



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE  
MICRÓNÚCLEOS EN LINFOCITOS Y EN  
RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA PARA  
EVALUAR DAÑO GENOTÓXICO EN ESTUDIOS DE  
MONITOREO HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ROSA ITZEL BELTRÁN PORTUGAL



DOCTORA

REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

CIUDAD DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Beltrán  
Portugal  
Rosa Itzel  
26 12 13 52  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311073094

2. Datos del tutor

Doctora  
Regina Dorinda  
Montero  
Montoya

3. Datos del sinodal 1

Doctora  
Sandra Luz  
Gómez  
Arroyo

4. Datos del sinodal 2

Doctor  
Gabriel  
Arroyo  
Cosultchi

5. Datos del sinodal 3

Doctor  
Javier Alejandro  
Belmont  
Díaz  
Materno

6. Datos del sinodal 4

Maestra  
Karen  
Suárez  
Larios

7. Datos del trabajo escrito

Comparación de los sistemas de micronúcleos en linfocitos  
y en reticulocitos de sangre periférica para evaluar daño  
genotóxico en estudios de monitoreo humano  
63 p  
2018

### **A MI FAMILIA**

Por creer siempre en mí,  
por escucharme, impulsarme y quererme  
a cada momento.

### **A MI MAMÁ SANDRA**

Gracias por ser mi fortaleza.  
Valoro mucho tu amor. Agradezco  
todos los valores y herramientas  
que me brindaste para que yo pudiera  
llegar hasta este punto en mi vida.  
Te amo con el alma.

### **A MI PAPÁ ROBERTO**

Por haberme apoyado y enseñado  
a ser una persona constante.  
Gracias por haber estado conmigo  
a lo largo de este camino.  
Te quiero infinito.

### **A "MON PETIT AMI" LUIS ALFONSO**

Agradezco tu presencia en mi vida.  
Llegaste cuando no lo esperaba y, desde entonces,  
has sido un motor muy importante y un  
apoyo incondicional. Te adoro muchísimo.

***¡CON TODO MI AMOR!***

***¡INFINITAS GRACIAS!***

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la vida por darme la gloriosa dicha de haber estudiar esta hermosa carrera, Biología. Así, tuve la oportunidad de relacionarme con personas maravillosas, inteligentes, críticas, muy interesantes y respetuosas.

También quiero agradecer enormemente a mi directora de tesis la Dra. Regina D. Montero. Por todas sus enseñanzas, explicaciones e infinita paciencia durante la realización de mi trabajo de tesis.

Agradezco a los sinodales Dra. Sandra Arroyo, Dr. Gabriel Arroyo, Dr. Javier Belmont, M. en C. Karen Suárez por dedicar de su tiempo a revisar mi trabajo y aportar comentarios importantes para la corrección de este.

A todos mis compañeros del laboratorio de Medica Genómica y Toxicología Ambiental: Rocío, Karen, Luis, Selene, Betsy, Damián, Uriel, Antonio por todo su apoyo y valiosos consejos, por compartir gratos momentos juntos y sobre todo agradezco su inmensa amabilidad, compañerismo, respeto y amistad.

A cada uno de mis amigos tanto de la carrera como externos por apoyarme en este camino, por las experiencias vividas, por su amor y amistad incondicional (Ruby, Omar, Deyanira, L. Alfonso, Fili, Fernanda, Roberto, Susana, Jacqueline, Francisco, Iván, Bryan, Fer, Valeria, Vero, Karen, Diana, Lorena, Itzel, Eva, Robert).

A mi novio, Luis Alfonso, por estar a mi lado en momentos difíciles y apoyarme sin condición. Gracias por estudiar conmigo e impulsarme a seguir creciendo. Tu amor ha sido muy importante y nutritivo para mi alma.

A los señores: Devora Adalid y Alfonso Castillejo por todo el apoyo que me han brindado desde que me conocen, por dejarme formar parte de sus actividades, por su cariño y confianza. Jamás tendré cómo pagarles, pero los quiero mucho.

Y, claro a toda mi familia (padres, hermanos, tíos, tías, primos, primas y abuelos) porque me han apoyado substancialmente en cada sentido. Pero en especial a mi abuelita Dolores que siempre estuvo al pendiente de mí y me apoyo siempre. ¡Mil gracias!

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
Sistema de micronúcleos para evaluar daño genotóxico .....	2
Ensayo del citoma de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis como medida de inestabilidad genética .....	10
Mecanismos de formación de micronúcleos, puentes nucleoplasmáticos y gemaciones nucleares .....	13
Citometría de flujo .....	16
Evaluación de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica, empleando la citometría de flujo .....	16
Alcances y limitaciones de los sistemas de MN en linfocitos y en reticulocitos de sangre periférica .....	20
<b>Justificación</b> .....	21
<b>Hipótesis</b> .....	22
<b>Objetivos</b> .....	22
Objetivo general .....	22
Objetivos específicos .....	22
<b>Materiales y métodos</b> .....	23
Características de la muestra de estudio .....	23
Evaluación de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica mediante el ensayo del citoma CBMN .....	23
Siembra de linfocitos .....	23
Bloqueo de citocinesis .....	24
Cosecha de linfocitos .....	24
Preparación, tinción y montaje de laminillas .....	24
Evaluación de laminillas con microscopía óptica .....	25
A) Criterios de inclusión de células viables mono-, bi- y multinucleadas .....	25
B) Criterios de inclusión de células binucleadas .....	26
C) Criterios para considerar y contar micronúcleos .....	26
Determinación de los eventos registrados en la evaluación microscópica .....	27

Evaluación de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica empleando citometría de flujo .....	27
Fijación de muestras sanguíneas .....	28
Tinción de las muestras .....	28
Adquisición de eventos en el citómetro de flujo .....	30
Determinación de regiones para obtener eventos .....	34
Cuantificación de eventos .....	35
Análisis estadístico .....	36
<b>Resultados</b> .....	37
Determinación de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica .....	37
Cuantificación de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica .....	38
Correlación entre las frecuencias de micronúcleos en los dos sistemas .....	40
<b>Discusión</b> .....	43
Evaluación de daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica .....	44
Evaluación de daño genotóxico en reticulocitos de sangre periférica .....	45
Relación entre los sistemas de evaluación de daño citogenético, MN-LINFBN y MN-RET, en su capacidad para detectar eventos de genotoxicidad en muestras humanas .....	48
<b>Conclusiones</b> .....	51
<b>Perspectivas</b> .....	51
<b>Bibliografía</b> .....	53

## **Abreviaturas**

AC	Aberraciones cromosómicas
Anti-CD61	Anticuerpo contra antígeno CD61, expresado en plaquetas
Anti-CD71	Anticuerpo contra receptor de transferrina
BBS*	Solución salina tamponada con borato
BFB*	Modelo del ciclo de rotura-fusión-puente
BN	Binucleado
CBMN*	Técnica de micronúcleos con citocinesis bloqueada
CF	Citometría de flujo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERYT*	Eritrocito
FCM*	Citometría de flujo
FSC-H*	Dispersión de frente
GN	Gemación nuclear
IM	Índice mitótico
IN	Índice de nucleación
MN	Micronúcleo
MN-ERYT	Micronúcleo en eritrocito
MN-LINFBN	Micronúcleo en linfocito binucleado
MN-RET	Micronúcleo en reticulocito
NCE*	Eritrocitos normocromáticos
NT	Naranja de Tiazol
PBL*	Linfocitos de sangre periférica
PCE*	Eritrocitos policromáticos
PNP	Puente nucleoplásmico
R	Regiones en los histogramas de citometría de flujo
RET	Reticulocito
RETCD71	Subpoblación de reticulocitos que portan el receptor de transferrina CD71
RNA	Ácido ribonucleico
SSC-H*	Dispersión de lado

\*Por sus siglas en inglés

## RESUMEN

**Introducción:** Los biomarcadores de efecto, como los micronúcleos (MN) no incorporados en los núcleos de las células hijas, se emplean para evaluar daño genotóxico. En muestras de sangre humana se evalúan linfocitos y, recientemente, reticulocitos, para determinar las frecuencias de MN. **Objetivo:** Explorar si estos dos sistemas para evaluar micronúcleos *in vivo* son comparables en su capacidad para detectar los eventos de genotoxicidad en muestras humanas. **Materiales y métodos:** Se emplearon muestras de sangre periférica de 32 niños de entre 8 y 12 años de una comunidad en Tlaxcala. Se evaluaron MN en linfocitos de sangre periférica, mediante el ensayo del citoma con citocinesis bloqueada (CBMN) para determinar las frecuencias de daño genotóxico, a través del conteo de células binucleadas con MN o con daño total (que incluye células con sólo 1 MN o con más de un evento: puentes nucleoplásmicos (PNP), gemaciones nucleares (GN) y MN). También se realizó la evaluación de MN en reticulocitos circulantes en sangre periférica, empleando la técnica de citometría de flujo. Se determinó si existía relación entre ambos sistemas, con la prueba estadística de correlación de Spearman. **Resultados:** No se encontró correlación entre los sistemas en su capacidad de detectar daño genotóxico en muestras humanas. **Discusión:** Los reticulocitos son útiles para caracterizar daño reciente al DNA a diferencia de linfocitos cuya utilidad sería en exposiciones de mayor duración. **Conclusión:** Estudios con personas altamente expuestas podrían revelar correlación entre estos parámetros a corto plazo.

**Palabras clave.** Daño genotóxico, biomarcador citogenético, micronúcleos, reticulocitos, linfocitos.

## INTRODUCCIÓN

### SISTEMA DE MICRONÚCLEOS PARA EVALUAR DAÑO GENOTÓXICO

Desde hace varias décadas, las actividades antropogénicas han aumentado de manera considerable y con ello se ha incrementado la producción y la exposición a sustancias tóxicas (Klaassen y col., 2005), que pueden afectar negativamente a los seres vivos, entre ellos al propio hombre (Álvarez, 2001). La exposición puede provenir de fuentes emisoras fijas (fábricas), móviles (autos) o difusas (actividades agrícolas), a través de distintos medios (aire, agua, alimentos) y por diferentes vías (inhalación, ingestión, absorción dérmica) (Programa de gestión ambiental de sustancias tóxicas de atención prioritaria, 1957).

Entre las múltiples afectaciones que ejercen las sustancias tóxicas sobre los organismos, se encuentra el efecto genotóxico, es decir, las alteraciones en el DNA, ya sea de manera directa o indirecta (Cedano y cols., 2011). Este efecto puede ser expresado en diversas formas. Por ejemplo: teratogénica (defectos congénitos durante el desarrollo embrionario), mutagénica (alteraciones en las cadenas de DNA, que generan mutaciones) y carcinogénica (expresión y alteración de componentes involucrados en el desarrollo del cáncer) (Cedano y cols., 2011).

Además de las sustancias tóxicas, existen agentes físicos o biológicos capaces de afectar al material genético, y al conjunto de éstos se les conoce como genotóxicos y sus efectos pueden ser evaluados con ayuda de biomarcadores, que son parámetros biológicos que permiten la observación y/o la cuantificación de las alteraciones en componentes, estructuras, procesos o conductas de los organismos debido a la exposición a determinado(s) agente(s) (Manahan, 2003). Dentro de éstos están los de efecto biológico como los citogenéticos, que proporcionan información de las alteraciones en la estructura, función y comportamiento de los cromosomas observables en células o componentes de sangre periférica, por ejemplo, la presencia de micronúcleos (MN), que es uno de los

marcadores más sensibles de daño al DNA y se usa en la investigación de la genotoxicidad producida por varios compuestos químicos (Suárez, 2008).

Los MN, también conocidos como cuerpos de Howell-Jolly en hematología, son restos lisos y redondos de naturaleza nuclear localizados en el citoplasma y que no fueron incorporados correctamente en los núcleos de las células hijas durante la anafase/telofase del ciclo celular (Fenech y cols., 2011). Los MN pueden originarse de manera espontánea o, como se mencionó anteriormente, en respuesta a la acción de determinados agentes presentes en el ambiente (Fenech, 1985), que pueden romper el DNA (clastogénicos) o que provocan un mal funcionamiento de la maquinaria de segregación (aneugénicos) (Zalacain y cols., 2005). Éstos a su vez, pueden conducir a una inestabilidad genética (Fenech y cols., 2011), observada en personas con cáncer, como resultado de aberraciones cromosómicas acumulables (Bonassi y cols., 2007).

