase: una vez que los cromosomas están al centro de la célula estos se separan de manera simultánea dirigiéndose hacia un polo diferente y la célula se alarga con terminaciones distintivas (ver anexo 2).

Telofase: las cromátidas terminan la migración hacia los polos, las membranas nucleares se vuelven a formar en dos polos y la nueva membrana celular se forma para crear dos células independientes (ver anexo 2).

4.2 Migración de células del estrato basal al estrato córneo.

Las células basales se encuentran en la capa basal y para poder llegar al estrato córneo primero deben pasar por el estrato espinoso; posteriormente pasan al estrato granuloso, finalmente pasan del estrato granuloso al estrato córneo. Esta migración celular que va desde la capa basal al estrato córneo dura alrededor de 7 hasta 21 días [27].

Consideraciones:

Para evaluar la morfología de las células de epitelio bucal es importante saber datos de las personas, por ejemplo, su edad, su alimentación, si toma y/o fuma, entre algunos otros datos importantes (ver anexo 3).

4.3 Tipos de células del epitelio bucal.

Las células que se observaron en el microscopio fueron las siguientes: células diferenciadas, células no diferenciadas, células con micronúcleos, células con gemas, células binucleadas, células de cromatina condensada, células en cariorrexis, células picnóticas y células cariolíticas.

4.3.1 Células diferenciadas.

Las células diferenciadas tienen un núcleo bien teñido y pueden tenerlo de forma ligeramente ovalada o redonda, núcleo pequeño en relación con el citoplasma y al momento de ser observadas en el microscopio no se observa ninguna otra estructura [7] (ver anexo 4).

4.3.2 Células no diferenciadas.

Estas células tienen un núcleo grande y citoplasma pequeño lo que las hace apreciables al microscopio y más pequeñas en comparación con una célula diferenciada. En ellas no se observa alguna otra estructura de ADN [7] (ver anexo 5).

4.3.3 Células con micronúcleos.

Estas se caracterizan por la presencia de núcleos pequeños en comparación del núcleo principal. Algunos autores mencionan que estos pueden llegar a ser de 1/3 o 1/16 de tamaño en comparación con el núcleo principal de la célula. Estos micronúcleos se encuentran en el citoplasma [7] (ver anexo 6). Los micronúcleos indican que existe una pérdida por la fragmentación cromosómica que se produce en la división nuclear.

4.3.4 Células con gemas.

Algunos autores mencionan que las gemas o brotes nucleares aparecen por la eliminación de una parte del ADN o alguna reparación en él. En estas células se aprecia un pequeño brote unido al núcleo principal mediante un puente. Este brote puede ser desde un cuarto hasta un medio del tamaño del núcleo principal. El brote está bien teñido igual que el núcleo [7] (ver anexo 7).

4.3.5 Células binucleadas.

Se desconoce el origen de las células binucleadas pero algunos autores mencionan que pueden ser fallas en la citocinesis. En ellas se observan dos núcleos en lugar de uno dentro de la misma célula. Aquí los núcleos suelen tener el mismo tamaño y están teñidos a la misma tonalidad, son de tamaños y morfología igual que los núcleos de una célula diferenciada [7] (ver anexo 8).

4.3.6 Células de cromatina condensada.

La morfología celular que presentan estas células es un núcleo fuertemente teñido, ligeramente alargado y en ocasiones estriado. Se menciona que estas células están pasando por etapas aceleradas de apoptosis [7] (ver anexo 9).

4.3.7 Células en cariorrexis.

Algunos investigadores mencionan que en este estadio la célula se puede ir por dos vías, la apoptosis o la necrosis. Estas células presentan una desintegración del núcleo. Presentan una tinción menos fuerte que las células diferenciadas por la misma desintegración nuclear. El tamaño del núcleo puede ser del mismo tamaño que las células diferenciadas o inclusive hasta más grande [7] (ver anexo 10).

4.3.8 Células picnóticas.

Este tipo de morfología celular tiene un pequeño núcleo encogido y alargado, aproximadamente de un tercio o dos tercios de un núcleo normal. Estos núcleos están bien teñidos. Hasta ahora se desconoce el por qué se encuentra en ese

estadio, pero se cree que pueda estar en alguna forma de muerte celular [7] (ver anexo 11).

4.3.8 Células kariolíticas.

En esta morfología celular hay una ausencia del núcleo, es decir, la célula no tiene ADN. En este estadio solo se aprecia el citoplasma teñido de la célula. Se desconoce el significado biológico de esta morfología celular, pero se cree que esta pueda estar experimentando un proceso tardío de muerte celular [7] (ver anexo 12).

5. Hipótesis

Los biomarcadores de daño genotóxico y citotóxico identificados en epitelio bucal son mayores en individuos con obesidad que en individuos sin obesidad.

6. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de pacientes con obesidad mediante los biomarcadores de daño de la técnica de epitelio bucal.

Objetivos específicos

- Determinar los biomarcadores asociados a la citotoxicidad en células de epitelio bucal en personas con y sin obesidad.
- Determinar los biomarcadores asociados a la genotoxicidad en células de epitelio bucal en personas con y sin obesidad.
- Relacionar los indicadores de citotoxicidad en personas con y sin obesidad.
- Relacionar los indicadores de genotoxicidad en personas con y sin obesidad.
- Establecer la relación que existe entre la citotoxicidad y genotoxicidad en personas con y sin obesidad.

7. Metodología

Diseño experimental

Selección de grupo control y población de estudio.

Grupo control

Se seleccionó a un grupo de jóvenes de entre 18-22 años, estudiantes de la carrera de medicina de la Escuela de Ciencias de la Salud, valorados con una encuesta de salud, sin diagnóstico de patologías preexistentes hasta el día de la toma de muestra de epitelio bucal. Se excluyeron del estudio a aquellas personas mayores de 22 años y con alguna patología diagnosticada hasta el día de la toma de muestra.

Grupo de estudio

Se seleccionaron personas mayores de edad con obesidad de cualquier lugar de origen y cualquier ocupación sin alguna comorbilidad detectada en la valoración médica. Se excluyeron a personas con hipertensión, diabetes o cáncer.

7.1 Rotulación de laminillas (Ligandos).

Para la identificación de laminillas se creó el identificador basado en el año de nacimiento del paciente, posteriormente el mes de nacimiento y, por último, la primera letra de su primer nombre seguido de la primera letra de su primer apellido. Ejemplo: 1997-09-CC (ver anexo 13).

7.2 Toma de muestra.

Se utilizaron láminas esmeriladas para el frotis de epitelio bucal; utilizando tres laminillas por paciente, la primera como medio de obtención de material celular, el cual consiste en frotar la laminilla en la parte interior del carrillo haciendo un pequeño raspado hacia afuera (ver anexo 14), una vez obtenida la muestra se hace el barrido en la laminilla previamente rotulada (ver anexo 15 y 16). Es importante identificar de qué lado se tomó la muestra (mejilla derecha o izquierda del paciente). Una vez hecho la primera toma de muestra (ver anexo 17) se continúa con la

obtención de muestra del lado contrario del paciente (mejilla restante). Posteriormente se dejaron secar por un tiempo aproximado de 15- 20 minutos.

7.3 Fijación de toma de muestra.

Una vez secas las muestras se acomodaron las laminillas en cubetas de tinción (ver anexo 18) para cubrirlas completamente con etanol al 70%; dejándolas sumergidas un tiempo de 48 horas. El etanol fija las muestras por deshidratación. Extrae el agua y los lípidos de los tejidos, pero no lo hace con los carbohidratos. Generalmente se utilizan para fijar tejidos a una superficie; el mecanismo es deshidratar la muestra al mismo tiempo que la está fijando [28].

7.4 Tinción de las células.

Una vez fijadas las células (concluidas las 48 horas), se sacaron las muestras para dejarlas secar. Una vez secas se acomodaron en una nueva cubeta de tinción para cubrirlas con Orceína Acética por 2 horas. Pasadas las 2 horas se enjuagaron en agua corriente (ver anexo 19) y se dejaron secar. El paso siguiente una vez secas las muestras es acomodar las laminillas en una nueva cubeta de tinción para cubrirlas con Verde Rápido por 10 minutos. Por último, se enjuagaron las laminillas nuevamente en agua corriente (ver anexo 20) y se dejaron secar para posteriormente limpiar la parte inferior (donde no están las células) con una torunda alcoholada para quitar el exceso de los colorantes de la laminilla. La metodología que se utilizó en este trabajo se esquematiza en la figura 1.

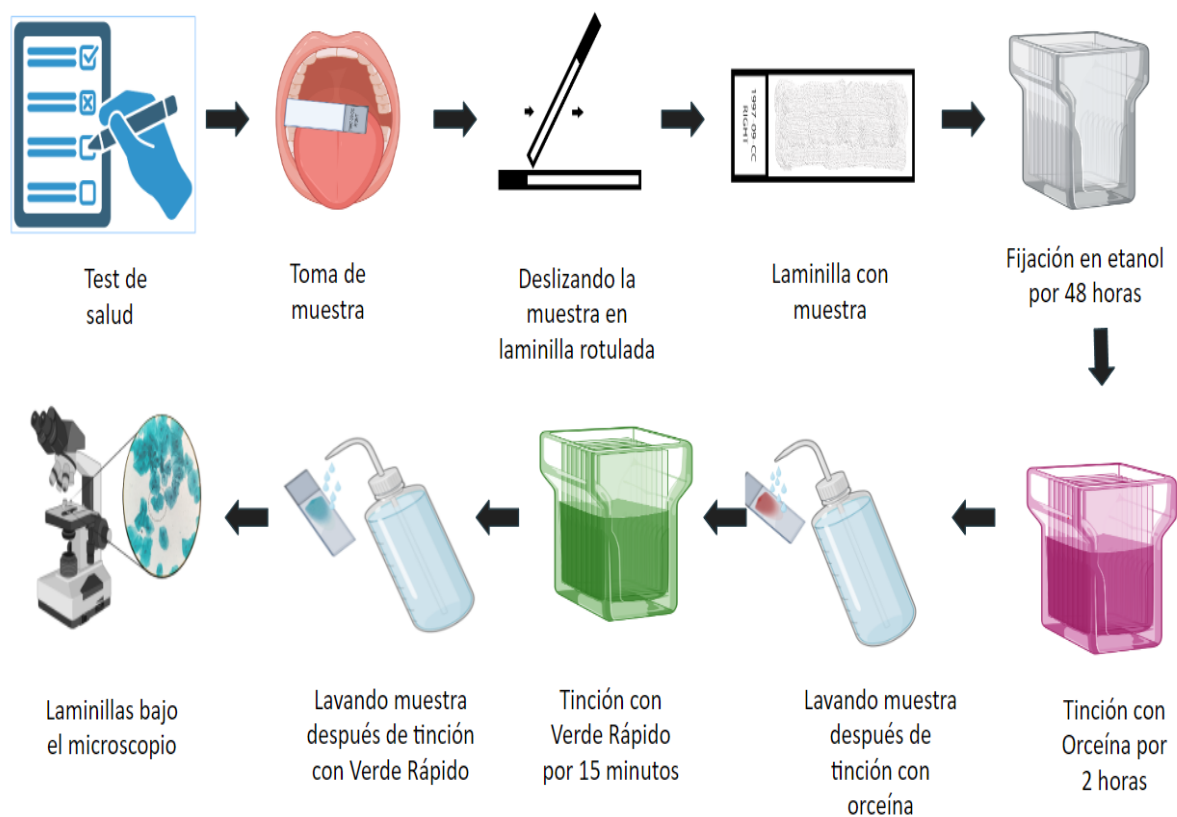


Figura 1. Esquema del procedimiento.

