

Alteraciones citogenéticas bucoepiteliales

en pacientes portadores de leucoplasia

Palabras clave: Leucoplasia, células bucoepiteliales, micronúcleo, atipias nucleares, hábitos tóxicos.

Key words: Leukoplakia, oral cells, micronucleus, nuclear atypia, toxic habits.

Deyanira Carnesoltas-Lázaro,* Aníbal Domínguez-Odio,** Ana Iris Frías-Vázquez,*** Carlos Manuel Dutok-Sánchez,**** Gilda García-Heredia*****

* Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Investigador Agregado, MCs.

** Jefe del Laboratorio de Genética Toxicológica. Centro de Toxicología y Biomedicina. Profesor Asociado a la Universidad de Oriente e Investigador Agregado.

*** Laboratorio de Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Investigador Agregado, MCs.

**** Laboratorio de Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.

***** Servicio de Cabeza y Cuello, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. Especialista de 1^{er} grado en Estomatología.

Correspondencia:

Deyanira Carnesoltas-Lázaro

Laboratorio de Biología Molecular,

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología.

29 y E, Vedado, 10400, Ciudad de la Habana, Cuba

E-mail: deya@infomed.sld.cu; anibalodio@yahoo.com

104

Recibido: 16/02/2007.
Aceptado: 22/03/2007.

Resumen

La leucoplasia es la lesión precancerosa más común de la mucosa oral, siendo variados los factores que promueven su desarrollo. Considerando estos antecedentes, el objetivo de nuestro trabajo fue identificar y cuantificar las alteraciones citogenéticas (micronúcleos) y atipias nucleares (binucleación, cariorrexis, cromatina condensada y kariólisis) en células bucoepiteliales recolectadas de individuos portadores y no portadores de leucoplasia, y evaluar su posible relación con factores exógenos (estilo de vida). Se llevó a cabo un estudio caso-control con 43 sujetos adultos, con edades entre 23 y 75 años, distribuidos en dos grupos, portadores y no portadores de la lesión. Éstos fueron encuestados para determinar aspectos personales como consumo de cigarrillos y bebidas alcohólicas, así como ingestión de vegetales y frutas. Los resultados obtenidos sugieren que en nuestras condiciones existe en los portadores un incremento de atipias nucleares

Abstract

Leukoplakia is the most common precancerous lesion in oral mucous, but exist many factors that promote their development. The objective of our work was identify and quantify the cytogenetics alterations (micronucleus) and nuclear atypia (binucleation, karyorrhexis, condensed chromatin and karyolysis) in oral cells collected of subjects health and with leukoplakia, and to evaluate their possible relation with exogenous factors (life style). We carry out a case-control study with 43 adults subjects, with a range of 23-75 years old, distributed in two groups, healthy and no healthy subjects. They were asked to determine personal aspects like cigars and alcoholic drink consume and vegetables and fruits consumption. The results suggest that in our study group exist in the subjects with the lesion, a significative increase of nuclear atypia, but low frequency of micronucleus. We determine that sex and age are not important endogen factors in the

significativamente superior, en comparación con los no portadores y bajas frecuencias de aparición de micronúcleos. Se determinó que el sexo y la edad no constituyen factores endógenos importantes ni en el proceso de premalignización, ni en las alteraciones en las frecuencias de aparición de micronúcleos y atipias nucleares, no ocurriendo así con el hábito de fumar o de consumir bebidas alcohólicas.

Introducción

La leucoplasia es la lesión precancerosa más común de la mucosa oral, descrita por vez primera por Schwimmer en 1877.¹ Esta patología representa cerca de 85% de las lesiones orales con capacidad de transformación maligna² y se diagnostica más frecuentemente a partir de la cuarta década de la vida, siendo las localizaciones más comunes el bermellón del labio, la mucosa yugal y la encía.³

Muchos son los factores exógenos capaces de promover el desarrollo de lesiones premalignas,³⁻⁶ aunque en el caso de la leucoplasia, su etiología aún permanece sin precisarse con exactitud. No obstante, se ha planteado que el tabaco parece ser el mayor inductor de las lesiones leucoplásicas.⁷ Por otro lado, numerosos autores han asociado la aparición de la leucoplasia a diversos factores como: consumo de nuez de Areca,⁸ presencia de *Candida albicans* en la cavidad bucal, incorrecta higiene bucal,⁹ dieta inadecuada y deficiente en vitaminas A y C, factores genéticos¹⁰ y consumo de alcohol.¹¹