Originalmente, los MN fueron identificados y descritos en eritrocitos de médula ósea de roedores por los hematólogos William Howell y Justin Jolly, que posteriormente encontraron que estaban asociados con la deficiencia vitamínica de ácido fólico y de vitamina B12 (Dawson, 1961 en Fenech y cols., 2011). A partir de entonces, se ha buscado la presencia y la relación de MN con otros factores en distintos tipos celulares de diversos organismos. Por ejemplo, la asociación entre la expresión de MN y la exposición a agentes ambientales se reportó por primera vez en células de raíces de plantas expuestas a radiación ionizante (Evans, 1959 en Fenech y cols., 2011). Siete años más tarde se reportó la inducción de MN por compuestos químicos en células tumorales ascíticas de Ehrlich tratadas con colchicina (Klein, 1952 en Fenech y cols., 2011). Actualmente, se conocen diversos factores como edad, género, vitaminas, tratamientos médicos, exposición diaria a agentes genotóxicos, etc. capaces de influir o modificar el número de MN presentes en las células (Zalacain y cols., 2005).

En mamíferos, la evaluación de MN se realiza generalmente en células exfoliadas de epitelios (oral, nasal o urotelial), en linfocitos de sangre periférica (PBL, por sus siglas en

inglés: *peripheral blood lymphocytes*) (Moore y cols., 1993) y en eritrocitos (ERYT) y su población más joven, los reticulocitos (RET), ya sea de médula ósea o de sangre periférica. Estos tipos celulares son de utilidad para realizar estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

En seres humanos, la evaluación de MN ha sido restringida a células exfoliadas de epitelios o a PBL, ya que los métodos empleados para su obtención resultan poco invasivos y por otras características tanto de las técnicas como de las células, que se mencionan más adelante. En cuanto al empleo de ERYT y de RET para cuantificar MN, ha resultado difícil para seres humanos, primero, porque no es posible realizar aspirados de médula ósea pues es una técnica altamente invasiva y se usa exclusivamente para donadores de médula ósea, en individuos que tengan afectaciones en ésta o que padezcan enfermedades particulares, y en individuos que sin saberlo, se sometieron a drogas potencialmente dañinas (Morishima y cols., 1976), segundo, porque la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos (MN-ERYT) es extremadamente baja, debido a la eficiencia con la que el bazo secuestra y destruye a estas células, fenómeno que no ocurre en modelos experimentales como el ratón, pues el daño permanece ya que el bazo no filtra estas células (Dertinger y cols., 2003) y, tercero, porque en sangre periférica de seres humanos, los reticulocitos están presentes del 0.5-3%, un porcentaje muy bajo comparado con el de ratas, que presentan un porcentaje del 4-11% (Montero-Montoya y cols., 2016). Sin embargo, más adelante se mencionan algunas ventajas de emplear este tipo celular para evaluar MN en muestras humanas.

Las células epiteliales, específicamente de la cavidad oral, son empleadas debido a presentan una elevada capacidad proliferativa, lo que las vuelve más vulnerables de sufrir daño al DNA y, además, ésta cavidad es un punto de contacto con agentes potencialmente peligrosos (Torres-Bugarín, 2013). También resulta importante este compartimento ya que se calcula que el 90% de todos los tipos de cáncer tienen origen epitelial, entonces emplearlo para monitorear eventos genotóxicos tempranos causados por agentes cancerígenos inhalados o ingeridos podría brindar información sobre el estado de los

organismos (Torres-Bugarín, 2013). En este sistema, es posible realizar la evaluación simultánea de eventos genotóxicos (como MN, gemaciones nucleares (GN) y puentes nucleoplásmicos (PNP)), así como eventos de citotoxicidad (por ejemplo, apoptosis, necrosis, cariorrexis, etc.), sin necesidad de hacer cultivos ya que la población celular se encuentra en una proliferación constante, lo que facilita y disminuye el costo de la técnica (Bonassi y cols., 2011), solamente se emplean colorantes que penetren al interior de las células, como la tinción de Wright (Torres-Bugarín y cols., 2013) o la de Feulgen contrateñida con Light Green en su más reciente modificación en microscopía para campo claro o fluorescencia (Thomas y cols., 2009), para poder observar los eventos.

Los PBL se emplean para la evaluación de MN porque son una población celular fácil de estimular (Pastor, 2002). Inicialmente en estas células se estudiaban aberraciones cromosómicas (AC), es decir, roturas de la doble cadena o de cadena sencilla de DNA observables en los cromosomas de células metafásicas, correspondientes a una respuesta frecuente y significativa a la exposición de agentes mutagénicos (Countryman y cols., 1976). Sin embargo, a pesar de que las AC pueden proporcionar información sobre el efecto específico de un compuesto químico particular, es decir, qué cromosomas y qué regiones fueron afectadas (Suárez, 2008), dicha prueba resulta muy lenta para estudios epidemiológicos y con bajo poder estadístico debido a las pocas células en metafase que pueden ser evaluadas (Heddle y cols., 1983). Además, con sustento en diversos estudios, se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la inducción de AC y MN (Shelby, 1995). Por lo tanto, la técnica de MN es aceptada como alternativa en lugar de la evaluación de AC, pues es mucho más sencillo y rápido el reconocimiento de MN que observar directamente a los cromosomas mitóticos, por lo que se pueden analizar más células en menos tiempo, dándole al estudio mayor poder estadístico (Countryman y cols., 1976). De la misma manera que las AC pueden ser estructurales o numéricas, los MN pueden derivar de la pérdida de cromosomas completos o de fragmentos cromosómicos, así, para que su estudio resulte más completo, se puede emplear la técnica de hibridación

*in situ* con sondas pancentroméricas, para diferenciar si los MN corresponden a fragmentos cromosómicos, que derivan de la exposición a agentes clastogénicos (que rompen las cadenas de DNA), o a cromosomas enteros, debido a la exposición a agentes aneugénicos (que causan defectos en la maquinaria de segregación) (IARC, 2004).

Para evaluar MN en linfocitos de sangre periférica, existen tres metodologías que pueden usarse (Montero-Montoya y cols., 2001): 1) el “método tradicional”, que consiste en realizar cultivos celulares de linfocitos y luego preparar laminillas para teñirlas con el colorante Giemsa-Wright y observar los MN, 2) el ensayo del citoma de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN, por sus siglas en inglés: *cytokinesis-block micronucleus*), en el que, además de proliferar linfocitos en cultivo, se emplea un compuesto químico capaz de inhibir la citocinesis celular, conocido como citocalasina-B, que produce células con apariencia binucleada, las cuales ya han completado una división celular y en las que es posible ver expresados MN y otros eventos de daño al DNA y 3) el método de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) combinado con una tinción inmunohistoquímica. Este último método permite identificar a las células que proliferaron en el tiempo de cultivo en presencia del marcador BrDU, tanto *in vivo* como *in vitro*, obteniendo así, la frecuencia de MN sólo de la fracción celular capaz de dividirse (Montero y cols., 1991).

Por otro lado, aunque los eritrocitos y reticulocitos no han sido ampliamente usados para evaluar daño cromosómico en muestras humanas, en roedores se ha determinado que son de utilidad en el test de MN *in vivo* porque facilitan la detección del daño de una exposición sistémica a diversos agentes tóxicos, ya que muchos de éstos son capaces de llegar y afectar la médula ósea (Mavournin y cols., 1990). Además, gracias a que estas células expulsan el núcleo principal (enucleación) durante el proceso de maduración de eritroblasto a eritrocito policromático (PCE, por sus siglas en inglés: *polychromatic erythrocyte*) cualquier MN que se haya formado puede permanecer en el citoplasma de la célula enucleada (sin núcleo) y ser identificado fácilmente (Krishna y col., 2000). Estos

PCE son eritrocitos jóvenes con contenido de RNA, basófilos, se tiñen de azul claro o azul grisáceo con Giemsa y con el tiempo pierden algo de dicho contenido, convirtiéndose en eritrocitos normocromáticos (NCE, por sus siglas en inglés: normochromatic erythrocytes), de menor tamaño que los PCE, acidófilos, que se tiñen de naranja claro o naranja/rosa con Giemsa (Krishna y col., 2000). Estos dos tipos de eritrocitos, que se tiñen diferencialmente, pueden observarse en los compartimentos de médula ósea, bazo o en sangre y pueden diferenciarse de los eritrocitos maduros, ya que éstos últimos no contienen RNA en su citoplasma (Krishna y col., 2000). También, la relación de PCE y NCE, entre animales tratados con un agente de prueba y otros con control de vehículo, proporciona un índice de citotoxicidad (Krishna y col., 2000). Este ensayo tiene varias ventajas importantes sobre el análisis de las células en médula ósea, por ejemplo, es técnicamente simple, el punto final (criterio de valoración de un acontecimiento clínico, que estima y determina cuán peligrosa es una sustancia (Lehman, 2017) evaluado es más objetivo y susceptible de automatización, requiere menos tiempo, el ensayo puede detectar eventos tanto clastogénicos como aneugénicos y puede integrarse fácilmente en estudios toxicológicos generales (Krishna y col., 2000), como el test de MN en linfocitos. Por esta razón se buscó hacer más práctica la evaluación para modelos experimentales, primero con tinciones supravitales (Hayashi y cols., 1990) que mejoraron la sensibilidad y permitieron una evaluación más rápida, y después se buscó la automatización mediante el uso citometría de flujo (CF) (Abramsson-Zetterberg y cols., 1995).

La citometría de flujo contribuyó a mejorar el test de MN *in vivo*, ya que, en lugar de utilizar muestras de médula ósea de roedores, se extraen muestras de sangre periférica, evitando el sacrificio de los animales, posibilitando la repetición del muestreo y determinación de micronúcleos en reticulocitos (MN-RET) espontáneos de los mismos a lo largo de toda su vida (Sato y cols., 1995), se requiere menor cantidad de muestra para realizar el análisis, se evalúan más células y disminuye el tiempo de la evaluación (Mavournin y cols., 1990). Se propuso que la subpoblación más joven de reticulocitos, que

portan aún el receptor de transferrina CD71 (RET-CD71), podrían ser las células en las que se determinaran las frecuencias de MN porque son células que recientemente han salido de médula ósea hacia el torrente sanguíneo y en organismos, como la rata o el humano, en los cuales sus bazos filtran a los eritrocitos micronucleados, ayudarían a no perder los eventos genotóxicos (Dertinger y cols., 1996). Entonces, esta subpoblación se usó para estandarizar el método de micronúcleos *in vivo* en roedores, rata y ratón (Dertinger y cols., 1996). A partir de este método se pretendió estandarizar la prueba para su aplicación en muestras de sangre periférica humanas en estudios de epidemiología molecular, con el fin de tener una prueba que proporcione resultados con mayor rapidez de lo que se logra con cultivos de linfocitos de sangre periférica. Sin embargo, a la fecha, en seres humanos los resultados hacen el método costoso y muy variable (Abramsson-Zetterberg y cols., 2006), por lo que Montero y cols. (2016) propusieron limitar el análisis en reticulocitos con alto contenido de RNA en su citoplasma, pero no a la población que porta el receptor CD71, como inicialmente se propuso para estandarizar la técnica en modelos experimentales roedores, pues este marcador se pierde antes en el tiempo (horas) y la degradación del RNA tarda poco más (hasta días) (Woolley y cols., 2005).

Como se mencionó antes, los MN presentes en el linaje eritroide de sangre periférica pueden reflejar el daño genético en médula ósea, sin necesidad de extraer células de este compartimento (Dertinger y cols., 2011), por lo que es de interés determinar en poblaciones sanas las frecuencias basales de MN en este tipo celular y posteriormente establecer los niveles que reflejen el daño como consecuencia de la exposición a agentes genotóxicos, ya que es sabido que algunos compuestos afectan en especial a la médula, causando problemas como anemias y leucemia, como es el caso del benceno, un contaminante presente en todos los ambientes donde vive el ser humano (ATSDR, 2016).

En general los biomarcadores de efecto biológico, como los MN, son aceptados como más relevantes para el estudio del cáncer que los de exposición (por ejemplo, aductos en el DNA), ya que representan efectos irreversibles y están mecánicamente implicados en la

cadena de eventos que conducen a la formación de tumores (Abramsson-Zetterberg y cols., 2000). Asimismo, el test de MN es ampliamente usado en la batería de pruebas de genotoxicidad y las agencias de todo el mundo recomiendan que se utilice como parte de la evaluación de seguridad de los productos (Krishna y cols., 2000).