7.5 Conteo de células por campos.

El conteo de células se registró en un formato (ver anexo 21) con las siguientes características, cada fila horizontal representa un campo de visión en el microscopio. Se tomaron en cuenta todos los biomarcadores celulares en células de epitelio bucal, dentro de la misma fila horizontal, y se obtuvo un subtotal. Para concluir el conteo, se sumaron todos los subtotales para así obtener una cifra total neta. Se contabilizaron como mínimo 1000 células por laminilla.

8. Resultados y discusión.

En el presente estudio participaron 9 personas obesas y 19 personas no obesas, para establecer obesidad se tomó en cuenta el índice de masa corporal de los participantes. La distribución de la población de acuerdo con su género es del 44.4% de hombres y del 55.6% de mujeres en el grupo control, por su parte, el grupo de obesos tiene el 36.8% de hombres y el 63.2% de mujeres, en cuanto al consumo de marihuana el 22.2% consume y el 77.8% no consume este estupefaciente en el grupo control, para el grupo de obesos el 5.3% consume y el 94.7% no consume esta droga. La tabla 1 muestra los porcentajes de algunas características y/o sustancias que consume en la población estudiada. Cabe mencionar que el grupo control son estudiantes universitarios con una edad de los 18 a los 22 años y la población de individuos obesos son de 30 años en adelante.

Tabla 1 Características del grupo control y del grupo de obesos.

		Control		Obeso	
		n	%	n	%
Sexo	Hombre	4	44.44	7	36.84
	Mujer	5	55.55	12	63.15
Tabaco	Si	0	0	5	26.31
	No	9	100	14	73.68
Medicamentos	Si	0	0	0	0
	No	9	100	19	100
Marihuana	Si	2	22.22	1	5.26
	No	7	77.77	18	94.73
Alcohol	Si	2	22.22	4	21.05
	No	7	77.77	15	78.94
Comida rápida	Si	5	55.55	8	42.10
	No	4	44.44	11	57.89
Consumo de café	Si	6	66.66	11	57.89
	No	3	33.33	8	42.10

En el presente estudio se evaluaron diferentes biomarcadores de daño citológico y genético en personas con obesidad para compararlos con personas sin obesidad, a dichas poblaciones se les evaluó la citotoxicidad que comprende los siguientes biomarcadores: células picnóticas, células en cariorrexis, células carioplíticas y

células de cromatina condensada y la genotoxicidad que incluye células con brotes nucleares, células con micronúcleos y células binucleadas. Esta evaluación se hizo mediante la técnica de micronúcleos en epitelio bucal, a continuación, se presentan los resultados obtenidos.

Se registraron los conteos de daño citotóxico y genotóxico. En la tabla 2 se muestran los valores de la “media, desviación estándar, valor mínimo, valor máximo”, de los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad. Para determinar la citotoxicidad se tomaron en cuenta los biomarcadores: células picnóticas, células en cariorrexis, células cariолíticas y células de cromatina condensada. Para la genotoxicidad se consideraron las células con brotes nucleares, células con micronúcleos y células binucleadas.

Tabla 2 Valores de los conteos de citotoxicidad y genotoxicidad.

Biomarcador	Condición	n	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
Citotoxicidad						
Picnóticas	Control	19	11	4	5	18
	Obesos	9	4	2	2	9
Cariorrexis	Control	19	18	14	4	40
	Obesos	9	32	11	19	54
Cariолíticas	Control	19	13	6	4	24
	Obesos	9	10	3	6	14
Cromatina condensada	Control	19	50	39	19	148
	Obesos	9	22	7	13	34
Genotoxicidad						
Brotes nucleares	Control	19	3	2	1	8
	Obesos	9	8	4	4	14
Micronúcleos	Control	19	2	2	1	4
	Obesos	9	7	2	3	10
Células Binucleadas	Control	19	3	2	1	10
	Obesos	9	6	3	2	11

8.1 Resultados de citotoxicidad

Los resultados con relación a la citotoxicidad que incluyen los biomarcadores de células cariолíticas, en cariorrexis, picnóticas y con cromatina condensada no evidencian daño estadísticamente significativo, solamente en un tipo de morfología

celular el grupo control se encuentra por debajo del grupo de obesos, basados en la media (figura 2).

El primer biomarcador de citotoxicidad que son las células cariolíticas muestran que el grupo control cuenta con 13 células por cada 1000 células contadas, mientras que el grupo de obesos cuenta con 10 células cariolíticas por cada 1000 células contadas. La segunda comparación muestra que el grupo control cuenta con 18 células en cariorrexis por cada 1000 células contadas y, el grupo de obesos tiene 32 células con cariorrexis por cada 1000. En el tercer biomarcador el grupo control cuenta con una cantidad de 10 células picnóticas por cada 1000; por su parte el grupo de obesos cuenta con 4 células picnóticas por cada 1000 contadas. Como parte de la definición de la citotoxicidad se tomaron en cuenta las células con cromatina condensada, el grupo control cuenta con 50 células contadas por cada 1000 células contadas y el grupo de obesos tiene 22 células por cada 1000.

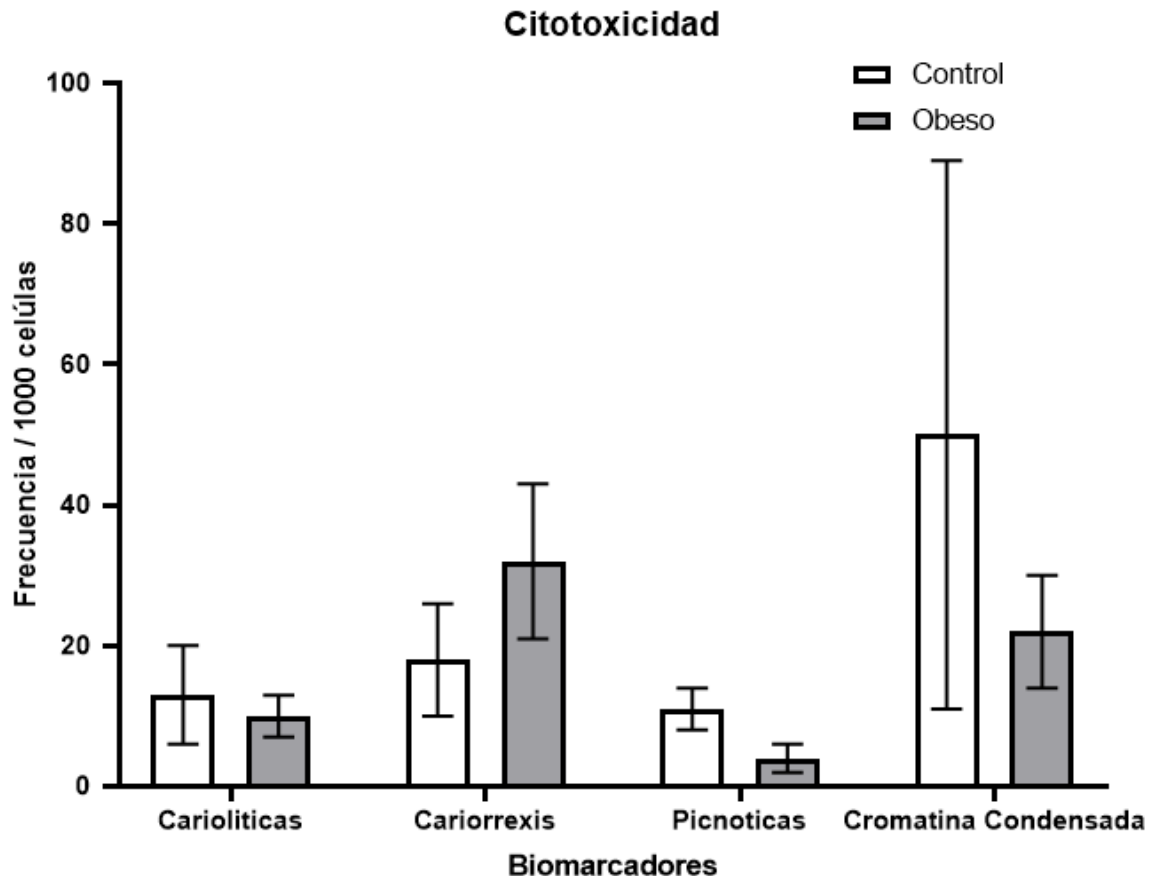


Figura 2. Biomarcadores de citotoxicidad.

De acuerdo con los datos de Thomas (2008), el grupo control de su ensayo tiene valores por encima del grupo de estudio en los 4 biomarcadores de citotoxicidad. Son valores muy similares de los grupos control ya que en el siguiente gráfico (figura 2) se puede observar que hay valores del grupo control por encima de los valores del grupo de estudio en 3 de los 4 biomarcadores. La importancia de esta comparación es que las edades de los grupos control son muy similares.

Dado los resultados descritos previamente se resalta que el grupo control tiene valores por encima del grupo de obesos; se puede inferir que el grupo control pudo estar pasando por una etapa de citotoxicidad aguda. Esto se le puede atribuir al fumar tabaco, marihuana, consumir alcohol, entre algunas otras sustancias tóxicas que puede ocasionar un aumento en los biomarcadores de citotoxicidad

La mayor frecuencia en los biomarcadores de daño citotóxico descritos en los resultados se puede relacionar con el uso de cigarrillos como lo señala en su estudio Keyser (2022), en el que menciona que el humo del cigarrillo influye en la citotoxicidad. Por su parte Nersesyan (2006) menciona en su estudio que las personas fumadoras tienen más células citotóxicas (células cariorrexis, células cariolíticas, y células picnóticas) en comparación con las que no fuman.