El diagnóstico clínico de esta lesión se realiza básicamente por exclusión de otras lesiones blancas de la mucosa oral, sin ser definitorio por sus propias características macroscópicas. Es por ello que se requiere para el diagnóstico conclusivo una valoración de las características clínicas conjuntamente con su correlación histopatológica. El estudio anatomopatológico es absolutamente necesario y es una guía vital la estrategia terapéutica posterior (radioterapia) en caso de la aparición, en el sitio de la lesión, de una displasia o de células de carcinoma espinocelular.¹²

pre-malignant process, neither in alterations in frequency of micronucleus and nuclear atypia, but it was different with the tobacco habit and alcoholic drink factors.

En el mundo existe la tendencia generalizada de realizar exámenes citológicos exfoliativos regulares con el fin de recopilar evidencias que permitan prever el desarrollo de enfermedades malignas. El empleo de estos métodos favorece el descubrimiento e identificación de transformaciones celulares en estadios preneoplásicos y/o neoplasias en etapas tempranas.¹² Bajo estas condiciones, el ensayo de la morfología de las células bucoepiteliales desempeña un importante papel en el seguimiento de poblaciones humanas, expuestas ambiental y ocupacionalmente a agentes inductores de daños genéticos.¹³

En Cuba existen muy pocos estudios publicados con relación a las alteraciones celulares de la mucosa bucal. Los existentes versan sobre el efecto desestabilizador de algunos productos químicos presentes en algunos puestos de trabajo.¹⁴⁻¹⁶ En tal sentido, este es el primer intento por caracterizar los eventos citogenotóxicos que ocurren en la lesión leucoplásica. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro trabajo tuvo como objetivo estudiar las alteraciones citogenéticas (micronúcleos y atipias nucleares) de las células bucoepiteliales de individuos portadores de leucoplasia y su relación con factores endógenos y exógenos.

Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio caso control con un total de 43 sujetos adultos, con edades comprendidas entre 23 y 75 años, no portadores y portadores de leucoplasia, los cuales fueron distribuidos a conveniencia según diagnóstico y sexo. A través de una entrevista directa con los participantes se indagó

sobre aspectos referentes a estilos de vida, en los cuales se incluyeron diversos aspectos como el consumo de cigarros, el consumo regular de bebidas alcohólicas y la ingestión en la dieta de frutas y vegetales (*cuadro I*). La manipulación de las células bucoepiteliales, así como el diseño de la encuesta, se realizaron cumpliendo todos los procedimientos normados de trabajo estipulados en cada caso, y las normas éticas establecidas por la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología.

Como criterio de inclusión, se exigió que los integrantes de los grupos de estudio presentaran los siguientes antecedentes.

- No haber padecido infecciones virales o bacterianas recientemente, en las últimas cuatro semanas.
- No haber recibido radiaciones de cara y cuello en los últimos 3 meses antes del estudio.
- Haber respondido íntegramente el cuestionario.

Luego de un enjuague vigoroso de la cavidad bucal, se realizó el raspado en la parte interna de las mejillas, con aplicadores de madera en el grupo control y sobre la lesión en el grupo de los portadores. Las células exfoliadas se depositaron en tubos de ensayos que contenían 3 mL de solución salina (0.9%). Después, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, para finalmente añadir 3 mL de solución fijadora (metanol-ácido acético 3:1) por 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se efectuó el goteo del material en suspensión en láminas secas, previamente embebidas en etanol al 96%; se dejó secar al aire y se tiñó con Giemsa al 5%. Luego se procedió al análisis de micronúcleos (MN) y atipias nucleares (binucleación, picnosis, cromatina condensada, cariólisis y cariorrexis). El análisis microscópico se realizó por un mismo investigador, que desconocía el grupo a que pertenecían las muestras. Se observó un mínimo de 2,000 células consecutivas por individuo. Cuando la frecuencia de micronúcleos fue menor de 3/1,000 se evaluó un máximo de 3,000 células para disminuir la probabilidad de que el no encontrar micronúcleos, se debiera a un evento azaroso.