Hasta ahora, el ensayo del citoma CBMN es la metodología más usada para monitoreo humano y, a través de diversos estudios, ha demostrado que tiene gran relevancia en la capacidad de predicción de cáncer en personas (Kirsch-Volders y cols., 2014). Sin embargo, recientemente se tiene como objetivo emplear reticulocitos de sangre periférica para evaluar MN, empleando citometría de flujo, ya que, como se ha mencionado, es posible evaluar mayor número de células con menor cantidad de muestra y el tiempo empleado es menor. Pero para poder corroborar si son equiparables en su sensibilidad de detectar daño al DNA, Costa y cols. (2011) son el primer equipo de investigación que han comparado estos dos tipos celulares. En su trabajo evaluaron y compararon las frecuencias de micronúcleos en linfocitos binucleados (MN-LINFBN) y de MN-RET en muestras de sangre periférica de una población expuesta a plaguicidas en Portugal, reportando que existe una correlación positiva y significativa entre ambos indicadores, pero que, dentro del grupo expuesto, los datos mostraron que había una correlación significativa entre las frecuencias de MN-RET y una exposición reciente (exposición en los 10 días previos) la cual no se encontró cuando se consideró CBMN. Aun así, con los dos métodos determinaron el efecto genotóxico por la exposición a plaguicidas, siendo este estudio el que abrió camino para indagar si ambos sistemas son realmente equiparables en su capacidad de detectar daño genotóxico, o en qué casos lo son. Por lo anterior, el objetivo de esta tesis será determinar si hay correlación entre las frecuencias de MN en linfocitos y en reticulocitos de sangre periférica.

## ENSAYO DEL CITOMA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS COMO MEDIDA DE INESTABILIDAD GENÉTICA

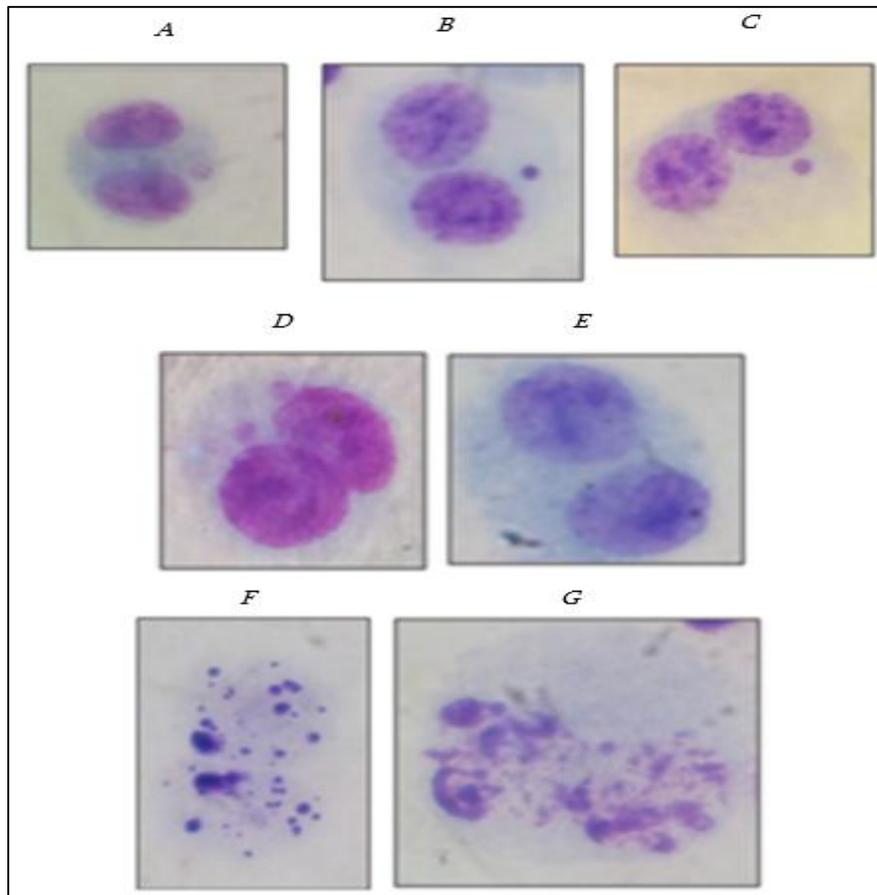
La técnica de evaluación de MN como medida de daño cromosómico en cultivos de linfocitos humanos fue desarrollada por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, quienes eligieron estas células por su gran actividad mitótica (Zalacain y cols., 2005). Años más tarde, Fenech, empleó este ensayo para verificar las frecuencias de MN expresadas como consecuencia de la exposición a radiación ionizante (Zalacain y cols., 2005). Sin embargo, pronto se hizo evidente que los resultados obtenidos variaban dependiendo del tiempo de cosecha, además de que la proporción de linfocitos que responden al mitógeno (permite que las células entren a ciclo celular, como la fitohemaglutinina) en sujetos jóvenes suele ser mayor que en individuos mayores y que se podían generar falsos negativos en condiciones en las que se llegara a una fuerte inhibición de la mitosis, como ocurre a menudo con la exposición a agentes químicos (Heddle y cols., 2011). Por lo que se planteó la hipótesis de que el ensayo en su forma actual tenía una gran falla debido a que las frecuencias de MN observadas dependían de la proporción de linfocitos que respondían al mitógeno, así como del número de divisiones que pudieron haber ocurrido durante el periodo de cultivo anterior a la cosecha celular. Entonces, se propuso que el ensayo sólo sería robusto si lograban desarrollar y establecer un método para acumular e identificar células con una división (monodividas), basados en el marcaje de síntesis de DNA o en cultivos celulares paralelos con bloqueo de la mitosis para corregir la proporción de células en división (Heddle y cols., 2011). Fue así que, después de un arduo trabajo, en 1985, la técnica fue modificada por Fenech y Morley, quienes emplearon un compuesto químico capaz de inhibir la citocinesis celular al impedir la creación del anillo contráctil (constituido por microfilamentos de actina y miosina) necesario para la partición celular en telofase mitótica, denominado citocalasina-B (Zalacain y cols., 2005), molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum* y que no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, con la intención de observar células específicamente

binucleadas (con dos núcleos), correspondientes a las que ya han completado una división celular, desarrollando así la técnica CBMN (Savage, 1988).

Para el año de 1999, la técnica de CBMN fue validada, empleando la metodología propuesta por Fenech y Morley en 1985, y posteriormente fue considerada a nivel mundial como efectiva para detectar biomarcadores de daño al DNA, gracias a los datos recabados en el Proyecto Internacional de Micronúcleos Humanos (HUMN, por sus siglas en inglés: *HUman MicroNucleus project*), diseñado e implementado por Michael Fenech y Stefano Bonassi, con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo, y teniendo como principal objetivo identificar las fuentes y los niveles de variabilidad capaces de influir en la frecuencia basal de MN en linfocitos humanos (Zalacain y cols., 2005), y también comparar las distintas técnicas utilizadas para definir un protocolo estándar y poder realizar un estudio prospectivo por parte de todos los laboratorios implicados e incluso intentar establecer una asociación entre la frecuencia de MN y enfermedades como el cáncer (Fenech y cols., 2011), que de hecho este tipo de estudios demostraron que un nivel intermedio o alto de las frecuencias de MN predicen un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer (Bonassi y cols., 2007). Por ejemplo, valores de la mediana de MN en linfocitos de 6.5% pueden considerarse dentro del rango de una población no expuesta y los mayores a dicho valor, podrían reflejar un riesgo de desarrollar cáncer (Bonassi y cols., 2001).

Aunque se había logrado estandarizar un método para evaluar MN en linfocitos, los reportes de otros tipos de daño observados en el sistema (Lindholm y cols., 1991; Montero y cols., 2001), llevaron a la propuesta del ensayo de CBMN utilizando un enfoque del “citoma”, es decir, evaluar daño al DNA, citostasis y citotoxicidad (Fenech, 2006). Con éste es posible observar no solamente MN sino también otros eventos genotóxicos como PNP y GN y daño citotóxico en células que experimentan muerte celular por necrosis y apoptosis (Fig. 1). Así como, es posible medir el grado de proliferación celular entre

células viables usando las relaciones de células mono-, bi- y multinucleadas, determinando así el índice de nucleación (IN) o de división nuclear (Heddle y cols., 2011).



**Figura 1.** Eventos genotóxicos y citotóxicos observados en el ensayo del citoma CBMN en linfocitos humanos de sangre periférica. (A-C) células binucleadas con MN; (D) célula binucleada con GN en cada núcleo; (E) célula binucleada con PNP; (F) célula apoptótica; (G) célula necrótica. Tinción de Giemsa; microscopía óptica con enfoque de 1000X. Imágenes tomadas durante la realización en este trabajo.

Este método fue validado a través de los estudios de diferentes grupos de investigación, que utilizaron modelos de estrés oxidante y/o deficiencia de folato, en los que se encontraron fuertes correlaciones positivas entre los MN, PNP y GN (Heddle y cols., 2011). Entonces, se estableció que estos biomarcadores de inestabilidad genómica están mecánicamente relacionados entre sí, y que podrían explicarse por el modelo del ciclo de rotura-fusión-puente (BFB, del inglés: *breakage-fusion-bridge*) cuando las condiciones nutricionales o de exposición generan roturas de la doble cadena del DNA y conducen a la formación de cromosomas dicéntricos (Heddle y cols., 2011).

Y finalmente, en 2007, Fenech publicó el protocolo del ensayo del citoma de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, el cual, gracias a su confiabilidad, se usa en diversos campos de investigación, como en estudios de monitoreo de poblaciones (Bolognesi y cols., 2004), en nutrigenómica y en farmacogenómica, (El-Zein y cols., 2008; Fenech, 2007; Kirsch-Volders y cols., 2014), por ejemplo.

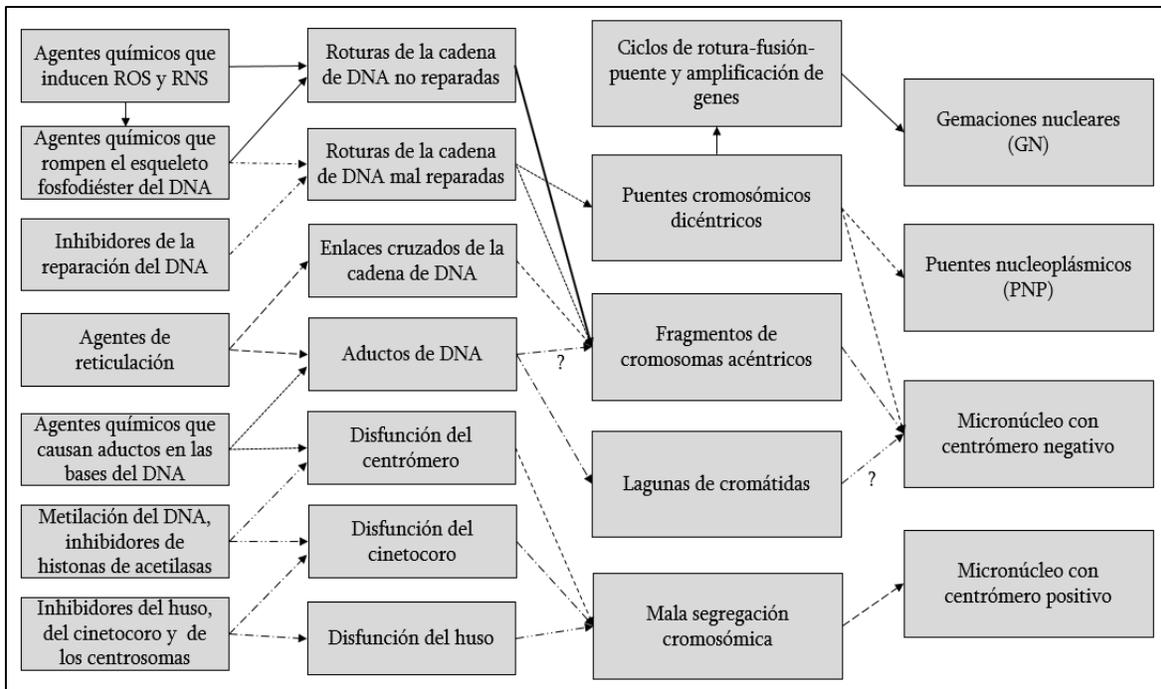
## **MECANISMOS DE FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS, PUENTES NUCLEOPLASMÁTICOS Y GEMACIONES NUCLEARES**

Desde el conocimiento de la existencia de los MN, se han buscado y tratado de explicar los mecanismos que dan su origen, estableciéndose que se forman, principalmente, de fragmentos cromosómicos y/o cromatídicos acéntricos o de cromosomas enteros, que no se incluyeron en los núcleos de las células hijas al momento de completar la anafase/telofase durante la división celular ya que, no fueron alineados correctamente en el huso mitótico durante el proceso de segregación en anafase (Fenech, 2007). Estos cromosomas o fragmentos cromosómicos eventualmente son cubiertos por una membrana nuclear y, a excepción de los de tamaño más pequeño, son morfológicamente similares a los núcleos después de la tinción nuclear convencional (Fenech y cols., 2011). Los fragmentos de cromátidas o cromosomas acéntricos se originan de rupturas de las cadenas de DNA no reparadas o por la mala reparación de éstas conduciendo a la formación de fragmentos acéntricos, que a menudo ocurren en conjunción con la formación de cromosomas dicéntricos (Kirsch-Volders y cols., 2014). Por lo tanto, los MN también pueden originarse cuando ocurren rupturas en más de un sitio en cromosomas dicéntricos, cuando los cromosomas se separan hacia los polos opuestos de una célula (Kirsch-Volders y cols., 2014). Por otro lado, la mala segregación de cromosomas enteros puede ser inducida si un compuesto químico causa un mal funcionamiento tanto del centrómero como del cinetocoro, o si interrumpe la función del huso mitótico o del centrosoma, lo que conlleva a que una célula porte un cromosoma extra, que no puede

ser incorporado dentro del núcleo de la célula hija, formando así un MN (Kirsch-Volders y cols., 2014).