Los valores más altos de citotoxicidad en el grupo control también se le puede atribuir al consumo de alcohol, como menciona Srinivasamurthy (2020), en su estudio describe que las personas que consumen alcohol tienen una diferencia significativa en el daño citoplasmático en comparación con personas que nunca han consumido alcohol. Estos resultados se pueden atribuir a que algunos participantes del grupo control en la encuesta de salud mencionan que beben alcohol, fuman, o consumen alguna otra sustancia tóxica.

8.2 Resultados de genotoxicidad.

Los resultados de los biomarcadores de genotoxicidad (células con brotes nucleares, células con micronúcleos y células binucleadas) muestran que el grupo control está por debajo de los valores del grupo de obesos en los tres biomarcadores considerados para determinar genotoxicidad (figura 3).

El primer biomarcador de genotoxicidad que se determinó son los brotes nucleares, estos muestran que el grupo control cuenta con 3 células con brotes nucleares por cada 1000 células contadas, mientras que el grupo de obesos cuenta con 8 células con brotes nucleares por cada 1000 células contadas. En el caso de las células con micronúcleos, se muestra que el grupo control cuenta con 2 células con micronúcleos por cada 1000 células contadas, mientras que el grupo de obesos cuenta con 7 células con micronúcleos por cada 1000 contadas. Por último, para las células binucleadas el grupo control cuenta con 3 células binucleadas por cada 1000 células contadas, mientras que el grupo de obesos cuenta con 6 células binucleadas por cada 1000 células contadas.

Dado los datos descritos previamente se puede inferir que la obesidad tiene una relación con el aumento en la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad. Esta alza es notable en los tres biomarcadores de genotoxicidad, en algunos casos esta diferencia alcanza el 100%, es decir, las frecuencias de los biomarcadores de daño genotóxico del grupo de obesos son el doble de las frecuencias encontradas en el grupo control.

De acuerdo con los datos de Thomas (2008) el grupo control de su estudio se encuentra por debajo en los valores de los 3 biomarcadores de genotoxicidad en comparación al grupo de estudio. En el siguiente gráfico (figura 3) se puede observar que el grupo control de este trabajo presenta la misma tendencia al encontrar valores en los 3 biomarcadores por debajo de los observados para el grupo de estudio. Es importante recordar que la edad en los individuos puede ser uno de los principales factores para desarrollar más células con evidencias de daño genotóxico; además, del estilo de vida, aunado a esto la condición de obesidad puede ser un factor en el aumento del daño genotóxico del grupo de estudio (obesos) comparado con el grupo control.

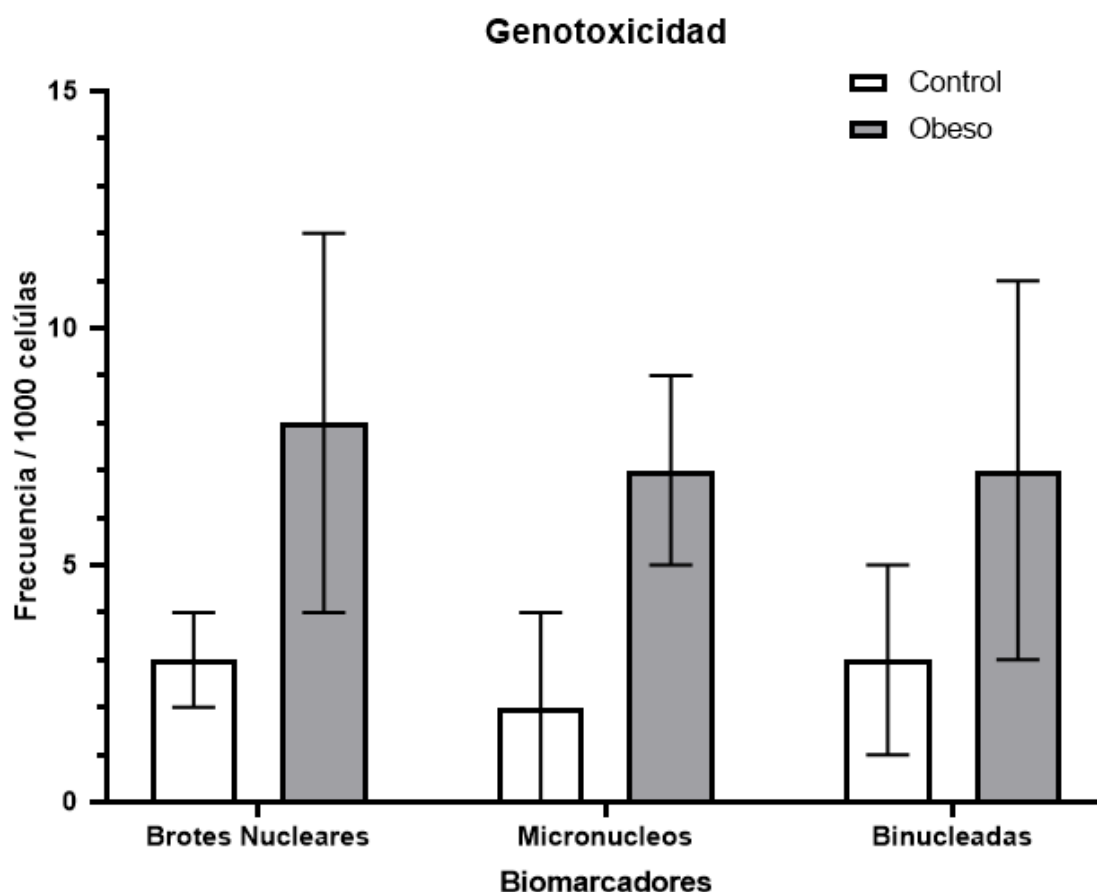


Figura 3. Biomarcadores de genotoxicidad.

Thomas (2008), en su trabajo concluye que las personas con condiciones de salud desfavorables tienen valores más altos en los biomarcadores genotóxicos en comparación con el grupo de estudio (células con micronúcleos, brotes nucleares, células binucleadas). Con base en este estudio se puede inferir que la obesidad y los cambios metabólicos que esta conlleva inducen un aumento de células genotóxicas.

De acuerdo con Donmez (2014) el aumento de células con daño genotóxico (células con brotes nucleares, células con micronúcleos, células binucleadas) se asocia al aumento del IMC. Los resultados de dicho estudio corresponden con la tendencia observada en este trabajo, por lo anterior se puede inferir que la obesidad promueve y/o aumenta el daño genotóxico.

Tabla 3. Relación de Frecuencia de células con micronúcleos e IMC.

Diagnóstico	Resultados de este estudio				Torres (2008)			
	n	Edad (años)	IMC (Kg/m ²)	CMN (1,000 células)	n	Edad (años)	IMC (Kg/m ²)	CMN (1,000 células)
Peso Normal	9	20 ± 2	23 ± 1.9	2 ± 1	21	23.3 ± 5.0	22.5 ± 1.8	1.1 ± 0.9
Adultos Obesidad I	3	35 ± 10.5	33 ± 1.9	7 ± 4	21	31.6 ± 8.9	31.7 ± 1.3	1.4 ± 0.2
Adultos Obesidad II	3	35 ± 10.5	38 ± 1.9	7 ± 1	21	30.0 ± 10.5	37.0 ± 1.1	2.1 ± 0.4
Adultos Obesidad III	3	35 ± 10.5	> 40	7 ± 1	21	29.3 ± 8.7	45.8 ± 6.4	3.0 ± 0.4

La tabla 3 muestra las edades promedio de los grupos estudiados, así como el IMC promedio y la cantidad de micronúcleos (figura 4) contados por cada 1000 células. Los datos del presente trabajo se comparan con el estudio de Torres (2008) donde evalúa a personas con obesidad. De acuerdo con los resultados se puede observar que los valores de micronúcleos son mayores en el grupo de obesos (tipo I, II y III) comparados con el grupo con peso normal en los dos estudios.

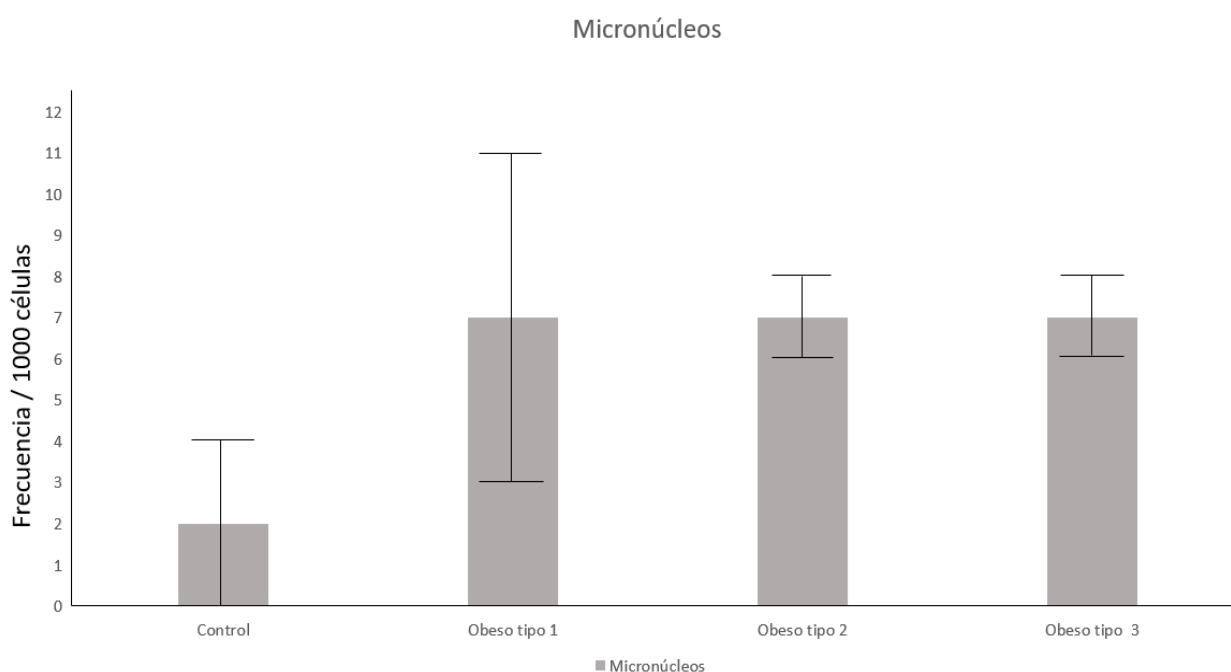


Figura 4. Frecuencia de micronúcleos.

Los resultados obtenidos indican que las personas obesas tienen mayor cantidad de micronúcleos en comparación con las personas con peso normal, esto es congruente con lo que menciona Torres (2008) en su estudio donde se observa que las personas adultas con obesidad tienen más micronúcleos. La diferencia entre los resultados obtenidos en esta investigación y los resultados del trabajo de Torres (2008) radica en que el promedio de células con micronúcleos en los 3 tipos de obesidad se mantuvo constante en este trabajo, mientras que, en el estudio de Torres se reporta que la frecuencia de micronúcleos fue aumentando en aproximadamente 1 célula por cada grado de obesidad que incrementado.