Estudio genético

Ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral humana.

Cuadro I. Hábitos de vida de los individuos portadores y no portadores de leucoplasia.

Hábito	No portadores de leucoplasia			Portadores de leucoplasia			Total
	Mujeres	Hombres	%	Mujeres	Hombres	%	
N	11	17	100	6	9	100	43
Consumo cigarros y/o tabacos							
Fumar Por menos de 15 años	2	4	21.43	2	2	26.70	10
Por más de 15 años	1	5	21.43	4	6	66.70	16
No fumar	8	8	57.14	0	1	6.66	17
Consumo de bebidas alcohólicas							
Beber Por menos de 15 años	2	9	39.28	1	2	20.00	14
Por más de 15 años	1	5	21.43	3	4	46.70	13
No beber	8	3	39.28	2	3	33.30	16
Consumo de vegetales y frutas							
Consumir	11	17	100.00	6	9	100.00	43
No consumir	0	0	0	0	0	0	0

Procesamiento estadístico

A todas las variables consignadas (frecuencia de aparición de MN y atipias nucleares) se les comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett. Se calculó la frecuencia de aparición de micronúcleos y de atipias nucleares en un mínimo de 2,000 células consecutivas por individuo, obteniéndose los promedios y las desviaciones estándar. Estos indicadores de genotoxicidad y citotoxicidad fueron analizados por la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney ($p < 0.05$ y $p < 0.005$). Finalmente, se relacionaron el sexo y la edad (variables independientes) con la frecuencia de aparición de micronúcleos (variable dependiente).

Resultados y discusión

La potencialidad que presenta la leucoplasia para transformarse en una lesión maligna constituye un incentivo para la búsqueda de metodologías y marcadores diagnósticos que permitan frenar a tiempo su evolución hacia la malignización. El ensayo de micronúcleos brindó la posibilidad de realizar un estudio citogenético integral del epitelio bucal, pues abarcó la identificación de posibles eventos genotóxicos (micronúcleos) y de alteraciones de la dinámica de recambio celular epitelial, teniendo en cuenta para ello las alteraciones en los procesos de regeneración y apoptosis.

En el contexto experimental anteriormente descrito se comprobó que los valores tanto de micronúcleos, como de atipias nucleares en ambos sexos, portadores y no portadores de leucoplasia, no difieren significativamente entre sí, lo cual corrobora que el sexo no constituye un factor endógeno importante en la inducción de micronúcleos y de atipias nucleares. Igualmente se demostró, tanto para el grupo de portadores como de no portadores de la lesión, que la frecuencia de aparición de micronúcleos en células

bucoepiteliales humanas no guarda una relación de dependencia respecto a la edad ($R^2 = 0.0236$; $R^2 = 0.006$ respectivamente), y ello está en correspondencia con otros estudios publicados internacionalmente en poblaciones sanas.^{4,17} En consecuencia, el análisis conjunto de sus respectivas frecuencias no afecta la interpretación de los resultados.

Contrario a lo esperado, los grupos portadores y no portadores de leucoplasia presentan un índice de genotoxicidad similares (figura 1). Este hecho puede estar asociado al éxito de toda la maquinaria reparadora de los individuos participantes en el estudio y que provocan la disminución de la probabilidad de aparición de altas frecuencias de micronúcleos en las células bucoepiteliales. Otro factor importante a considerar en este caso es el consumo de frutas y vegetales. Estos componentes de la dieta poseen altos niveles vitamínicos, como las vitaminas A, C, del complejo B y otros componentes, los cuales inhiben los procesos genotóxicos.¹⁸

Desde el punto de vista de la dinámica epitelial, se observó que en sujetos de ambos sexos portadores de leucoplasia, el total de atipias nucleares (figura 2) y en especial la correspondiente a cariólisis, cariorrexis y cromatina condensada, presentaban un incremento estadísticamente significativo de su frecuencia de aparición, si lo com-