En cuanto al origen de los puentes nucleoplásmicos se sabe que se evidencian durante anafase, cuando los centrómeros de cromosomas dicéntricos son separados hacia los polos opuestos (Fenech y cols., 2011). En ausencia de rotura del puente en anafase, la membrana nuclear finalmente rodea los núcleos de las células hijas y al puente de anafase y de esta manera, se forma un PNP (Fenech y cols., 2011), los cuales, generalmente, se rompen durante la citocinesis, pero pueden ser acumulados en células con citocinesis bloqueada (Fenech, 2007).

Las GN, también conocidas como brotes nucleares, son una anomalía nuclear y en las últimas décadas se han asociado con eventos de inestabilidad cromosómica (Fenech y cols., 2011), además se ha observado que las células cultivadas bajo condiciones de deficiencia moderada de ácido fólico (valores menores a 3 mg/ mL (Secretaría de Salud, 2003)), inducen amplificación génica (Shimizu y cols., 2005), es decir, que produce muchas copias de uno o más genes, o de algunas regiones de éste; las células entonces, se deshacen de las copias adicionales, expulsándolas del núcleo en forma de una “gemación” de ese material. En cuanto a sus características, este tipo de anomalías nucleares se caracterizan por tener una morfología similar a la de los MN con la excepción de que están conectadas a los núcleos por un tallo estrecho o ancho de material nucleoplásmico dependiendo de la etapa del proceso de gemación (Fenech y cols., 2011). Otra teoría de su formación explica que cuando un PNP presente entre dos núcleos se rompe, los remanentes se contraen hacia los núcleos y cuando ocurre la división celular éstos quedarán unidos al núcleo principal, pero tendrán aspecto de un brote (Pampalona y cols., 2010 en Fenech y cols., 2011). También, Shimizu (2000) ofreció evidencia de que las GN pueden contener material cromosómico amplificado.



**Figura 2.** Mecanismos conocidos por los cuales los compuestos genotóxicos pueden inducir microneúcleos y puentes nucleoplásmicos en el ensayo del citoma CBMN. ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. El signo de interrogación (?) indica conocimiento insuficiente sobre el mecanismo y/o cierta incertidumbre sobre la conexión entre los dos eventos relacionados (imagen tomada de Kirsch-Volders y cols., 2014, traducida y modificada por Beltrán-Portugal, 2018).

Usando sondas de centrómeros y telómeros, Lindbergh y cols. (2007) investigaron los mecanismos de formación de MN y de GN en células deficientes en ácido fólico, obteniendo que las GN y los MN tienen un origen mecanicista parcialmente diferente, pues el DNA intersticial sin centrómeros o sin marcaje de telómeros fue claramente más prevalente en GN (43%) que en MN (13%), mientras que el DNA solamente telomérico o el DNA centromérico y telomérico fue más frecuente en MN (62 y 22%, respectivamente) que en GN (44 y 10%, respectivamente) (Fenech y cols., 2011). De esta manera y de acuerdo con el modelo que propuso Lindbergh (2007), los MN derivan principalmente de cromosomas retrasados y de fragmentos acéntricos terminales, durante la mitosis; mientras que la mayoría de GN se originan a partir de fragmentos acéntricos intersticiales o terminales y también se cree que es más plausible que estas anomalías puedan ocurrir transitoriamente después de la rotura de un PNP (Fenech y cols., 2011). En la

figura 2 se muestra un esquema indicando los agentes y los mecanismos mediante los cuales se induce la formación de MN, PNP y GN.

## **CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo es una técnica usada para caracterizar células, usualmente en muestras extraídas de sangre periférica o de médula ósea y es un método que permite la detección de antígenos específicos en la superficie celular o dentro de las células que son permeables en su citoplasma o en su núcleo, ya que es posible medir la fluorescencia y la dispersión de luz de las células a medida que fluyen en una corriente coaxial a través de un haz de luz intensa (Hatton y cols., 2013). Las células por sí mismas pueden generar fluorescencia, debido a los citocromos o a otros componentes intracelulares que poseen o pueden ser pre-marcadas con fluorocromos conjugados a anticuerpos que se unen a antígenos específicos o pueden ser teñidas con colorantes fluorescentes; el espectro de emisión de cada fluorocromo es diferente, y los equipos de citometría de flujo tienen la capacidad de distinguir las diversas longitudes de onda, aunque también pueden diferenciar tipos celulares gracias a la deflexión del haz de luz de las células, y de esta manera es posible obtener información sobre el tamaño y complejidad o granularidad de las células (Hatton y cols., 2013).

## **EVALUACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA, EMPLEANDO LA CITOMETRÍA DE FLUJO**

En modelos experimentales, el método tradicional para la detección de MN *in vivo* involucra el aislamiento de células de médula ósea para hacer frotis y posteriormente evaluarlas en el microscopio, y durante décadas este fue el método mayormente empleado en la batería de pruebas de genotoxicidad (Bemis y cols., 2008). Para esta técnica se empleaba la tinción con Giemsa, pues era posible distinguir a los eritrocitos recién formados (PCE: eritrocitos policromáticos) de los eritrocitos maduros (NCE: eritrocitos normocromáticos) por el color, es decir, los PCE mostraban un color azulado y los NCE

un color rosado; sin embargo, la clasificación de las células requería una decisión subjetiva por parte del investigador, lo que hacía difícil el análisis, y además, en algunas ocasiones había artefactos difícilmente discernibles de los MN, como los gránulos de mastocitos presentes en la medula ósea, por lo que posteriormente, MacGregor y cols. (1983) introdujeron dos métodos de tinción fluorescente más específicos, uno usaba los colorantes pironina Y (tiñe RNA) y Hoechst 33258 (tiñe DNA) y el otro, naranja de acridina (tiñe RNA y DNA, pero la emisión de su fluorescencia es diferente; el primero emite en el espectro rojo y el segundo, en el verde amarillento), decidiendo emplear el método de un solo colorante, pues facilita la técnica ya que con un solo colorante pueden identificarse dos marcadores, por lo que se convirtió en el método estándar (Heddle y cols., 2011).

Otra ventaja de usar naranja de acridina es que, como tiñe RNA y DNA, hace posible distinguir fácilmente a los eritrocitos inmaduros, que contienen RNA en su citoplasma, de los eritrocitos maduros, que no fluorescen porque carecen de RNA, y como los MN son los únicos elementos que contienen DNA en el eritrocito circulante, pueden ser identificados de manera clara y específica, lo que permitió resolver el problema de distinción de MN verdaderos de cualquier artefacto presente en el citoplasma (Heddle y cols., 2011).

Años más tarde, se empleó el mismo colorante como fluorocromo de tinción supravital en el ensayo de MN, utilizando muestras de sangre periférica y de médula ósea de roedores, ya que este colorante penetra al interior de las células no fijadas y, en el caso de los reticulocitos (eritrocitos inmaduros) emiten fluorescencias rojas y los MN fluorescencias en el espectro de verde amarillento; además solo se requiere poca muestra de sangre periférica para realizar el análisis y proporciona información del estado en que se encuentran los reticulocitos, es decir, un mayor contenido de RNA refleja que son reticulocitos más jóvenes y conforme va disminuyendo, son reticulocitos más maduros (Hayashi y cols., 1990; Heddle y cols., 2011).

A partir de entonces, Hayashi y cols. (2000) hicieron estudios para implementar y estandarizar esta técnica y entre los que se emplearon muestras de sangre periférica de ratas expuestas a 40 productos químicos para evaluar las frecuencias de MN con este método. Inicialmente se sabía que muchas especies, incluida la rata, el perro Beagle y el ser humano, eliminaban activamente las células micronucleadas de la circulación y se creía que esto impediría el uso de muestras de sangre periférica (Heddle y cols., 2011), debido a que sus bazo eliminan eficazmente a los eritrocitos micronucleados de la circulación (Wakata y cols., 1998 en Heddle y cols., 2011). Sin embargo, gracias a muchos estudios se encontró que había una concordancia entre las células de ambos compartimentos, médula ósea y sangre periférica, en los animales empleados, en el caso de las ratas fue de 92% y en ratón de 88%, por lo que se concluyó que la sangre periférica de rata puede ser empleada para el ensayo de MN (Hayashi y cols., 2000; Heddle y cols., 2011), y además se demostró que la evaluación microscópica de MN-RET y MN-ERYT de sangre periférica de individuos esplenectomizados podría usarse como un índice de daño a la médula ósea (Heddle y cols., 2011). Entonces, investigadores como Hayashi y cols. (2000), Abramsson-Zetterberg y cols. (2000), Dertinger y cols. (2003), Bemis y cols. (2008) y Montero-Montoya y cols. (2016), propusieron evaluar los reticulocitos de sangre periférica, a través de diversas metodologías para determinar la frecuencia de daño genotóxico en muestras humanas.

Gracias al desarrollo de técnicas automatizadas como la citometría de flujo, ha resultado útil evaluar las frecuencias de MN-ERYT y de MN-RET de sangre periférica en animales experimentales, pues tiene un gran potencial para mejorar la sensibilidad, reproducibilidad y rendimiento del ensayo tradicional *in vivo* de MN, que utiliza métodos basados en microscopía para la recopilación de datos (Bemis y cols., 2008). Además, con este ensayo se utilizan microlitros de sangre periférica en lugar de sacrificar a los animales para obtener la médula ósea, y se demostró que gracias a la uniformidad de los eritrocitos en sangre periférica y a la falta relativa de gránulos de mastocitos y otras partículas que

podrían ser factores de confusión en el estudio, la determinación de MN sería más específica pues se eliminan los artefactos (MacGregor y cols., 1980). Por ejemplo, Grawé y cols. (1992) determinaron que los MN pueden ser fácilmente cuantificados usando CF y con colorantes específicos para teñir cada tipo de ácido nucleico. Su equipo de investigación empleó Hoechst 33342 para teñir DNA y así identificar a los MN y naranja de tiazol (NT) que tiñe RNA, permitiendo identificar a los reticulocitos jóvenes en sangre periférica, en muestras de ratón. Además, determinaron que para este método se requiere un equipo con dos láseres, que proporcionan un rango de longitudes de onda en las regiones violeta a azul del espectro visible (450 a 640 nm), dando resultados confiables con alta correlación con las determinaciones microscópicas de MN, con la ventaja de poder evaluar 10,00 células en pocos minutos, en comparación con las 2,000 que tomaron mucho más tiempo para ser evaluadas bajo el microscopio (Montero y cols., 2016).

El método mencionado anteriormente, resultó eficaz para sustituir la evaluación microscópica, pero como requiere de un dispositivo citométrico con láser dual, no todos los laboratorios cuentan con éste, por esta razón Dertinger y cols. (1996) sugirieron una alternativa para determinar MN-RET con dispositivos de un solo láser y con un único colorante, naranja de acridina, pero surgieron problemas técnicos debido a la dificultad de diferenciar con precisión la emisión de fluorescencia del DNA (525 nm) y RNA (650 nm), imposibilitando la reproducibilidad de la técnica (Montero y cols., 2016). Por lo que se planteó que el método de usar NT para teñir RNA, propuesto por primera vez por Grawé y cols. (1992), resulta más atractivo para delimitar a la población de RET y en ellos evaluar MN y para hacer más robusto el método hicieron algunas modificaciones a su método, aislando inmunológicamente a los RET-CD71, subpoblación de reticulocitos, y luego enumerar MN mediante el uso de su citofluométrico estándar (Montero y cols., 2016). Sin embargo, éste no solo implica el uso de campos y dispositivos magnéticos para aislar las células, sino también hace que el procesamiento de muestras sea más largo y aumenta el riesgo de variaciones durante el aislamiento (Montero y cols., 2016).