Los resultados del presente estudio coinciden con los datos dados por Alves (2012) donde menciona que las personas obesas tuvieron más micronúcleos en comparación a su grupo control con IMC normal. En los resultados del trabajo de Alves (2012) se encontró una diferencia estadísticamente significativa. De la misma manera que lo descrito anteriormente, Andreassi (2010) menciona que los niveles elevados de inestabilidad genética se relacionan fuertemente con el IMC en mujeres y con la resistencia a la insulina.

9. Conclusión.

De acuerdo con el análisis de los resultados de este trabajo se puede concluir que la obesidad es un promotor de daño genotóxico, ya que existe mayor frecuencia de células con micronúcleos en células de epitelio bucal en el grupo de obesos comparado con el grupo control. Cabe mencionar que al daño genotóxico se puede deber a más factores como estilo de vida, hábitos alimenticios, fumar tabaco o la exposición a alguna otra sustancia tóxica, es claro que hay una tendencia a encontrar una mayor frecuencia de células con daño citotóxico y genotóxico en individuos obesos en comparación con personas con peso normal.

El grupo de obesos del presente estudio no mostró diferencias significativas de daño citotóxico con respecto al grupo control, estos resultados se pueden relacionar con los datos de salud recopilados mediante encuestas realizadas a la población de estudio, en las cuales, se observa que el grupo de obesos mostró poco consumo de alcohol, tabaco y en general baja exposición a sustancias tóxicas, por lo anterior, se puede inferir que algunos de los biomarcadores de citotoxicidad muestran valores más bajos en comparación con el grupo control que presentaron mayor frecuencia de consumo de sustancia como tabaco, alcohol, entre otras sustancias potencialmente tóxicas.

Con el presente estudio se puede concluir que este ensayo de micronúcleos en epitelio bucal es útil para monitorear a individuos con potencial para desarrollar daño genotóxico y citotóxico, o bien dar un seguimiento e intervención a los individuos que tienen biomarcadores genotóxicos altos de acuerdo con los valores normales que se mencionan en la literatura.

10. Referencias

1. Olivia Torres-Bugarín, O. T. & Ramos Ibarra, M. L. (2013, 4 abril). Micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa to assess occupational risk population by mutagens. SCIELO. Recuperado 25 de noviembre de 2022, de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rcsp/v22n1/art01v22n1.pdf>
2. Donmez-Altuntas, H., Sahin, F., Bayram, F., Bitgen, N., Mert, M., Guclu, K., ... Diri, H. (2014). Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 771, 30–36. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.06.00
3. Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Holland, N., Bonassi, S., & Kirsch-Volders, M. (2020). Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 108342. doi:10.1016/j.mrrev.2020.108342
4. Andreassi, M. G., Barale, R., Iozzo, P., & Picano, E. (2010). The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis*, 26(1), 77–83. doi:10.1093/mutage/geq077
5. Padilla-Raygoza N, Del Rocio Adame Gutiérrez M, Martínez IZM, Beltran-Campos V, Del Carmen Delgado-Sandoval S, de Lourdes Garcia-Campos M, Sosa-Aquino MA, Cordova-Fraga T, Guzman-Cabrera R. Evaluation of micronuclei in oral mucosa of individuals exposed to ionizing radiation: a pilot study from Celaya, México. *Cent Asian J Glob Health*. 2019 May 10;8(1):331. doi: 10.5195/cajgh.2019.331.
6. Mrdjanović, J., Šolajić, S., Dimitrijević, S., Đan, I., Nikolić, I., & Jurišić, V. (2014). Assessment of micronuclei and sister chromatid exchange frequency in the petroleum industry workers in province of Vojvodina, Republic of Serbia. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 63–68. doi:10.1016/j.fct.2014.03.041
7. Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T., & Fenech, M. (2008). The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 638(1-2), 37–47. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.08.012

8. Kompella, P., & Vasquez, K. M. (2019). Obesity and cancer: A mechanistic overview of metabolic changes in obesity that impact genetic instability. *Molecular Carcinogenesis*. doi:10.1002/mc.23048
9. Torres Bugarín, O. & Torres Mendoza, B. M. G. (2008). GENOTOXICIDAD ASOCIADA AL ÍNDICE DE MASA CORPORAL, EVALUADA POR MEDIO DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN MUCOSA BUCAL. CUCBA. Recuperado 11 de octubre de 2022, de [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otrasinstituciones/TorresBugarinOlivia\(pp701-706\)/701-706.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otrasinstituciones/TorresBugarinOlivia(pp701-706)/701-706.pdf)
10. ¿Qué es la genotoxicidad? (2008, 20 agosto). IntraMed. <https://www.intramed.net/contenido.asp?contenido=47111>
11. Citotoxicidad. (s. f.). FAT Fundación Argentina Del Tórax. Recuperado 23 de octubre de 2022, de <https://www.fundaciontorax.org.ar/page/index.php/pacientes/diccionario/1022-citotoxicidad>
12. Diniz Freitas, M., García García, A., Crespo Abelleira, A., Martins Carneiro, J. L. & Gándara Rey, J. M. (2004, 31 enero). Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. SCIELO. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-44472004000400014#:~:text=La%20utilizaci%C3%B3n%20de%20la%20citolog%C3%ADa%20en%20sus%20estadios%20m%C3%A1s%20precoces.
13. Guo J, Hecht SS. DNA damage in human oral cells induced by use of e-cigarettes. *Drug Test Anal*. 2022 Sep 28. doi: 10.1002/dta.3375.
14. Anguiano-Vega, G. A., Cazares-Ramirez, L. H., Rendon-Von Osten, J., Santillan-Sidon, A. P., & Vazquez-Boucard, C. G. (2020). Risk of genotoxic damage in schoolchildren exposed to organochloride pesticides. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74620-w>
15. Kotova, N., Vare, D., Schultz, N., Gradecka Meesters, D., Stepnik, M., Grawe, J., ... Jenssen, D. (2012). Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair. *Carcinogenesis*, 34(2), 325–330. doi:10.1093/carcin/bgs340
16. Di Sarno R, Brigida A, Caprio GG, Ciardiello D, Dallio M, Sangineto M, Fagoonee S, Abenavoli L, Luzzza F, Gravina AG, De Magistris L, Federico A, Loguercio C. Critical review on the use and abuse of alcohol. When the dose

- makes the difference. Minerva Med. 2020 Aug;111(4):344-353. doi: 10.23736/S0026-4806.20.06584-2.
17. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-008-SSA3-2010, PARA EL TRATAMIENTO INTEGRAL DEL SOBREPESO Y LA OBESIDAD. (2010, julio). DOF. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4127/Salud/Salud.htm#:~:text=Esta%20Norma%20Oficial%20Mexicana%20establece,del%20sobrepeso%20y%20la%20obesidad.>
18. Indicadores de sobrepeso y obesidad. (2016, 14 julio). GOBIERNO DE MEXICO. <https://www.gob.mx/salud/articulos/indicadores-de-sobrepeso-y-obesidad?idiom=es>
19. Obesidad y sobrepeso. (2021, 9 junio). World Health Organization. Recuperado 5 de octubre de 2022, de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#:~:text=Datos%20sobre%20el%20sobrepeso%20y%20la%20obesidad&text=En%202016%2C%20el%2039%25%20de%20los%20adultos%20de%2018%20o,de%20las%20mujeres\)%20eran%20obesos.](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#:~:text=Datos%20sobre%20el%20sobrepeso%20y%20la%20obesidad&text=En%202016%2C%20el%2039%25%20de%20los%20adultos%20de%2018%20o,de%20las%20mujeres)%20eran%20obesos.)
20. Rivera Dommarco Ja, Colchero MA, Fuentes ML, González de Cosío Martínez T, Aguilar Salinas CA, Hernández Licon G, Barquera S (eds.). La obesidad en México. Estado de la política pública y recomendaciones para su prevención y control. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, 2018.
21. Diabetes. (s. f.). OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/diabetes>
22. Hipertensión. (2021, 25 agosto). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
23. El sedentarismo, un peligro silencioso. (2021, 18 enero). GACETA UNAM. <https://www.gaceta.unam.mx/el-sedentarismo-un-peligro-silencioso/#:~:text=Las%20personas%20f%C3%ADsicamente%20inactivas%20y,movilidad%20en%20sus%20h%C3%A1bitos%20cotidianos>
24. Sedentarismo afecta al 58.3 por ciento de los mexicanos mayores de 18 años. (2019, 5 abril). GOBIERNO DE MEXICO. <https://www.gob.mx/issste/prensa/sedentarismo-afecta-al-58-3-por-ciento-de-los-mexicanos-mayores-de-18-anos?idiom=es>

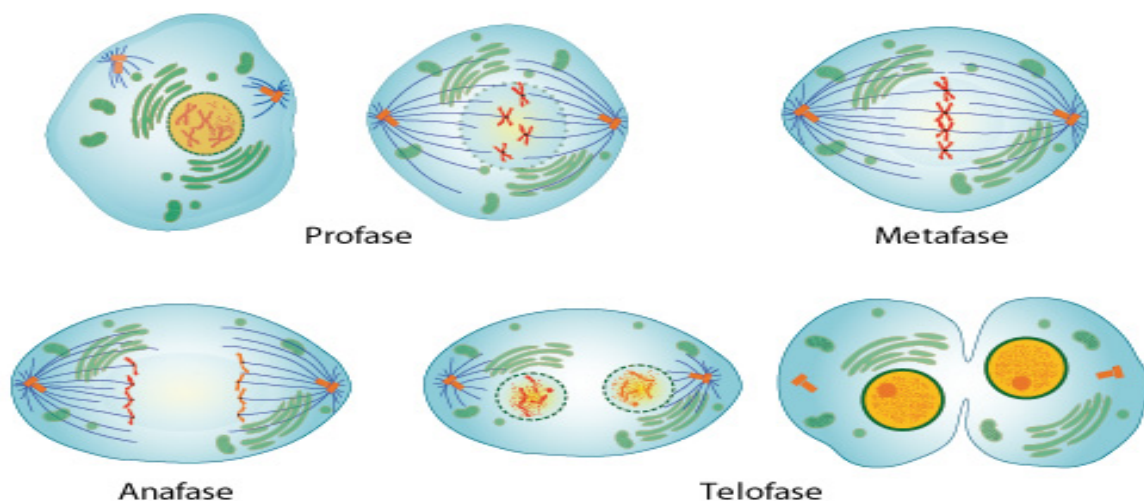
25. Troyo-Barriga, P. (2004). Obesidad y dislipidemias. *Gaceta Medica México*, 140(2), 49-58.
26. Gilchrist, D. A. (2022, 10 mayo). MITOSIS. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mitosis>
27. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., ... Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4(6), 825–837. doi:10.1038/nprot.2009.53
28. Megías, M. P. M. (s. f.-a). Técnicas Hitológicas. 2. Fijadores. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Recuperado 7 de noviembre de 2022, de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-fijadores.php>
29. Gil, Marielsa. (5 de agosto de 2019). Orceína: fundamento y preparación. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/orceina/>.
30. Megías, M. P. M. (s. f.). Técnicas Hitológicas. Protocolos. Colorante, Verde luz, rápido. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Recuperado 7 de noviembre de 2022, de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/s-colorante-verde.php>
31. Keyser BM. Cytotoxicity, oxidative stress, and inflammatory response of smokeless tobacco extracts and cytotoxicity of combustible cigarette whole smoke in a 3D oral organotypic buccal cell model. *Toxicol Mech Methods*. 2022 Jun;32(5):352-361. doi: 10.1080/15376516.2021.2009949.
32. Nersesyan, A., Kundi, M., Atefie, K., Schulte-Hermann, R., & Knasmüller, S. (2006, 11 octubre). Effect of Staining Procedures on the Results of Micronucleus Assays with Exfoliated Oral Mucosa Cells. *American Association for Cancer Research*. <https://aacrjournals.org/cebp/article/15/10/1835/260728/Effect-of-Staining-Procedures-on-the-Results-of>
33. Srinivasamurthy BC, Balamurugesan K, Sathishkumar N, Prakash M, Bhat RV. Cytomorphometric Study of Changes in Buccal Mucosal Cells in Alcoholics. *Adv Biomed Res*. 2020 Sep 30;9:48. doi: 10.4103/abr.abr_92_20.