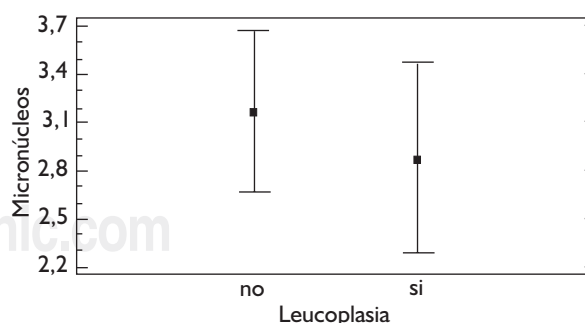


Figura 1. Valores medios y error estándar de la frecuencia de aparición de micronúcleos en individuos controles y portadores de leucoplasia.

paramos con los sujetos no portadores (*cuadro II*). Estos resultados indican que tanto en mujeres como en hombres con leucoplasia los eventos que participan en el proceso de muerte celular programada se encuentran estimulados.

Estos altos valores de incremento en las atipias nucleares conjuntamente con las bajas frecuencias de aparición de micronúcleos en el grupo de los portadores de leucoplasia indican que la homeostasis de la dinámica del epitelio se mantiene a expensas del incremento de los eventos apoptóticos. Este comportamiento garantiza la rápida eliminación de las células con aberraciones cromosómicas (micronúcleos) potencialmente peligrosas, lo cual justifica no sólo la abundancia de

células apoptóticas encontradas en el estudio, sino el planteamiento de la hipótesis sobre la existencia de profundas perturbaciones del ambiente celular, con implicaciones directas en la dinámica de reemplazamiento epitelial. Esto significa que el estrato basal constantemente está forzado a garantizar la altura del estrato celular y con ello su funcionalidad. Tal situación provoca inestabilidad epitelial, la cual hace más vulnerable al tejido en cuestión a la acción de sustancias tóxicas y a la comisión de errores propios durante el proceso de mitosis.¹⁶

Entre los múltiples factores exógenos que juegan un papel predominante en el complicado proceso de premalignización se encuentran los hábitos de vida y en particular el hábito de fumar. En éste han enfocado la atención los investigadores en las últimas décadas, y de forma general existe coincidencia de criterios sobre la responsabilidad del tabaquismo en el incremento de las frecuencias de aparición de micronúcleos, corroborando los riesgos que presupone su adicción.^{19,20}

El hábito de beber es otro factor exógeno relevante en cuanto a potencial genotóxico y citotóxico se refiere. Al respecto, varias investigaciones refieren que provoca altos niveles de aparición de micronúcleos, debido fundamentalmente a la capacidad que tiene de inducir prematuramente la separación de los centrómeros durante el pro-

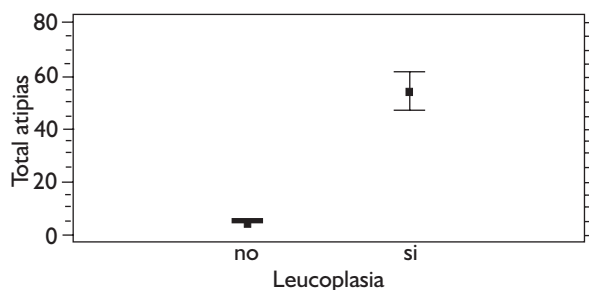


Figura 2. Valores medios y error estándar de la frecuencia de aparición de todas las atipias nucleares observadas en individuos controles y portadores de leucoplasia en los fumadores sujetos a estudio.

Cuadro II. Atipias nucleares en portadores y no portadores de leucoplasia según sexo y edad.