Finalmente, Montero y cols. (2016) desarrollaron una manera más simple para enumerar MN en RET humanos, teniendo como guía el método de Bemis y cols. (2008), debido a su accesibilidad y porque ofrece la posibilidad de determinar la frecuencia de MN en cantidades de microlitros de sangre, realizando algunas modificaciones con base en los protocolos de Abramsson-Zetterberg y cols. (2000) y de Dertinger y cols. (2003) (Montero y cols., 2016).

## ALCANCES Y LIMITACIONES DE LOS SISTEMAS DE MN EN RETICULOCITOS Y EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

En esta sección se muestra una tabla (1) donde se comparan los alcances y las limitaciones de emplear un sistema u otro para evaluar eventos genotóxicos, respecto a la forma en que pueden ser evaluados.

**Tabla 1.** Alcances y limitaciones de los sistemas de MN en los tipos celulares empleados en este estudio.

	Determinación de MN-LINBN con el ensayo del citoma CBMN	Evaluación de MN-RET de sangre periférica con CF
<b>Alcances</b>	<p>Poco invasivo</p> <p>Validado universalmente</p> <p>Práctico y accesible tecnológicamente</p> <p>Observación microscópica de la exposición sistémica <i>in vivo</i> (eventos: MN, PNP, GN, apoptosis y necrosis)</p> <p>Útil para determinar inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos</p>	<p>Poco invasivo</p> <p>Requerimiento menor de muestra para llevarlo a cabo</p> <p>Fácil, confiable y rápido (1 mes)</p> <p>Análisis de un gran número de células (&gt;10,000) en modelos experimentales</p> <p>Alto poder estadístico</p>
<b>Limitaciones</b>	<p>Ocupa más tiempo para la preparación y evaluación (más de un año)</p> <p>Requiere cultivos celulares y un ciclo de proliferación</p> <p>Evaluación de hasta 2,000 células</p>	<p>No estandarizado en seres humanos, debido a la baja frecuencia de reticulocitos en sangre periférica y a la acción del bazo</p>

El ensayo del citoma CBMN permite evaluar daño citogenético en linfocitos, mientras que la técnica de evaluación de MN-RET con citometría flujo, evalúa daño en el linaje eritroide, específicamente en los reticulocitos.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se producen sustancias y compuestos químicos para distintos usos y a los que se está expuesto. Por lo que resulta importante considerar el riesgo que implican sobre la salud humana. Es así, urgente emplear sistemas que permitan evaluar biomarcadores de manera rápida, sencilla y confiable para estimar el riesgo o el efecto que pueden causar dichos compuestos, y así tomar las medidas necesarias de protección a la población humana.

Los micronúcleos representan un biomarcador sensible de daño al DNA, reflejando los efectos de la exposición a diversos agentes genotóxicos y su evaluación se realiza en linfocitos de sangre periférica mediante el ensayo del citoma CBMN, pues es una técnica estandarizada, validada y empleada a nivel mundial para estudios de monitoreo humano. Sin embargo, su preparación y evaluación requieren gran tiempo y aunque se emplea un volumen considerable de sangre solamente se evalúan 2,000 células. El mismo sistema aplicado al estudio de micronúcleos en células de descamación de mucosas, resulta igualmente laborioso, por lo que se propuso el uso de la citometría de flujo para evaluar micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica, técnica que ya está bien estandarizada en roedores, en los que se ha demostrado que es sensible y específica a los efectos de la mayoría de los genotóxicos, es repetible y reproducible, además de que permite analizar un gran número de células con poca cantidad de muestra, dándole al estudio un alto poder estadístico. Por ello, el sistema de MN en reticulocitos en muestras de sangre periférica humanas puede reducir el tiempo empleado en el análisis, además no se requieren cultivos celulares para realizarlo y podrían evaluarse más células que con microscopía óptica, pero aún es necesario analizar si éste puede ser equiparable al sistema de MN en linfocitos, que sería el ensayo de referencia para su validación, en su capacidad de detectar daño genotóxico.

## **HIPÓTESIS**

La frecuencia de daño genotóxico por micronúcleos en linfocitos de sangre periférica de donadores mostrará una correlación con la frecuencia de micronúcleos evaluados en reticulocitos de sangre periférica.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Explorar si dos sistemas utilizados para la evaluación de daño citogenético *in vivo* son comparables en su capacidad para detectar los eventos de genotoxicidad en muestras humanas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar por el método de CBMN la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica.
- Cuantificar por citometría de flujo la frecuencia de MN en reticulocitos de sangre periférica.
- Comparar las frecuencias de MN obtenidas en los sistemas estudiados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA DE ESTUDIO**

Se utilizaron muestras de una localidad control tomadas durante otro estudio de monitoreo humano. Su uso fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, basado en el Código de Ética para Personal Académico y regulaciones nacionales e internacionales. El informe de consentimiento fue obtenido de los padres de los niños que participaron en este estudio. Se contó con un tamaño de muestra de 32 individuos, de 8 a 12 años, de ambos sexos, sanos sin desnutrición ni infecciones, pertenecientes a una comunidad rural-agrícola de Ixtenco, en Tlaxcala. Y aunque, este estudio no es propiamente de exposición, es importante mencionar que la zona donde habitan es una de transición, pues hay carreteras cercanas por lo que hay flujo constante de automóviles y se realizan actividades como quema de leña, por lo que los individuos están expuestos de manera “basal” (contaminación presente en prácticamente todos los ambientes humanos). Las muestras de sangre fueron tomadas por una enfermera especializada, con material nuevo y estéril. Como referencia para el trabajo con citometría de flujo se usaron células de rata, que también fue aprobado por el comité de ética.

### **EVALUACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE EL ENSAYO DEL CITOMA CBMN**

El ensayo del citoma CBMN o método de citocalasina-B se empleó para evaluar MN en linfocitos de sangre periférica, de acuerdo con el protocolo propuesto por Fenech (2007), como se indica a continuación:

#### **SIEMBRA DE LINFOCITOS**

Se sembraron 2 cultivos por cada donador. Cada cultivo contenía 4.3 mL de RPMI con aminoácidos no esenciales y L-glutamina, al 1% cada uno, 0.5 mL de sangre periférica entera y 200  $\mu$ L de fitohemaglutinina, que estimula a las células para entren a ciclo celular.

La sangre se resuspendió cuidando que no se formaran burbujas. Posteriormente, los cultivos fueron incubados a 37 °C.

### **BLOQUEO DE CITOCINESIS**

Transcurridas 44 horas, después de realizar la siembra de linfocitos, se añadieron 4.5 µL de la solución stock de citocalasina-B (5 µg / µL, de la marca Sigma) por cada mililitro de cultivo para arrestar la citocinesis del ciclo celular, impidiendo la separación física del citoplasma en dos células hijas durante la división celular, y los cultivos fueron colocados de nuevo en incubación a 37 °C por 28 horas más.

### **COSECHA DE LINFOCITOS**

Setenta y dos horas, desde el inicio de la siembra, se realizó la cosecha de linfocitos, mediante centrifugación a 298.2 g durante 10 min, se retiró el sobrenadante dejando 0.3 mL, se agitó con vórtex y enseguida a cada muestra se le añadieron 3 mL de fijador (etanol y ácido acético glacial (3:1)) sin dejar de agitar hasta que las muestras se mezclaron bien, cuidando que no se formaran precipitados o coágulos y a continuación se volvieron a añadir 2 mL de fijador y se resuspendieron las muestras, que se volvieron a centrifugar y se les retiró el sobrenadante. Este procedimiento fue realizado 3 veces o hasta que el botón quedó de color blanco y sin impurezas. En la tercera ocasión, después de retirar el sobrenadante, se añadieron 5 mL de fijador a cada una de las muestras y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

### **PREPARACIÓN, TINCIÓN Y MONTAJE DE LAMINILLAS**

Las muestras fueron retiradas de refrigeración y se centrifugaron a 298.2 g a temperatura ambiente durante cinco minutos, enseguida se retiró el sobrenadante, dejando un poco de éste para resuspender el paquete celular. Después se colocaron 5 gotas de cada muestra sobre portaobjetos limpios y se dejaron secar para posteriormente observarlas al microscopio. Se realizó la observación de las laminillas, para asegurar la presencia de células y que estuvieran bien distribuidas en la preparación, con dos microscopios ópticos en contraste de fases, de las marcas Zeiss y Nikon. Las laminillas fueron etiquetadas con

un código y guardadas en refrigeración. Dos días después las laminillas fueron teñidas con el colorante Giemsa-Wright (de la marca Sigma) al 4% en una caja de coplin, durante 5 minutos. Enseguida se enjuagaron con agua de la llave y se dejaron secar con el aire ambiental. Transcurrido el tiempo, se observaron al microscopio óptico para corroborar que se habían teñido los núcleos y el citoplasma de las células y cuando esto ocurrió fueron guardadas en refrigeración durante dos días. Posteriormente, se realizó el montaje de las laminillas, para esto se añadieron dos gotas de resina sintética (de la marca Entellan Merck) sobre los portaobjetos y enseguida se colocaron los cubreobjetos, procurando que no se formaran burbujas y se dejaron secar durante tres días. Finalmente, las laminillas fueron guardadas hasta su análisis.

### **EVALUACIÓN DE LAMINILLAS CON MICROSCOPIA ÓPTICA**

Con microscopía óptica, en un aumento de 200X, primero se realizó el conteo de 500 células viables, en el que se registró el número de células mono-, bi-, tri- o multinucleadas (más de 4 núcleos) para cada cultivo celular, de acuerdo con el método de Eastmond y Tucker (1989), y a continuación, con un aumento de 1000X, se procedió a realizar la evaluación de 2,000 células binucleadas, en las cuales se determinó algún evento genotóxico como MN, PNP, GN o citotóxico, como apoptosis y/o necrosis, con base en los criterios establecidos por Fenech (2007), mencionados a continuación:

#### **A) Criterios de inclusión de células viables mono-, bi- y multinucleadas**

Es importante medir la frecuencia de células viables mono-, bi- y multinucleadas para determinar los efectos citostáticos y la tasa de división mitótica, que son calculados usando el índice de división nuclear (IN). Las células deben tener las siguientes características:

- a) Células con citoplasma intacto y con morfología normal del núcleo; dichas células pueden contener uno, dos, tres o más núcleos.
- b) Pueden o no contener uno o más MN, GN y en el caso de células bi- y multinucleadas pueden o no contener uno o más PNP.

## **B) Criterios de inclusión de células binucleadas**

Para delimitar las células binucleadas con citocinesis bloqueada, deben cumplir con las siguientes características:

- a) Las células deben ser binucleadas.
- b) Los dos núcleos de la célula binucleada deben presentar membranas nucleares intactas y estar situados dentro del mismo límite citoplasmático.
- c) Los dos núcleos deben ser aproximadamente del mismo tamaño y el mismo patrón e intensidad de color.
- d) Los dos núcleos pueden estar conectados por un delgado puente nucleoplásmico, que no sea más grueso que  $\frac{1}{4}$  del diámetro nuclear.
- e) Los dos núcleos pueden estar juntos, pero no traslapados.
- f) La membrana citoplasmática de la célula binucleada debe estar intacta y distinguible del citoplasma de células adyacentes.

## **C) Criterios para considerar y contar micronúcleos**

Los MN son morfológicamente similares al núcleo principal, pero son de menor tamaño y deben tener las siguientes características:

- a) El diámetro del MN en los linfocitos humanos suele variar entre  $\frac{1}{16}$  y  $\frac{1}{3}$  del diámetro promedio de los núcleos principales, que corresponde a  $\frac{1}{256}$  y  $\frac{1}{9}$  de la superficie de uno de los núcleos principales de una célula BN, respectivamente.
- b) Los MN no refractan la luz, por lo tanto, pueden distinguirse fácilmente de artefactos tales como partículas de tinción.
- c) Los MN no están vinculados o conectados a los núcleos principales.
- d) Los MN pueden tocar, pero no se superponen con los núcleos principales y el límite micronuclear debe distinguirse de la frontera nuclear.
- e) Los MN normalmente tienen la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, pero ocasionalmente la tinción puede ser de diferente intensidad.

## DETERMINACIÓN DE LOS EVENTOS REGISTRADOS EN LA EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

Para obtener el índice de nucleación (IN), se empleó la siguiente ecuación, considerando las 500 células viables contadas inicialmente:

$$IN = \frac{M_1 + (2M_2) + (3M_3) + 4M_4}{N}$$

Donde,  $M_1$  = número de células con 1 núcleo (mononucleadas),  $M_2$  = número de células con 2 núcleos (binucleadas),  $M_3$  = número de células con 3 núcleos (trinucleadas),  $M_4$  = número de células con 4 o más núcleos (multinucleadas) y  $N$  = número total de células viables contadas.