11. Anexos

Anexo 1. Valores del colesterol en sangre.

Tipo de colesterol	Valor
Colesterol total	125-200 mg/dL
Colesterol no DHL	< 130 mg/dL
Colesterol LDL	< 100 mg/dL
Colesterol HDL	> 40 mg/dL

Anexo 2. Ilustración de la mitosis.



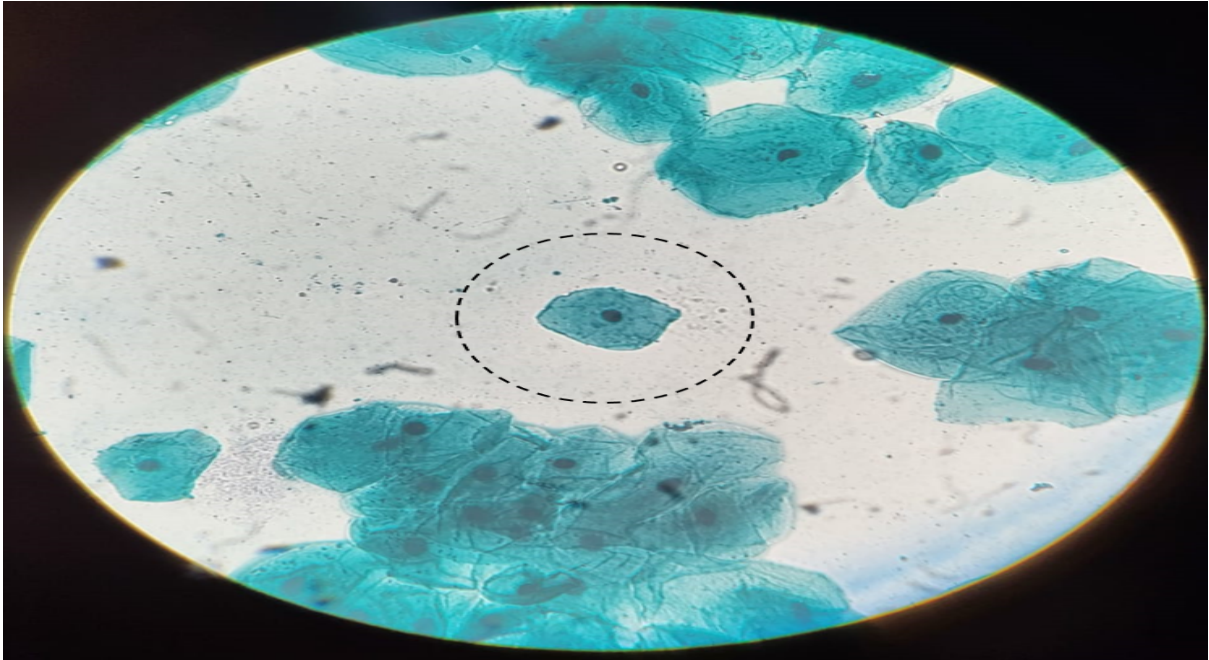
Anexo 3. Variables para considerar en estudio de células de epitelio bucal

Variables importantes a registrar cuando se utiliza el ensayo de citología exfoliativa en estudios epidemiológicos.

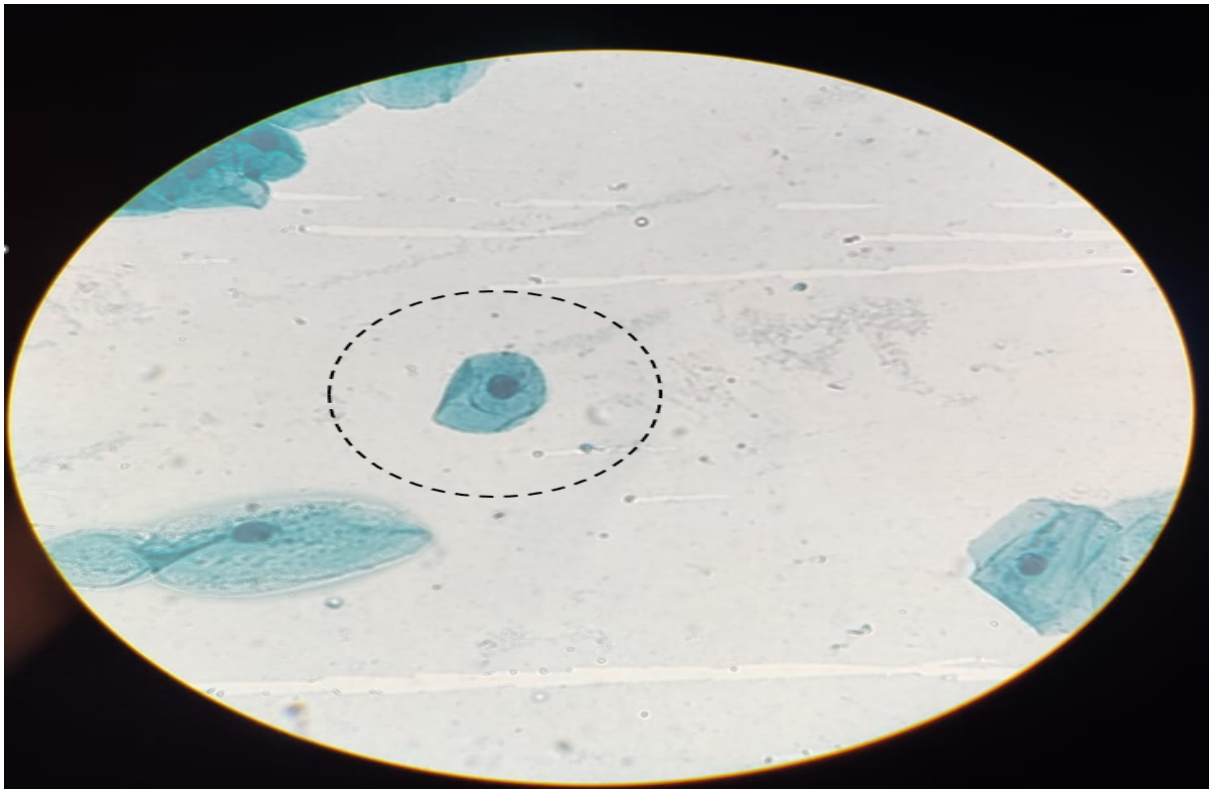
- Fecha de nacimiento
- Género
- Índice de masa corporal
- Tabaquismo

- *Estado e historial de consumo de alcohol*
- *Antecedentes de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas*
- *Medicamentos o enfermedad reciente (antecedentes de enfermedad)*
- *Hábitos alimentarios medidos mediante un cuestionario de frecuencia de alimentos validado*
- *Exposición a carcinógenos químicos y radiación, por ejemplo, rayos X*

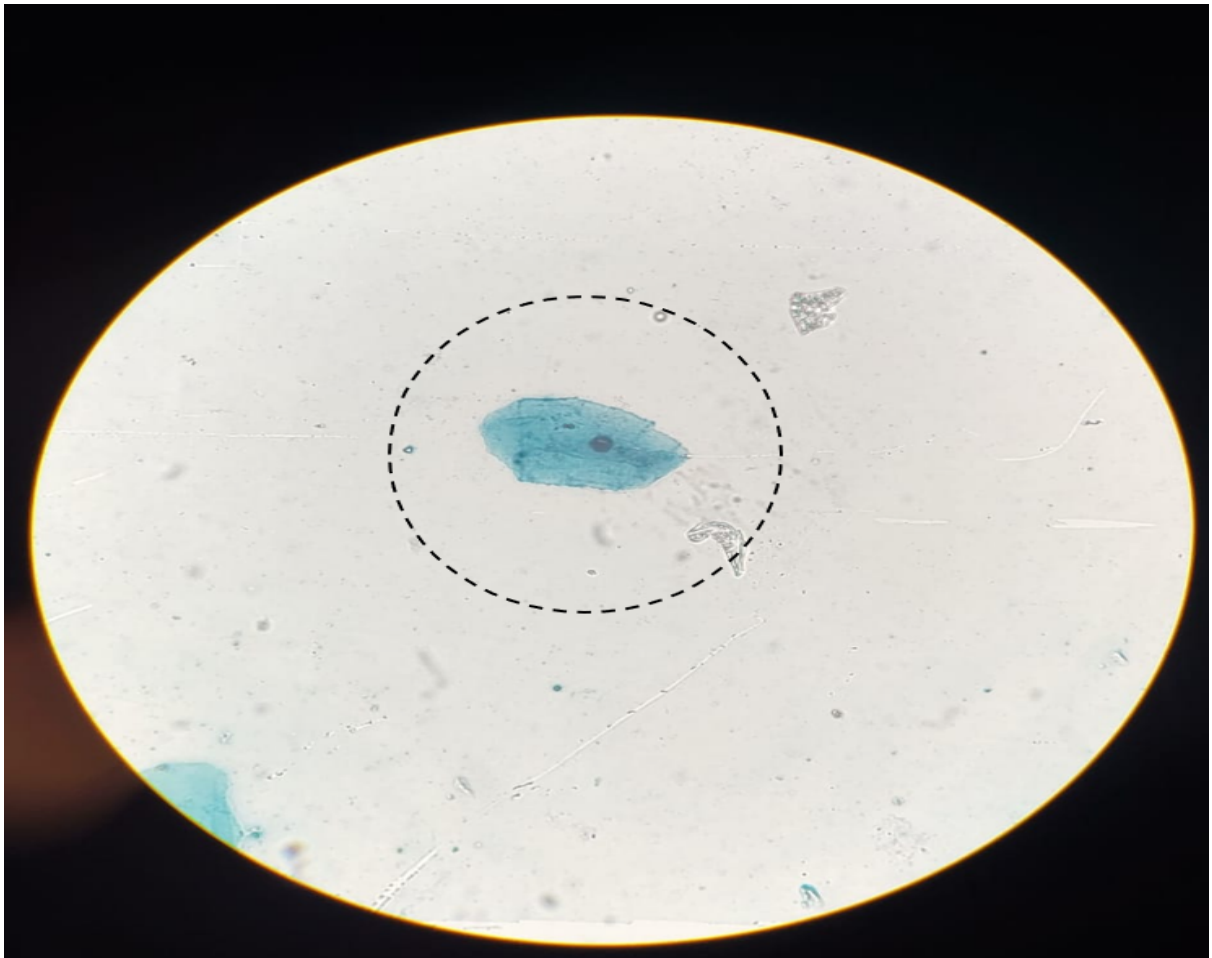
Anexo 4. Se muestra micrografía a 40X de una célula diferenciada.