Grupos	Sexo	n	Atipias nucleares /2000 células				
			Edad ± DE	BN ± EM	CL ± EM	CR ± EM	CC ± EM
No portadores	M	11	41.7 ± 8.6	2.18 ± 0.85	1.54 ± 0.47	1.00 ± 0.60	9.64 ± 3.77
	H	17	40.4 ± 13.8	1.88 ± 0.33	2.29 ± 0.62	0.94 ± 0.35	10.29 ± 2.80
Total		28	40.9 ± 11.9	2.00 ± 0.38	2.00 ^a ± 0.42	0.96 ^a ± 0.33	10.04 ^a ± 3.16
Portadores	M	6	43.0 ± 10.2	1.50 ± 0.67	5.83 ± 1.70	1.66 ± 0.80	41.00 ± 7.84
	H	9	45.2 ± 13.9	1.11 ± 0.48	9.44 ± 2.45	6.44 ± 3.56	37.00 ± 6.54
Total		15	46.9 ± 13.7	1.48 ± 0.38	8.00 ^b ± 1.64**	4.53 ^b ± 2.20*	38.60 ^b ± 4.87**

n, número de individuos por grupos; MN, micronúcleos; BN, binucleación; CL, cariólisis; CR, cariorrexis; CC, cromatina condensada; EM, error estándar de la media; DE, desviación estándar; M, mujeres; H, hombres. Letras diferentes difieren entre sí para * p < 0.05 y ** p < 0.005.

ceso mitótico,^{21,22} y por su elevada agresividad sobre el material hereditario. De esta forma se le relaciona con frecuencia con el desarrollo de neoplasias malignas, y con la aparición de retrasos mentales en niños nacidos de madres alcohólicas.²³

Sin embargo, en nuestro trabajo se aprecia la ausencia de diferencias significativas en los valores de micronúcleos tanto en los grupos portador como no portador consumidores de tabaco y de alcohol, independientemente de los años de adicción (*cuadro III*). En ambos casos, la cuantificación del daño se comportó dentro del rango referido por otros autores para poblaciones sanas no expuestas a sustancias genotóxicas.^{4,5}

La no detección de alteraciones apreciables en la frecuencia de aparición de micronúcleos en las células bucoepiteliales puede ser consecuencia directa del alto índice de recambio de este epite-

lio, lo cual enmascara los resultados, pues no permite que las células dañadas permanezcan formando parte de la población epitelial por un periodo de tiempo prolongado, siendo esto la explicación más razonable por la cual no hay un efecto acumulativo del daño. Finalmente, el consumo de frutas y vegetales es otro factor a tener en cuenta y que no es prudente ignorar, pues sus altos contenidos vitamínicos podrían estar impidiendo el desarrollo de eventos genotóxicos en las células de la mucosa bucal.¹⁸

Por otra parte, es importante señalar que en lo referente a las atipias nucleares existieron de forma general diferencias significativas entre los grupos de sujetos sanos y los que poseían hábitos tóxicos. Específicamente, se detectó que el cigarro induce modificaciones importantes en la frecuencia de aparición de binucleación, cariólisis y

Cuadro III. Frecuencia de micronúcleos y atipias nucleares en pacientes portadores y no portadores de leucoplasia, según la práctica de hábitos tóxicos.