Y finalmente, para determinar la frecuencia de cada uno de los eventos (MN, PNP, GN, apoptosis, necrosis y daño combinado) se empleó la siguiente fórmula, tomando en cuenta un mínimo de 2000 células binucleadas:

$$\text{Frecuencia } X = (\text{Número de } X \text{ encontrados} / 2000) \times 1000$$

En donde  $X$  es el evento evaluado.

## EVALUACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO

El proceso de fijación y parte de la tinción de las muestras se realizó con base en el protocolo de Dertinger y cols. (2003) y la tinción con Naranja de tiazol (NT) y Hoechst 33342 se basó en el trabajo de Abramsson-Zetterbeg y cols. (2000) con modificaciones propuestas por Montero y cols. (2016), para evaluar la presencia de reticulocitos micronucleados (RET-MN) presentes en sangre periférica, empleando citometría de flujo, en las mismas 32 muestras sanguíneas provenientes de niños en edad escolar evaluadas con el ensayo del citoma CBMN. Como estándar para esta técnica se usaron reticulocitos de sangre periférica de rata.

## FIJACIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

La fijación de las muestras se realizó en una habitación a temperatura de 4 °C. Previamente se diluyó heparina con amortiguador de solución salina de bicarbonato (BBS) (0.9 g de NaCl (J. T. Baker, Lot. M47C56), 0.0444 g de NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, Lot. 107F-0568), 584 mg EDTA (Invitrogen, Lot. 1137951), y 200 mg de NaN<sub>3</sub> (Gibco BRL, Lot. 1068434)/ 100 mL de agua desionizada), pues se requirió para este punto.

Se tomaron y colocaron 100 µL de sangre de rata en 320 µL de solución heparinizada (500 U/mL de amortiguador BBS) en frío y de sangre humana se tomaron 250 µL en 1.25 mL de solución heparinizada, mezclándose con cuidado para homogeneizar. Posteriormente, se tomaron y colocaron 180 de sangre diluida de rata en un criotubo que contenía 2 mL de metanol (refrigerado a -80 °C, 48 h antes) y 400 µL de sangre de personas en 4 mL de metanol, cuidando que la punta de la pipeta estuviera 1 cm por encima del metanol y que la muestra cayera en el centro, en un sólo impulso y que no escurriera por las paredes, durante este proceso se mantuvo la agitación con un vortex, se tapó y se volvió a mezclar con vórtex durante 5 seg y después manualmente. Inmediatamente, las muestras fueron guardadas a -80 °C en un ultracongelador hasta su uso (Dertinger y cols., 2003).

## TINCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fijadas anteriormente fueron retiradas del ultracongelador y transportadas a un ambiente a 4 °C. Posteriormente, se tomó 1 mL de muestra de humano y se agregó en 11 mL de amortiguador BBS (9 g de NaCl, 444 mg de NaHCO<sub>3</sub>, 584 mg de EDTA, 200 mg azida de sodio en 1 L de agua destilada) con 1% de suero fetal bovino (SFB) (ByProductos, Lot. FB515001) frío y de la muestra de rata se tomaron 0.5 mL y se colocaron en 11.5 mL solución amortiguadora BBS con 1% de SFB y se mezclaron con vórtex por 5 seg. Enseguida, se realizó la centrifugación de las muestras a 466 g durante 10 min, a 4 °C, para lavarlas. Pasado el tiempo de centrifugación, se aspiró el sobrenadante y se dejaron aproximadamente 100 µL de buffer para resuspender el botón. Durante este paso, se preparó la mezcla para marcar a las células con los anticuerpos conjugados con

fluorocromos, Anti-CD71-PE-Cy7 (BioLegend®, Lot. B198700) y Anti-CD61-PE (BioLegend®, Lot. B197459), en tubos de citometría, como se indica en la tabla 2.

Después, de cada muestra de humano y de rata se tomaron 25 µL del botón resuspendido y se colocaron en los tubos para citometría, que contenían la mezcla anteriormente preparada, de acuerdo con la tabla 2, obteniendo un volumen final de 100 µL. Enseguida fueron incubados en frío (2.5 °C) durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente por 60 minutos, en condiciones de oscuridad.

**Tabla 2.** Concentraciones empleadas de fluorocromos conjugados con anticuerpos para el marcaje de las células de interés.

Tubo	Anti-CD61-PE (marcaje plaquetario)	Anti-CD71-PE-Cy7 (marcaje de reticulocitos jóvenes)	Amortiguador BBS + SFB (1%)
Control negativo humano	-	-	75 µL
Muestras de interés (humano)	1 µL (1:100)	5 µL (5:100)	69 µL
Control negativo (rata)	-	-	75 µL
Control positivo (rata)	1 µL (1:100)	1 µL (1:100)	73 µL
Control CD61 (rata)	1 µL (1:100)	-	-
Control CD71 (rata)	-	1 µL (1:100)	74 µL
Control Hoechst 33342 (rata)	-	-	75 µL
Control Naranja de tiazol (rata)	-	-	75 µL

Se muestran las concentraciones empleadas de los anticuerpos conjugados con fluorocromos para un volumen final de 100 µL en cada muestra; en los estándares de rata se emplearon anticuerpos contra antígenos (receptores CD61 y CD71) de este organismo, y en el caso de las muestras de interés (de humano) se emplearon anticuerpos contra los antígenos CD61 y CD71 de humano.

**Tabla 3.** Fluorocromos empleados para marcaje celular de RNA y DNA.

Tubo	Naranja de tiazol (2,000,000 nM en etanol) (tiñe RNA)	Hoechst 33342 (500 nM en agua destilada) (tiñe DNA)	Amortiguador BBS
Controles negativos	-	-	2 mL
Muestras de interés y control positivo rata	2 mL (1:5000)	1.5 µL (1:1333)	-
Control Hoechst 33342 rata	-	1.5 µL (1:1333)	2 mL
Control Naranja de tiazol rata	2 mL (1:5000)	-	-

Indica las cantidades empleadas de los fluorocromos para cada muestra. Los controles negativos para la tinción con naranja de tiazol y con Hoechst 33342, son controles negativos para humano y para rata, es decir, que no contienen ningún tipo de fluorocromo y, los controles para los anticuerpos CD61 y CD71 de rata.

Finalizado el tiempo de la segunda incubación, se realizó la tinción con los colorantes Naranja de tiazol (Sigma, Lot. MRBL5381V) y Hoechst 33342 (Sigma, Lot. 074M4008V), como se indica en la tabla 3.

En esta ocasión, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora, y al finalizar se dejaron reposar 15 minutos a temperatura ambiente y luego fueron guardadas en refrigeración y oscuridad hasta su análisis (máximo 16 horas después para evitar perder la fluorescencia de los colorantes y de los fluorocromos, debido a la degradación de éstos).

### ADQUISICIÓN DE EVENTOS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO

Las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo Attune® Azul-Violeta, que cuenta con un sistema hidrodinámico-acústico para alinear las células suspendidas en un fluido que atraviesan un finísimo tubo transparente, lo que permite la evaluación de células individuales (*“singles”*). Cuenta con un sistema de dos láseres, los cuales excitan a los fluorocromos a longitudes de onda de 488 nm (azul) y a 405 nm (violeta), y con seis canales (BL1, BL2, BL3, VL1, VL2, VL3; los tres primeros pertenecientes al láser azul y los otros al láser violeta) que detectan las diferentes longitudes de onda emitidas por los fluorocromos; ver tabla 4.

**Tabla 4.** Marcadores celulares identificados y fluorocromos usados para cada canal detector y láser.

Canal detector	Láser	Fluorocromo	Espectro de emisión (nm)	Marcador celular
BL1-H	Azul	Naranja de tiazol (NT)	533	RNA
BL2-H	Azul	Ficoeritrina (PE)	570	CD61 (plaquetas)
BL3-H	Azul	PE-Cy7	780	CD71 (receptor de transferrina)
VL1-H	Violeta	Hoechst 33342	460	DNA

Tomada de Montero y cols. (2016).

Como los eritrocitos, tanto inmaduros como maduros, tienden a aglutinarse, se empleó una segunda gráfica de densidad, a partir de la región 1, que se puso en escala lineal y se

eligieron los parámetros de FSC-A (tamaño en área, en el eje X) y FSC-H (tamaño en la altura, en el eje Y), para tener células que concordaran en ambos parámetros y así identificar únicamente a las células individuales, y luego se delimitó una segunda región (R2) con una compuerta poligonal o “*polygon gate*”, a 45° de inclinación, como se observa en la figura 3.

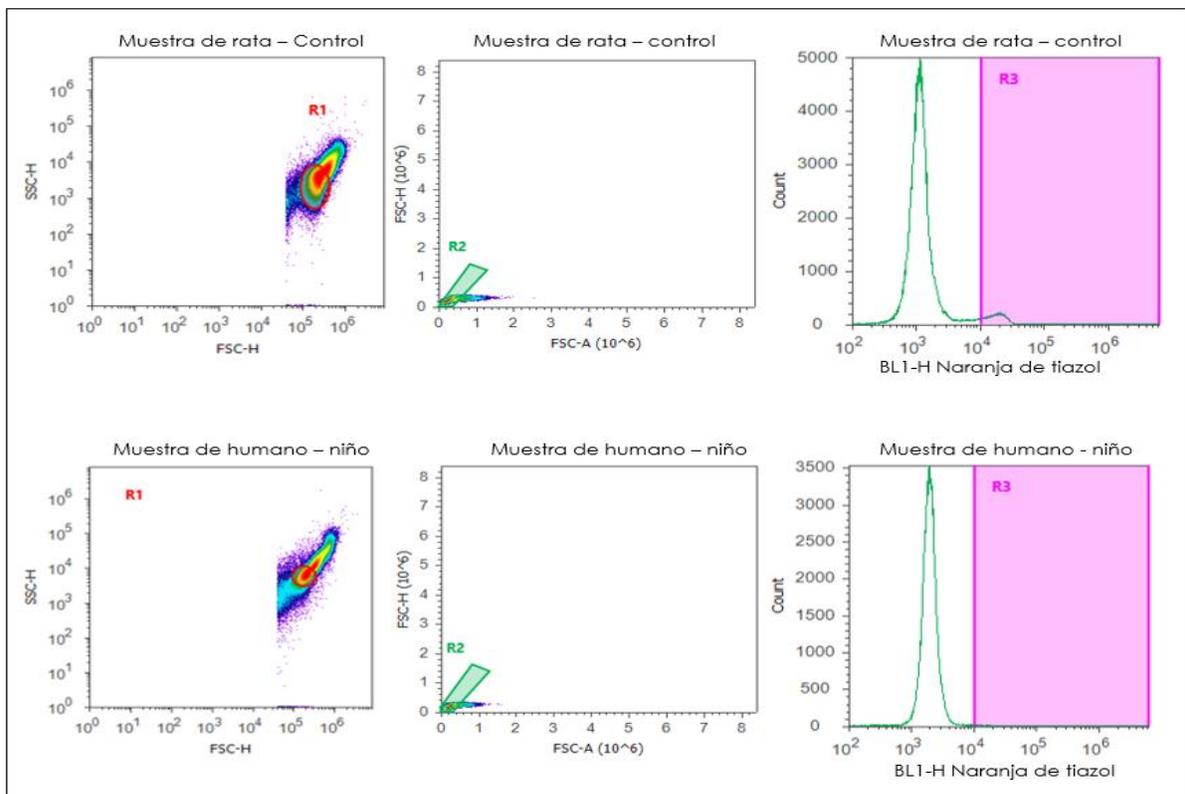
Para distinguir los parámetros de interés, se emplearon histogramas, usando la población celular en la región 2, representando los canales BL1-H, BL2-H, BLE3-H y VL1-H para detectar las fluorescencias de naranja de tiazol (533nm), ficoeritrina (570nm), ficoeritrina Cy7 (780nm) y Hoechst 33342 (460 nm), respectivamente, ver tabla 4. Luego se delimitaron las regiones o compuertas R3-R6 con la opción “*histogram gate*” en cada uno de ellos, para obtener las zonas donde la fluorescencia fue positiva para los diferentes fluorocromos. En el primer histograma (Fig. 3), en la región positiva para naranja de tiazol (R3) se localizan las células con contenido de RNA, es decir, reticulocitos. En la región positiva del segundo histograma (R4) (Fig. 4) se encontraron células positivas para ficoeritrina-Cy7, que estaba conjugado con el anticuerpo anti-CD71, por lo tanto se obtuvieron reticulocitos que aún portaban el receptor de transferrina; en el tercer histograma (R5) se encontraron las células positivas para ficoeritrina, que en este caso correspondían a las plaquetas pues el fluorocromo empleado estaba conjugado con el anticuerpo anti-CD61, marcaje plaquetario y en el cuarto histograma se delimitó la región positiva (R6), correspondiente a células nucleadas.