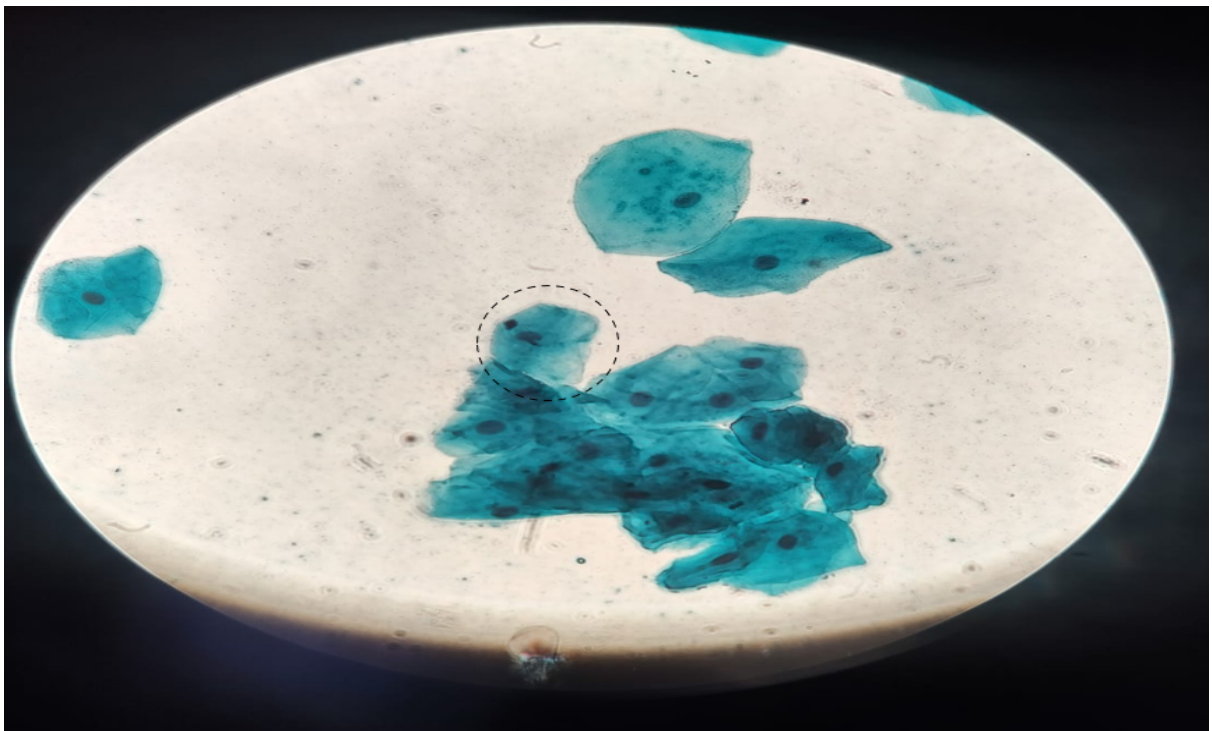
Anexo 5. Se muestra micrografía a 40X de una célula no diferenciada



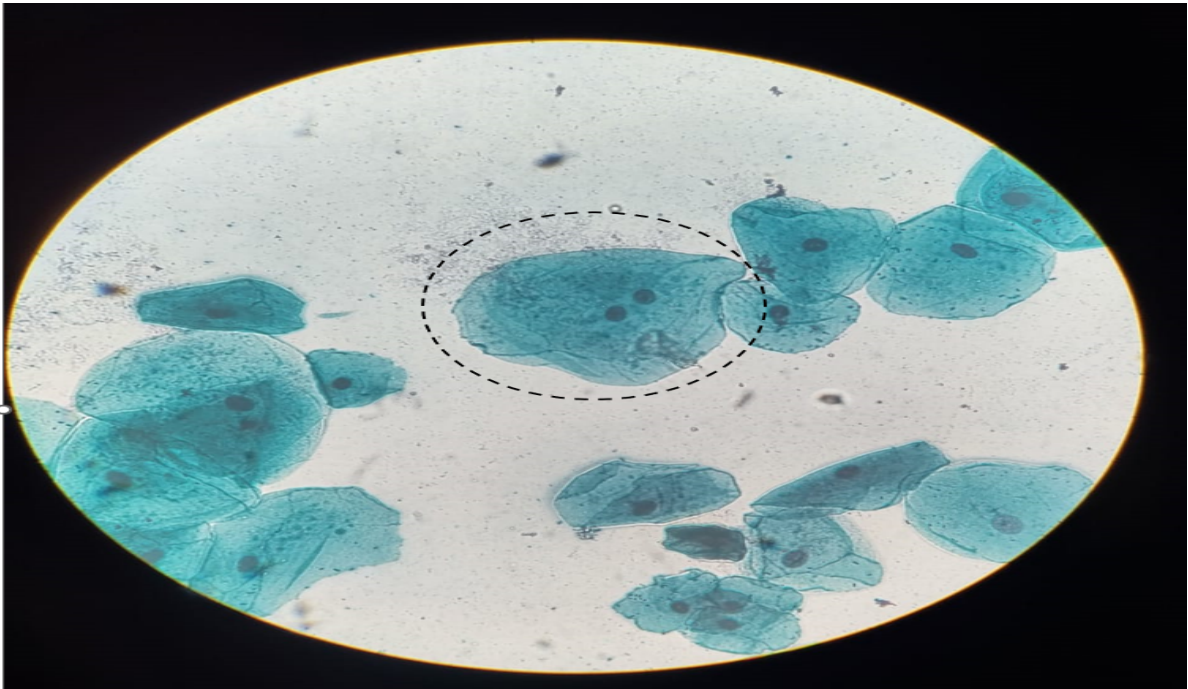
Anexo 6. Se muestra micrografía a 40X de una célula con micronúcleos



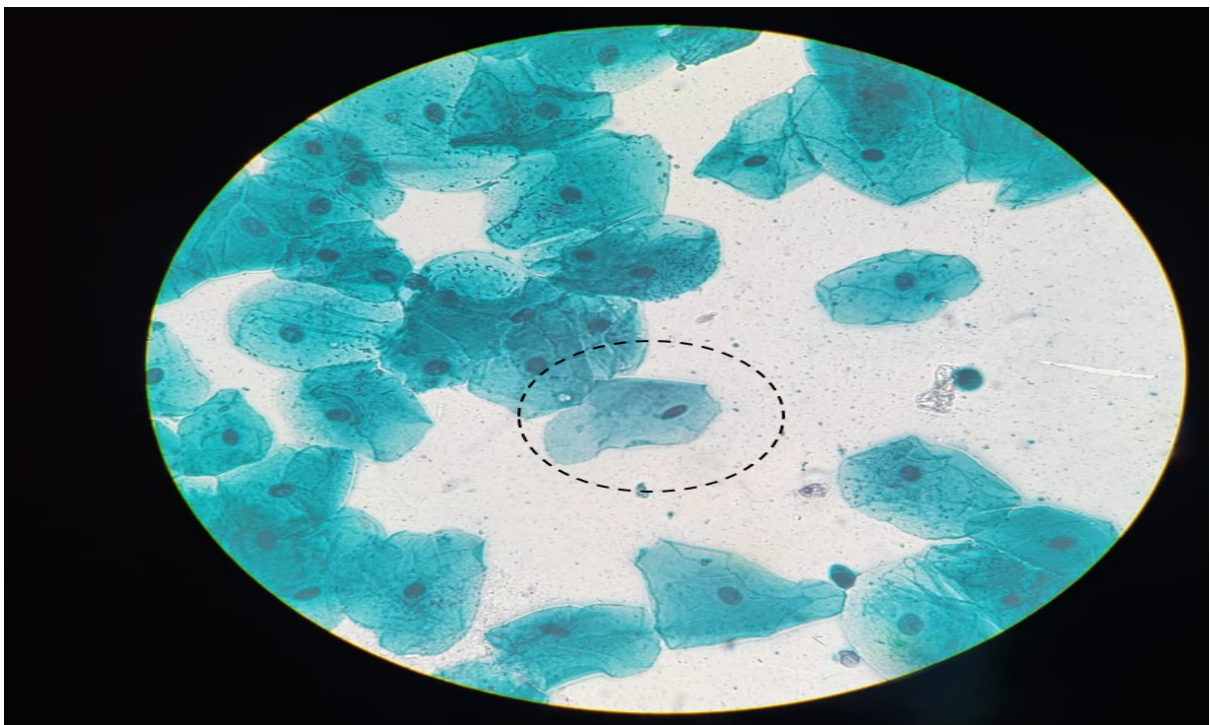
Anexo 7. Se muestra micrografía de célula con Brote Nuclear