Hábitos tóxicos		n	No portadores de leucoplasia				
			MN ± EM	BN ± EM	CL ± EM	CR ± EM	CC ± EM
C. cigarro	> 15 años	6	3.33 ± 1.22	2.04 ± 0.68	0.50 ± 0.22	0.66 ± 0.33	10.16 ± 0.79
	< 15 años	6	3.00 ± 0.93	2.92 ± 0.92	2.50 ± 1.36	0.83 ± 0.47	6.83 ± 1.92
	Total	12	3.16 ± 0.73	2.53 ± 0.73 ^a	1.50 ± 0.72 ^a	0.75 ± 0.27	8.50 ± 1.11 ^a
No C. cigarro		16	2.56 ± 0.41	0.98 ± 0.24	2.37 ± 0.49	1.12 ± 0.54	10.93 ± 0.42
C. Alcohol	> 15	6	3.00 ± 0.77	2.33 ± 0.49	1.16 ± 0.47	0.50 ± 0.22	11.33 ± 0.42 ^a
	< 15	11	3.54 ± 0.70	2.63 ± 0.84	2.18 ± 0.73	0.72 ± 0.30	7.81 ± 1.12
	Total	17	3.35 ± 0.52	2.52 ± 0.56 ^a	1.82 ± 0.50 ^a	0.64 ± 0.20 ^a	9.05 ± 0.84 ^a
No C. alcohol		11	2.00 ± 0.52	1.18 ± 0.32	2.27 ± 0.75 ^a	1.45 ± 0.77	11.54 ± 0.57 ^a
		n	Portadores de leucoplasia				
			MN ± EM	BN ± EM	CL ± EM	CR ± EM	CC ± EM
C. cigarro	> 15 años	10	3.10 ± 0.70	1.70 ± 0.51	9.00 ± 1.93	5.90 ± 3.23	36.10 ± 6.48
	< 15 años	5	2.40 ± 1.16	0.40 ± 0.24	6.00 ± 3.14	1.80 ± 0.96	43.60 ± 7.16
	Total	15	2.86 ± 0.59	1.48 ± 0.38 ^b	8.00 ± 1.64 ^b	4.53 ± 2.20	38.60 ± 4.93 ^b
No C. cigarro		—	—	—	—	—	—
C. alcohol	> 15	7	3.71 ± 1.06	1.14 ± 0.50	6.42 ± 1.90	3.00 ± 1.21	33.85 ± 5.48
	< 15	3	1.33 ± 0.33	0.00	7.66 ± 5.36	3.00 ± 1.15	48.33 ± 9.06
	Total	10	3.00 ± 0.81	0.80 ± 0.38 ^b	6.80 ± 1.90 ^b	3.00 ± 0.88 ^b	38.20 ± 4.93 ^b
No C. alcohol		5	2.60 ± 0.81	2.20 ± 0.73	10.40 ± 3.12 ^b	7.60 ± 6.62	39.40 ± 11.81 ^b

MN, micronúcleos; BN, binucleación; CL, cariólisis; CR, cariorrexis; CC, cromatina condensada; EM, error estándar de la media; n, número de individuos por grupos. Letras diferentes difieren significativamente entre sí (p < 0.05).

cromatina condensada, alcanzando sus valores máximos en los individuos portadores de lesiones leucoplásicas. En relación al consumo de alcohol, podemos decir que su ingestión por los pacientes leucoplásicos exagera aún más la dinámica de renovación celular en el epitelio lesionado, pues incrementa significativamente la aparición de cariólisis, cariorrexis y cromatina condensada (*cuadro III*). Esto confirma la hipótesis de que en estas poblaciones celulares el proceso apoptótico se encuentra significativamente incrementado.

Como puede apreciarse, el grupo de portadores-fumadores y portadores-bebedores cuantificaron un aumento significativo de la frecuencia de aparición de atipias nucleares si lo comparamos con el grupo de no portadores fumadores y bebedores, respectivamente. Este resultado evidencia que tanto la instauración de la lesión debida al cigarro, así como la permanencia de este y de otro hábito tóxico como lo es el consumo de alcohol, inducen daños citotóxicos. La elevada frecuencia con que aparecen las atipias nucleares es una muestra de ello, constituyendo un mecanismo natural de eliminación de células que presentan daños genéticos irreversibles.²⁴⁻²⁶

En sentido general se evidencia, además, que para ambos hábitos tóxicos las alteraciones genotóxicas y citotóxicas de las células exfoliadas de la mucosa bucal no dependen del tiempo de exposición. El hecho de que no se observen alteraciones genéticas (micronúcleos) en los niveles esperados, no implica que tanto las sustancias genotóxicas presentes en el cigarro²⁷ como el etanol hayan dejado de actuar de forma agresiva sobre el genoma celular de las células bucoepiteliales. Lo que puede estar ocurriendo es que los procesos apoptóticos estén eliminando las aberraciones cromosómicas,²⁸ y en consecuencia no aparezcan en los frotis procedentes de esta población celular. Los resultados alcanzados en el presente trabajo abren un camino hacia la caracterización citológica de esta lesión precancerosa,

lo que podría constituir una herramienta útil en el futuro para el manejo terapéutico de esta patología y aplicable en la mayoría de los laboratorios dedicados al diagnóstico citológico.