Para realizar la evaluación, primeramente, se siguió el protocolo de encendido del equipo y se verificó que estuvieran en funcionamiento correcto. Se formó una carpeta para cada experimento y se acondicionó un área de trabajo, previo al inicio de cada adquisición en el citómetro.

El área de trabajo para adquirir siempre consistió en: poner la primera gráfica de densidad o “*density plot*” en escala logarítmica para ambos ejes, elegir los parámetros de tamaño (FSC-H, del inglés: *forward scatter* o dispersión de frente, en el eje X) y de granularidad

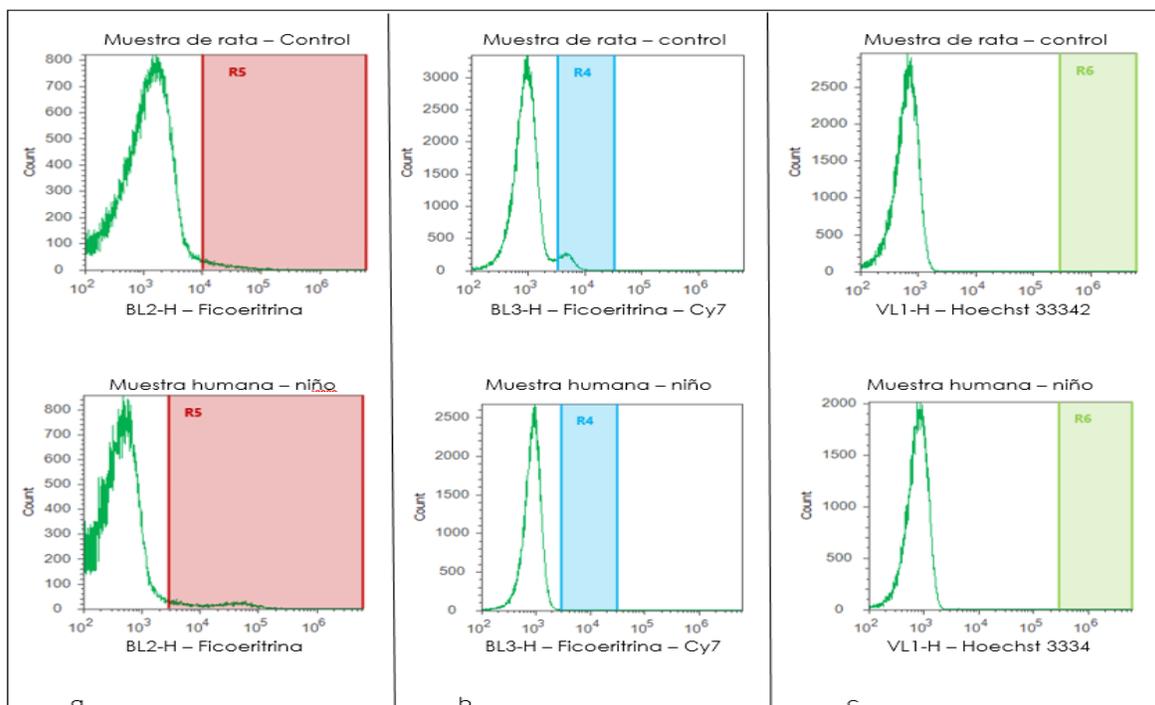
o complejidad (SSC-H, del inglés: *side scatter* o de dispersión de lado, en el eje Y) y además se delimitó la región 1 (R1) con una compuerta oval (*oval gate*), en donde aparecen las células rojas de la sangre (eritrocitos totales) (figura 3).

Ya elaborado el espacio de trabajo, se prosiguió a realizar la compensación, que es importante porque a veces las fluorescencias emitidas por los distintos fluorocromos se pueden traslapar. Para ello se ocuparon los controles de tinción preparados con muestra de rata y en este punto se ajustaron los voltajes para posicionar a las poblaciones de la primera gráfica de densidad y de los histogramas.



**Figura 3.** Espacio de trabajo para adquirir datos: En las gráficas superiores se muestra la adquisición con una muestra de rata y en las gráficas inferiores se observa la adquisición con una muestra humana. La primera gráfica fue empleada para delimitar la región en la que se encuentran los eritrocitos totales (R1) y excluir otros tipos celulares; la segunda gráfica se empleó para obtener células individuales, a partir de la región R1 y delimitada como R2; el histograma corresponde al canal BL1-H, que detecta la emisión del naranja de tiazol: si las células contenían RNA entonces daban positivo para este colorante, delimitando así la región positiva (R3). Se observa que el número de estas células en sangre de rata es mayor que en la sangre humana.

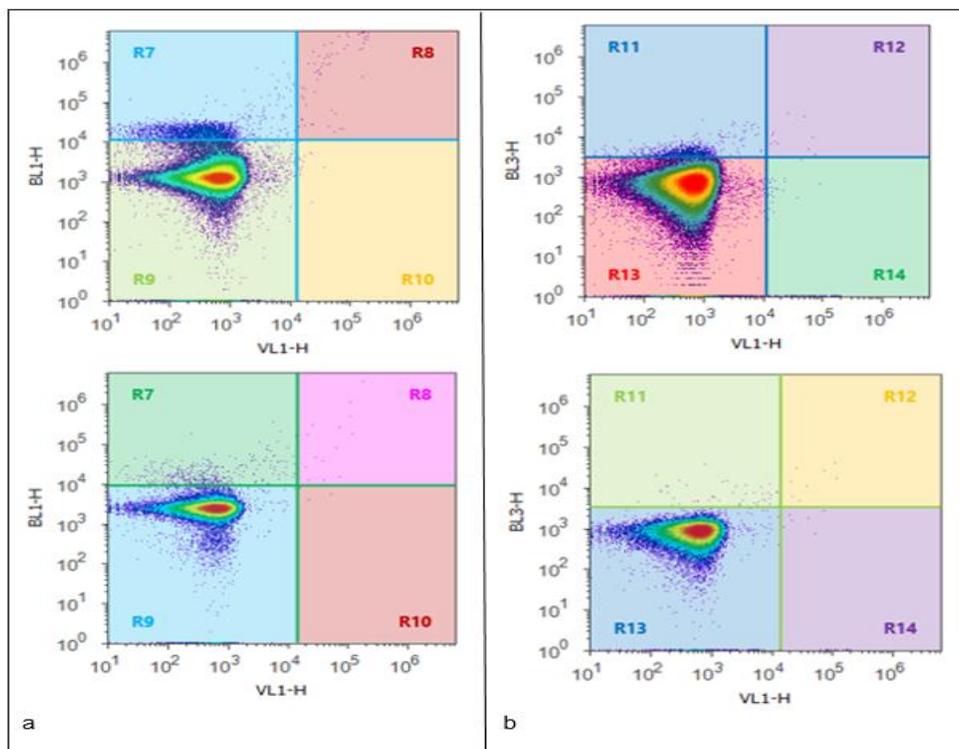
Finalmente se analizaron las muestras de interés, pero primero se adquirieron el control negativo de la muestra de humano, para visualizar las regiones negativas y el control positivo de rata, para asegurar que la tinción fuera correcta, ya que en sangre hay mayor frecuencia de reticulocitos en ratas que en humanos. En el histograma del canal BL1, por cada adquisición se obtuvieron aproximadamente 3,000 y 10,000 reticulocitos positivos a naranja de tiazol en R3, en muestras de personas y de rata, respectivamente, realizando 6 adquisiciones por cada muestra humana, cada una de 300  $\mu\text{L}$ . Y al final, los datos recopilados se almacenaron junto con la configuración y la matriz de compensación en un archivo que se ocupó después para analizar la información en otra computadora, con el software Attune® versión 2.1.



**Figura 4.** Histogramas para delimitar las regiones positivas de los distintos fluorocromos. En la parte superior se observa la adquisición con muestra de rata y la parte inferior corresponde a la adquisición con muestra humana. a) histogramas correspondientes al canal BL2-H, que detecta le emisión de ficoeritrina, identificando y delimitando la región positiva (R5), perteneciente a las plaquetas; b) histogramas del canal BL3-H, que detecta la emisión de ficoeritrina-Cy7, correspondiente a células portadoras del receptor de transferrina, delimitadas en la región R4, observar que hay mayor fluorescencia en la muestra de rata que en humano, corroborando así que es más bajo el porcentaje de reticulocitos CD71+ en humanos; y c) histogramas del canal VL1-H, que detecta la emisión de Hoechst 33342, obteniendo la región positiva R6, que delimita a células nucleadas.

## DETERMINACIÓN DE REGIONES PARA OBTENER EVENTOS

El análisis se realizó con el software citométrico *Attune®* versión 2.1. Primero, con las compuertas ya realizadas previamente, en el momento de la adquisición, se generaron compuertas derivadas (*derived gates*) de la siguiente manera: NOT-R5 (para excluir a las plaquetas) y NOT-R6 (para excluir a las células nucleadas), luego se seleccionaron en conjunto estas dos compuertas (NOT-R5 AND NOT-R6) para excluirlas del estudio y finalmente se seleccionó la compuerta R2 como la población en la cual se evaluaron los MN, que corresponde solamente a los eritrocitos (NOT-R5 AND NOT-R6 AND R2). Esta compuerta derivada fue empleada en las gráficas que se muestran en la figura 5 para obtener los siguientes datos: células naranja de tiazol positivas (reticulocitos) que corresponden a R7, células positivas a naranja de tiazol y a Hoechst 33342 (reticulocitos con micronúcleos) que corresponden a R8, células negativas para ambos fluorocromos (eritrocitos maduros) que corresponden a la región R9, en el cuadrante inferior izquierdo, y células positivas a Hoechst y negativas a naranja de tiazol (eritrocitos maduros con micronúcleos) localizados en la región R10. Se estableció un umbral de valor de  $10^4$  en la gráfica de VL1-H (canal de detección de la emisión de Hoechst 33342) vs BL1-H (canal detector de la fluorescencia de naranja de tiazol) para separar claramente células negativas o débilmente positivas de las más brillantes en el canal BL1-H, para contar solo los reticulocitos más jóvenes con más RNA en el citoplasma y usar este parámetro para calcular la frecuencia de micronúcleos en los reticulocitos (Fig. 5a). Para determinar la cantidad de células CD71+ con y sin micronúcleos, se utilizó un segundo gráfico de densidad que muestra los canales VL1-H vs BL3-H (canal detector de la fluorescencia de ficoeritrina Cy7) (Fig. 5b), en la cual se usaron las regiones R11 y R12 para la evaluación de células positivas a CD71, y negativo (R13) o positivo (R14) a Hoechst.



**Figura 5.** Gráficos de densidad correspondientes a muestras de humano (inferiores) y de rata (superiores).

## CUANTIFICACIÓN DE EVENTOS

Como se mencionó anteriormente, de cada muestra se realizaron seis adquisiciones en el citómetro de flujo. Por lo tanto, la información correspondiente a cada región de las gráficas fue registrada en una hoja de Excel para realizar el análisis. Primero se sumaron los datos obtenidos en las seis adquisiciones de cada muestra y luego se calcularon las frecuencias de micronúcleos como se presenta en la tabla 5.

**Tabla 5.** Parámetros determinados usando la información obtenida de las regiones específicas.

Parámetros determinados	Regiones específicas / subpoblación evaluada*
Frec. Reticulocitos NT+	$[(R7+R8) / (\text{NOT-R5 AND NOT-R6 AND R2})] \times 100$
Frec. Ret. CD71+	$[(R11+R12) / (\text{NOT-R5 AND NOT-R6 AND R2})] \times 100$
Frec. MN-RETNT+	$[R8 / (R7+R8)] \times 100$ (sólo reticulocitos NT+)
Frec. MN-ERYT	$[R10 / (R9 + R10)] \times 100$ (sólo eritrocitos maduros)
Frec. MN-RETCD71+	$[R12 / (R11+R12)] \times 100$ (sólo reticulocitos CD71+)

\*Se refiere a la subpoblación determinada para identificar las compuertas o las regiones. “Reticulocitos NT+” indica toda la población de reticulocitos positiva a naranja de tiazol, en donde está incluida toda la subpoblación positiva a CD71.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los programas estadísticos empleados para este trabajo fueron STATA® versión 12 y SPSS® versión 20.0. Con el primer programa se obtuvieron histogramas de distribución de los datos y se determinó si correspondían a una normal mediante la prueba estadística de normalidad Shapiro-Wilk porque el tamaño de la muestra fue de  $n=32$ , considerando valores de  $P<0.05$  como significativos, cada una de las variables de estudio. Con el segundo programa se realizó el análisis estadístico para determinar si había relación entre los dos sistemas evaluados, empleando la prueba estadística de correlación de Spearman, para datos sin distribución normal. Se compararon las frecuencias de MN de ambos sistemas; del primer sistema se emplearon las variables de MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERYT y del segundo MN-LINFBN y daño total (que incluyó MN-LINFBN más los eventos de daño combinado, es decir, más de dos eventos genotóxicos (MN, PNP o GN) encontrados en una célula, ya que los dos últimos pueden contribuir a la formación de MN (Kirsch-Volders y cols., 2014)). Se consideró un intervalo de confianza del 95% en las pruebas estadísticas empleadas.