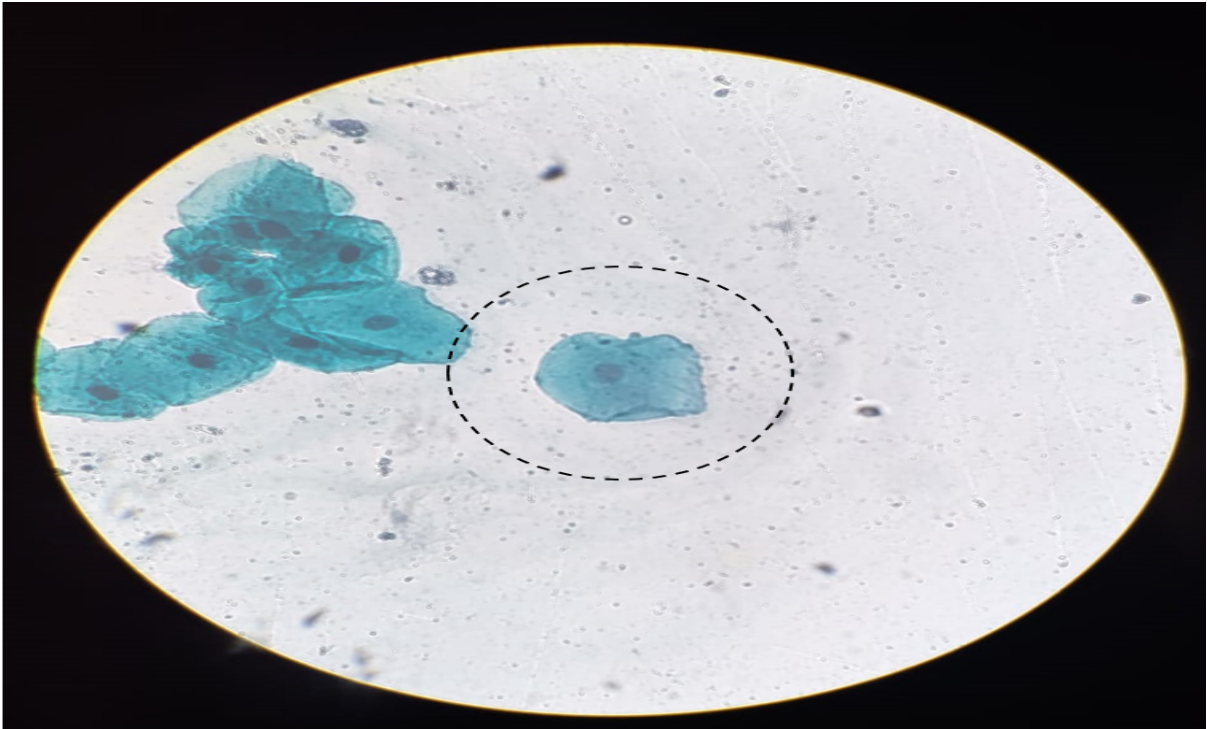
Anexo 8. Se muestra micrografía a 40X de una célula binucleada.



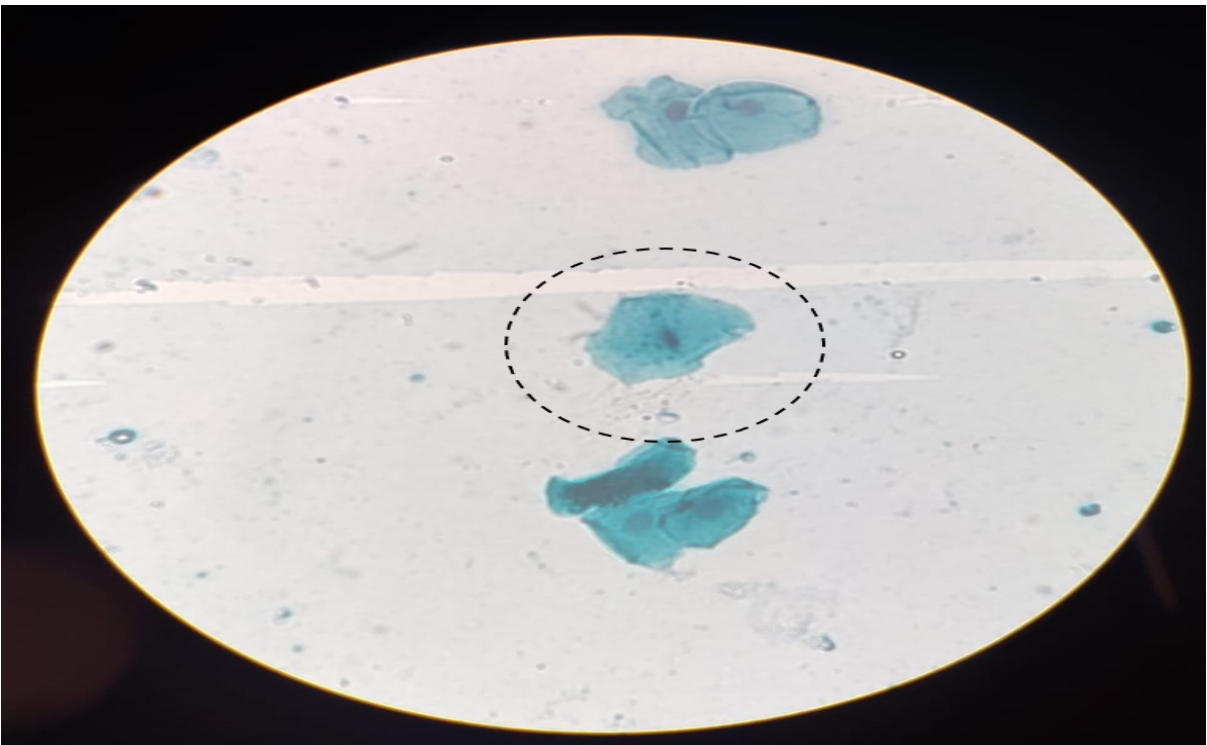
Anexo 9. Se muestra micrografía a 40X de una célula con Cromatina condensada



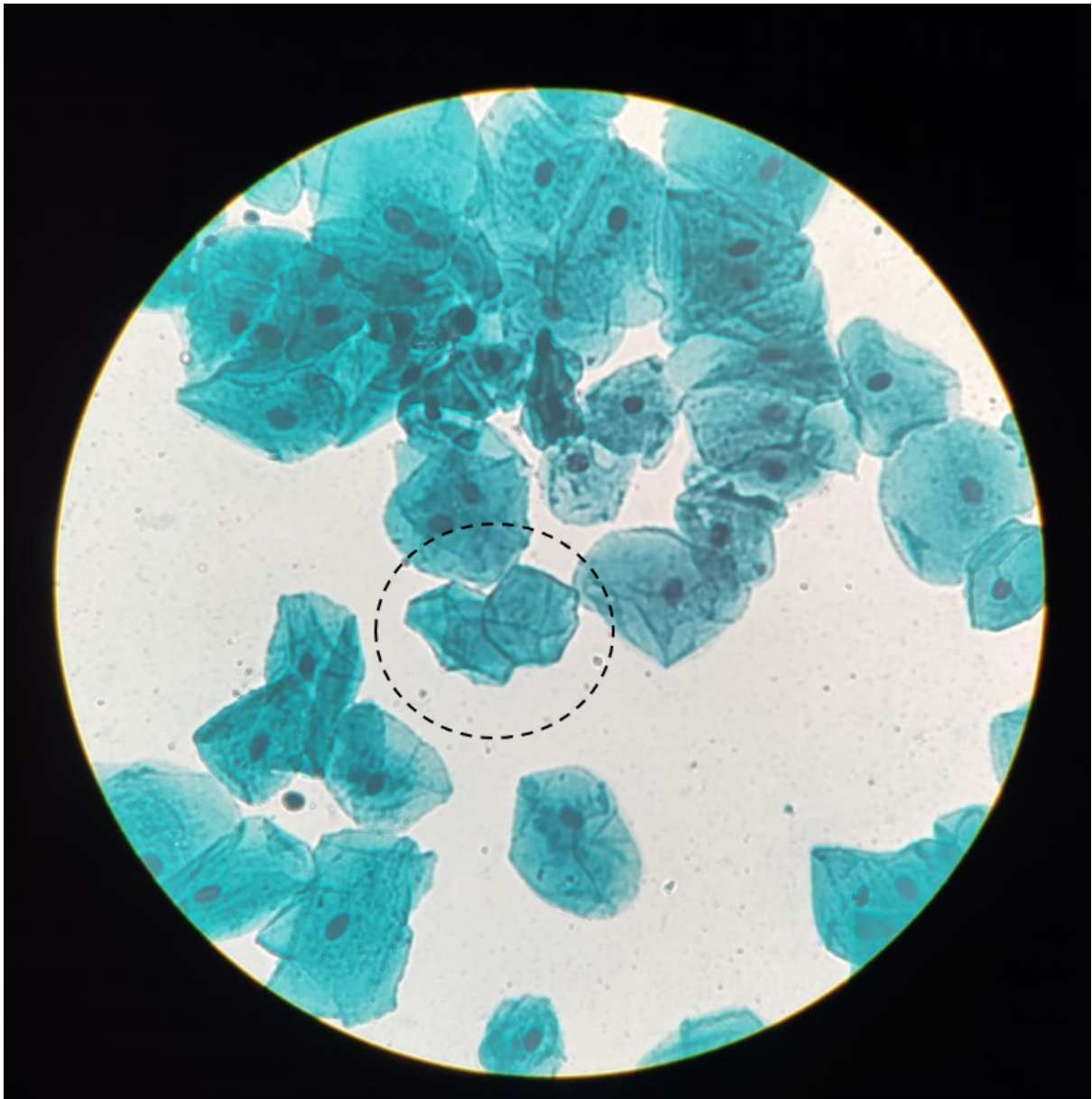
Anexo 10. Se muestra micrografía a 40X de una célula en Cariorrexis



Anexo 11. Se muestra micrografía a 40X de una célula Picnótica



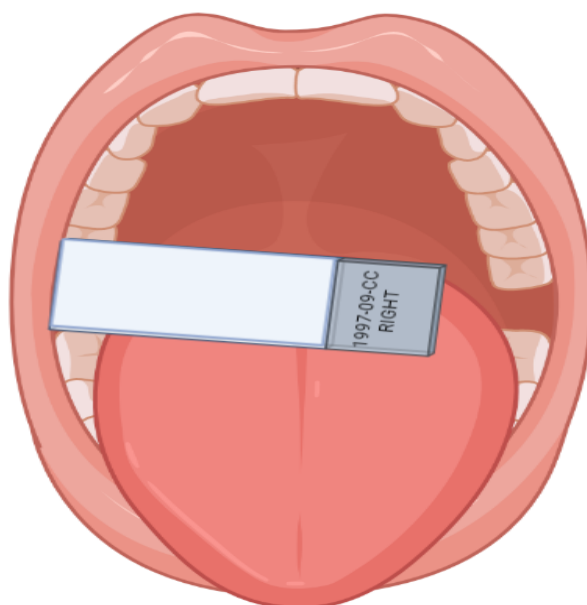
Anexo 12. Se muestra micrografía a 40X de una célula Cariolítica