Referencias

1. Sandner O. *Las neoplasias malignas de la boca y la región maxilo-facial*. La Habana, Editorial FEPUBA-UCV, 2000.
2. Santos GA, Mar AM, Fonseca SE, Cruz HJ, Bulon SA. p53 and proliferation in oral leukoplakia. *Med Oral Patol* 2005; 10: 1-8.
3. García PV, Martínez DI, García MJ, González GM. Risk factors for oral soft tissue lesions in an adult Spanish population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; 30: 277-285.
4. Casartelli G, Bonatti S, De Ferrari M, Scala M, Mereu P et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22 (6): 486-492.
5. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Cebulski WA, Marcos R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *J Cell Sc* 2001; 115: 1567-1574.
6. Pastor S, Lucero L, Gutierrez S, Durban R, Gomez C et al. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 2002; 17: 79-82.
7. Bermejo FA, López JP. Diagnóstico diferencial de las lesiones blancas de la mucosa oral. *Med Oral* 2003; 8: 156.
8. Tobacco habits other than smoking: Betel-quid and areca-nut chewing; and some related nitrosamines. *Centre Internatur le Cancer* 2004; 85: 39-45.
9. Rodríguez OJ, Miranda TJ, Morejón LH, Santana GJ. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. *Rev Cub Estomatol* 2002; 39 (2): 15-23.
10. Nazco RC, González DM, López RV, Hernández MV, Prado RL. Enfermedad periodontal en pacientes infectados por el VIH. *Rev Cub Estomatol* 2002; 39 (1): 3-14.
11. Quintana DJ, Fernández FM, Laborde RR. Factores de riesgo de lesiones premalignas y malignas bucales. *Rev Cub Estomatol* 2004; 41 (3): 10-15.
12. Santana GJ. *Diagnóstico y prevención del cáncer bucal en Cuba*. La Habana, Edición Científico Técnica, 2002.
13. Martino RM, Viegas J, Roth DM. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res* 2003; 2 (4): 410-417.
14. Díaz S, Fonseca G, Fernández I. Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. *Hereditas* 1990; 113: 77-80.
15. Domínguez OA, Batista DA, Carnesoltas LD, Ibrahim LG, Lóriga LE et al. Efectos citogenéticos por exposición ocupacional a citostáticos. *Rev Med IMSS* 2004; 42 (6): 487-492.
16. Domínguez OA, Rojas VE, Romero GL, Rodríguez TJ, Pérez AI. Lesiones citológicas bucoepiteliales en trabajadores expuestos a productos químicos. *Rev Med IMSS* 2005; 43 (2): 221-227.
17. Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C et al. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res Jan* 2000; 464 (2): 255-262.

18. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, Dallal GE, Choi SW et al. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2006; 4: 835-841.
19. Suhas S, Ganapathy K, Gayatrivedi S, 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. *Muta Res* 2004; 561: 15-21.
20. Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol* 2005; 3: 265-272.
21. Reis SR, Sadigursky M, Andrade MG, Soares LP, Espirito SA et al. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesqui Odontol Bras* 2002; 16 (3): 221-225.
22. Reis SR, Espirito SA, Andrade MG, Sadigursky M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Pesqui Odontol Bras* 2006; 20 (2):97-102.
23. Domínguez OA, Romero LI, Lórieiga EL, Ortega JP. Diagnóstico de micronúcleos en células bucales en biomonitorización carcinológica de toxicómanos. *Rev Cub Farm* 2002; 2: 196-199.
24. Bouillet P, Strasser A. Bcl2 –only proteins– evolutionary conserved pro- apoptotic Bcl2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sc* 2002; 115: 1567-1574.
25. Georgiou A, Gornatos I, Pararas N, Giotakis J, Ferekidis E. Cell kinetics and apoptosis in laryngeal carcinoma patients. *Am Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112 (3): 206-213.
26. Torres BO, Ventura AA, Zamora PA, Gomez MBC, Ramos IML et al. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res* 2003; 539 (1-2): 177-186.
27. Marín RA, Rodríguez GI, Rudio C, Revert C, Hardisson A. Efectos tóxicos del tabaco. *Rev Tox* 2004; 21 (2-3): 64-71.
28. Wang XM, Yu SF, Yang ZP. Apoptosis of osteoclast-like cells induced by alendronate is related to Fas gene expression. *Chin J Dent Res* 2000; 3 (2): 26-32.