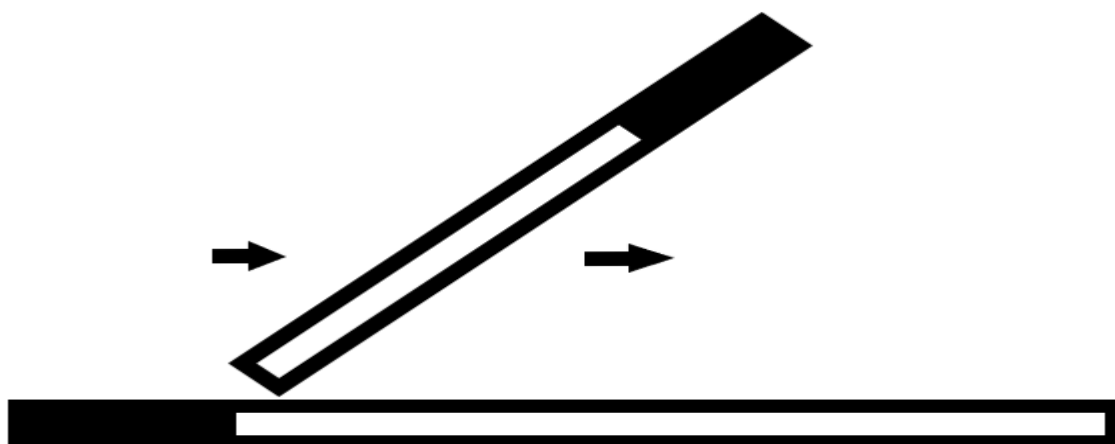
Anexo 13. Ejemplo de laminilla rotulada



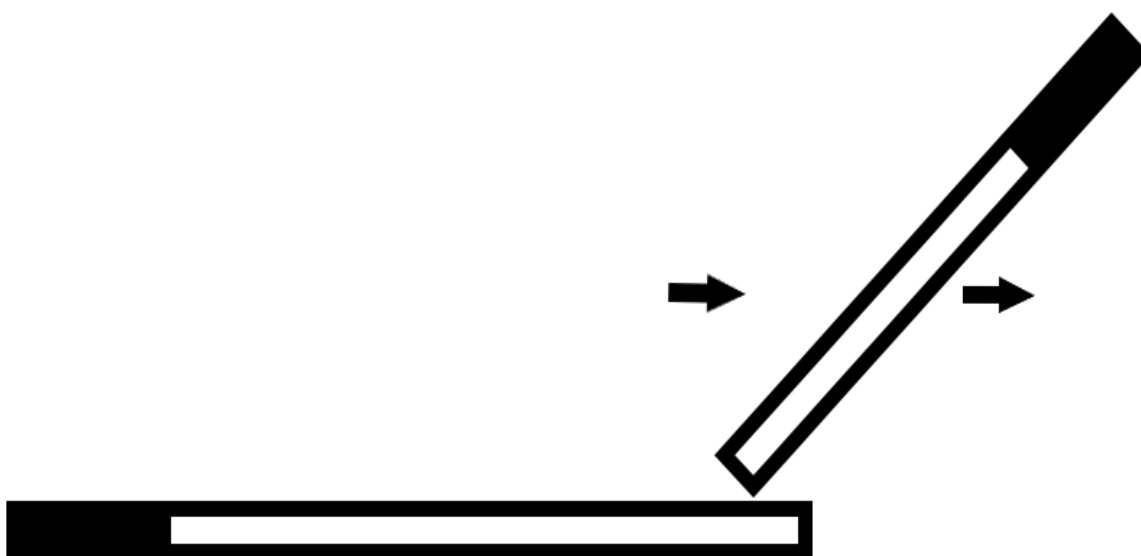
Anexo 14. se muestra ilustración de inicio de barrido de laminilla



Anexo 15. se muestra simulación de toma de muestra



Anexo 16. Se muestra ilustración de terminado de barrido de laminilla



Anexo 17. Se muestra ilustración de laminilla con muestra



Anexo 18. Se muestra figura de cubeta de tinción



Anexo 19. Se muestra figura de lavado de muestras teñidas con orceína



Anexo 20. Se muestra figura de lavado de muestras teñidas con verde rápido



Anexo 21. Se muestra formato de conteo de células

Fecha:

[illegible]

Anexo 22

Relación de Frecuencia de Células Micronucleadas con IMC

Diagnóstico	n	Edad (años)	IMC (Kg/m²)	CMN (1,000 células)
Peso Normal	21	23.3 ±5.0	22.5 ± 1.8	1.1 ± 0.9
Anorexia Nerviosa	10	18,0 ± 4,2	15,8 ± 1,9	3.4 ± 1.5
Bulimia Nerviosa	7	20,71 ± 3,9	19,3 ± 1,6	4.1 ± 2.2
Adultos Sobrepeso	22	26.9±8.4	27.4 ± 1.6	1.5 ± 0.2
Adultos Obesidad I	21	31.6 ± 8.9	31.7 ± 1.3	1.4 ± 0.2
Adultos Obesidad II	21	30.0±10.5	37.0 ± 1.1	2.1 ± 0.4
Adultos Obesidad III	21	29.3 ± 8.7	45.8 ± 6.4	3.0 ± 0.4
Niños Peso Normal	20	9.06 ± 0.91	16.3 ± 0.98	0.3 ± 0.6
Niños Desnutrición Leve	20	8.6 ± 1.2	14.4 ± 0.03	3.3 ± 3.9
Niños Desnutrición Moderada	20	8.9 ± 1.4	13.46 ± 0.01	6.1 ± 5.1
Niños Sobrepeso	20	9.01 ± 1.24	18.4 ± 1.1	0.5 ± 0.7
Niños Obesidad	20	8.81 ± 1.24	22.5 ± 2.6	0.2 ± 0.5

n=Tamaño de muestra, IMC= Índice de masa corporal, CMN= Células Micronúcleadas, los datos están expresados en 1000 células,

media y desviación estándar.

Tinciones

orceína

La orceína por su propiedades fisicoquímicas posee una carga positiva lo que lo hace selectiva al ADN que posee una carga negativa que es el grupo fosfato. Por esta tinción, los cromosomas se tiñen de color morado [29]

Formulación de Orceína Acética:

- Calentar Ácido Acético a punto de ebullición (30 ml)
- Agregar orceína (1 g)
- Se deja enfriar y se añade agua estéril (20 ml)
- Se filtra para la limpieza total de la formulación.

Estructura química de la orceína:

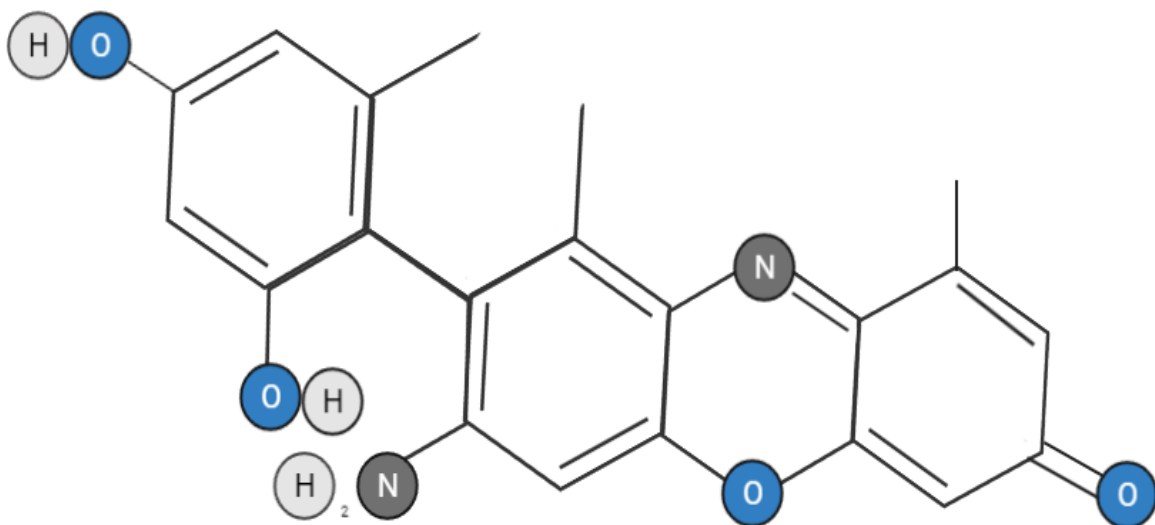


Figura 20. Estructura química de la orceína

Verde rápido

El verde rápido tiene una afinidad de unión por las paredes celulares. Se une a los tejidos conectivos tiñéndose de verde. El verde rápido posee una carga negativa [30].

Formulación del Verde Rápido:

- 0.2 g en 100 mL de agua destilada
- Agregar 0.2 mL de Ácido Acético

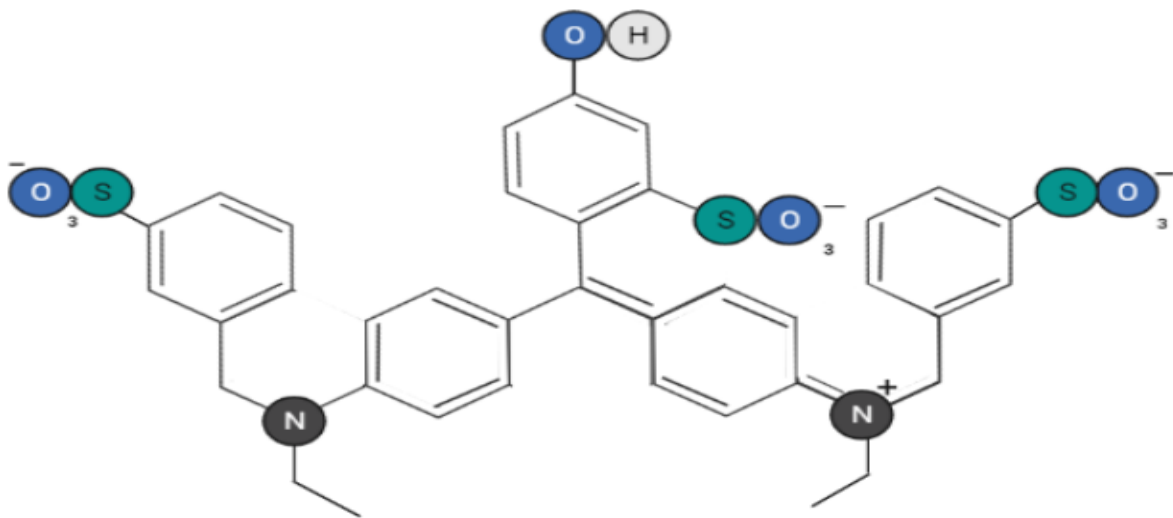


Figura 21. Estructura química de Verde Rápido