## RESULTADOS

Las 32 muestras utilizadas para este estudio correspondieron a niños, de entre 8 a 12 años, de una comunidad rural-agrícola del Estado de Tlaxcala y los resultados fueron organizados de acuerdo con los dos sistemas evaluados para determinar las frecuencias de MN.

### DETERMINACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

El índice de nucleación (IN), para los diversos cultivos celulares de cada individuo, se obtuvo del conteo de 500 células para determinar la frecuencia de éstas con 1, 2, 3 ó 4 núcleos, con base en el método de Eastmond y Tucker (1989). El valor promedio de este parámetro fue de 1.92.

Para obtener la frecuencia de MN y otros eventos de genotoxicidad, como gemaciones nucleares y puentes nucleoplásmicos en linfocitos, se evaluaron 2,000 células binucleadas por individuo, estableciendo los eventos de acuerdo con la metodología establecida por Fenech (2007); las frecuencias obtenidas se observan en la tabla 6.

Se observa que para cada evento el valor mínimo fue cero y en el caso de MN-LINFBN el valor máximo fue de 6.50‰, es decir, que en algún(os) individuo(s) se encontraron hasta 7 MN por cada mil células evaluadas. En cuanto a las GN el valor máximo fue de 4.5‰, y en el caso de daño combinado y PNP fue de 5‰, indicando que por cada mil células evaluadas en algún(os) individuo(s) se encontraron hasta máximo 5 GN, 5 PNP y 5 eventos de daño combinado. Los valores de citotoxicidad, determinados por la proporción de células que expresan muerte celular, por apoptosis o necrosis, tiene valores máximos de 2 y 1, respectivamente. También se observa que el valor de la mediana de MN-LINFBN es de 1.5‰.

**Tabla 6.** Medidas de tendencia central en el ensayo del citoma CBMN, en células binucleadas.

	MN (‰)	GN (‰)	PNP (‰)	DC (‰)	Apoptosis (‰)	Necrosis (‰)
Promedio	1.67	1.37	1.33	0.91	0.19	0.08
Desviación estándar	1.32	1.23	1.34	1.31	0.44	0.18
Mediana	1.50	1	1	0.50	0	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	6.50	4.50	5	5	2	0.50

MN (micronúcleos); GN (gemaciones nucleares); PNP (puentes nucleoplásmicos); y DC (daño combinado, más de dos eventos de genotoxicidad encontrados en una célula). Se evaluaron 2,000 células binucleadas por individuo. ‰ - eventos por cada mil células binucleadas.

## CUANTIFICACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Para realizar esta técnica se emplearon los protocolos propuestos por Dertinger y cols. (2003) y por Abramsson-Zetterbeg y cols. (2000), con modificaciones de Montero y cols. (2016), utilizando la citometría de flujo.

Primero se obtuvieron los valores de tendencia central de los datos sin procesar (Tabla 7) y también los valores de las frecuencias de MN (marcados e identificados con el colorante Hoechst 33342) en células rojas de la sangre, es decir, en eritrocitos maduros que por sí solos no expresaron fluorescencia, a menos que hubieran contenido MN (denominados como MN-ERYT), y en sus precursores, tales como RET (marcados e identificados por su contenido de RNA, gracias a la fluorescencia emitida de células que fueron positivas a naranja de tiazol; los que contenían MN fueron positivos también para Hoechst 33342; denominados MN-RET) y la fracción más joven de éstos, que son los reticulocitos portadores del receptor de transferrina (RETCD71) (marcados e identificados con el anticuerpo anti-CD71-PE-Cy7, además del colorante Hoechst 33342 si contenían MN, denominados MN-RETCD71), así como los porcentajes de RETNT y de RETCD71 presentes en sangre periférica; los valores se reportan en la tabla 8, y en la figura 6 se

muestra un esquema que ejemplifica el tipo de células que se evaluaron en este estudio con citometría de flujo y se indican sus respectivos porcentajes.

Las células portadoras del receptor de transferrina son una subpoblación de los reticulocitos por lo que su porcentaje equivale solamente a la fracción de reticulocitos que lo portan del total de los reticulocitos identificados con naranja de tiazol. En el esquema también se observan los compartimentos de médula ósea y sangre periférica, pues el daño genotóxico ocurre durante la hematopoyesis en la médula, y el daño se evaluó en las células que han entrado al torrente sanguíneo.

En este caso, los valores mínimos para cada variable en este sistema tienen mucha variación. De los datos sin procesar, el valor mínimo de MN-RET fue de 5, mientras que MN-RETCD71 y MN-ERYT de cero y los valores máximos son más elevados en MN-RET (1051) que en MN-RETCD71 (197) o MN-ERYT (253). Sin embargo, también el valor máximo de RET evaluados fue de 26,169 y RETCD71 de 3,349, siendo más bajo éste segundo. Por esta razón, también al determinar las frecuencias de MN en los dos tipos de reticulocitos, se ve incrementado en RETCD71 a comparación de los RET, siendo en promedio de 7.22% y de 3.66%, respectivamente, y también sus medianas se van desplazando hacia la derecha (6.33% y 3.65%).

**Tabla 7.** Medidas de tendencia central de los datos obtenidos antes de calcular las frecuencias.

	MN-RET	MN-EYRT	MN-RETCD71	RET	RETCD71
Promedio	440	104	81	12,119	1,178
Desviación estándar	283	67	56	6,124	751
Mediana	388	113	81	9968	1210
Mínimo	5	0	0	3466	179
Máximo	1051	253	197	26169	3349

Datos sin procesar. Para obtener estos números se hicieron seis adquisiciones en el citómetro por cada muestra.

**Tabla 8.** Medidas de tendencia central en la evaluación con citometría de flujo.

	MN-RET (%)	MN-ERYT (%)	MN-RETCD71 (%)	RET <sup>a</sup> (%)	RETCD71 <sup>b</sup> (%)
Promedio	3.66	0.006	7.22	0.89	0.08
Desviación estándar	2.15	0.003	4.83	0.51	0.05
Mediana	3.65	0.005	6.33	0.80	0.07
Mínimo	0.14	0	0	0.32	0.02
Máximo	11.20	0.02	20.41	2.92	0.22

Se reportan los porcentajes de RET y RETCD71, así como las frecuencias de MN en RET (positivos a NT), en RETCD71 (portadores del receptor de transferrina) y en ERYT (eritrocitos maduros). % - representa el porcentaje de cada evento de interés respecto al total de células evaluadas en cada caso, según se explica en el texto. a. % de RET con base en la población total de eritrocitos. b. % de RETCD71 con base en la población total de RET.

## CORRELACIÓN ENTRE LAS FRECUENCIAS DE MICRONÚCLEOS EN LOS DOS SISTEMAS

Primero se empleó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para ver la distribución de los datos y determinar si presentaban una distribución normal y, con una significancia de  $P < 0.05$ , se concluyó que los datos no corresponden a una normal, con excepción de la variable de MN-ERYT, como se observa en la tabla 9. Los valores de  $P$  de las otras variables (MN-RET, MN-RETCD71, RET, RETCD71, MN-LINFBN y daño total CBMN (que incluyen células binucleadas con MN y células binucleadas con daño combinado)) informan que no corresponden a una distribución normal.

**Tabla 9.** Estadístico de normalidad (Shapiro-Wilk  $n < 50$ ).

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico de prueba	g.l.	Valor de $P$
MN-RET (%)	0.914	32	0.014*
MN-ERYT (%)	0.959	32	0.262
MN-RETCD71 (%)	0.915	32	0.015*
RET (%)	0.817	32	0.000*
RETCD71 (%)	0.902	32	0.007*
MN-LINFBN (‰)	0.870	32	0.001*
Daño total CBMN (‰)	0.876	32	0.002*

\*Variables con valor de  $P < 0.05$ , lo que significa que no presentan una distribución normal. g.l = grados de libertad, con  $n=32$ .

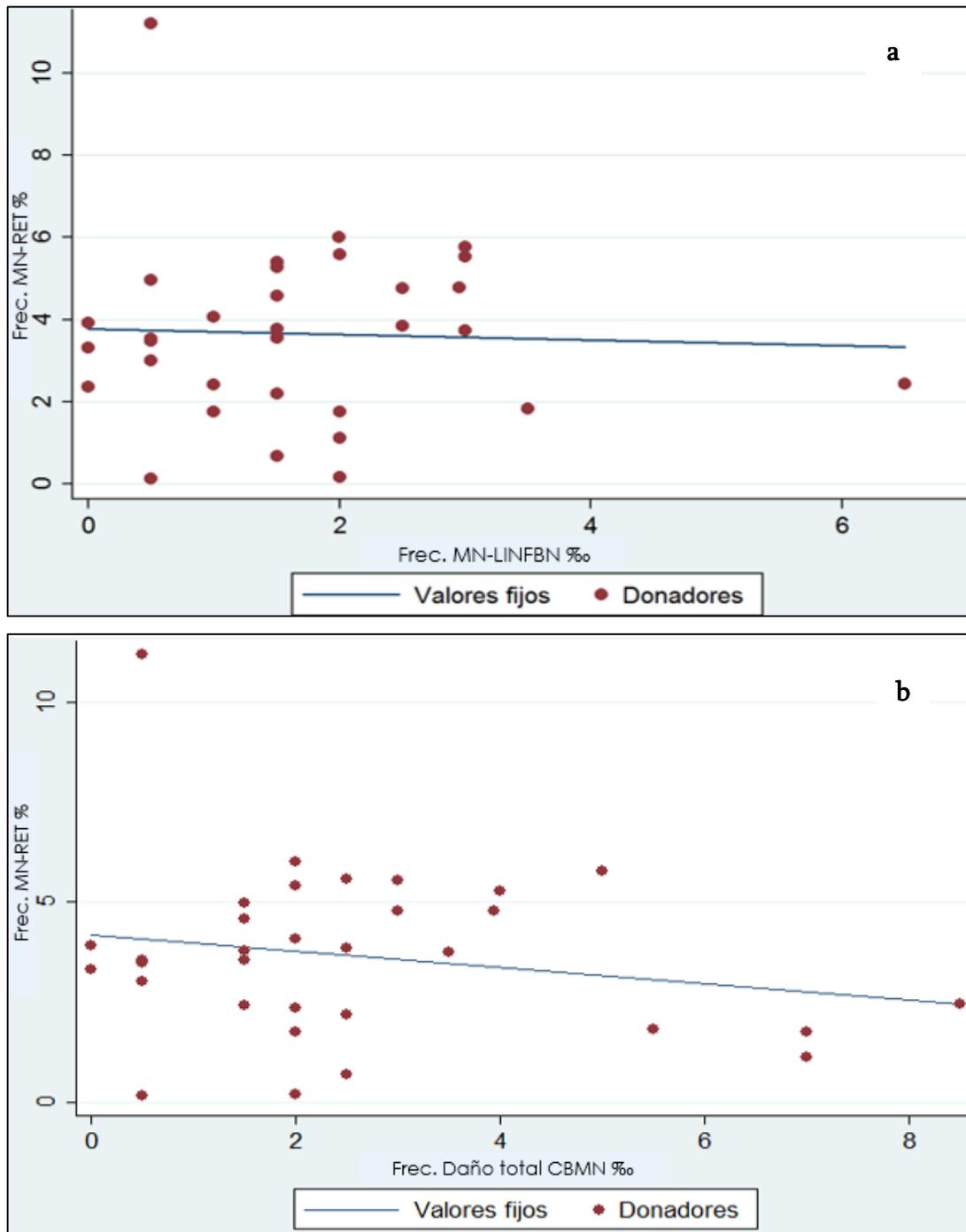
Como el nivel de significancia, en la prueba de normalidad para determinar la distribución de los datos, no resultó significativo, más que para la variable MN-ERYT, se ocupó la prueba de correlación no paramétrica de Spearman para obtener el coeficiente de relación entre las variables de evaluación de daño citogenético (MN-RET, MN-ERYT, MN-RETCD71, MN-LINFBN, daño total CBMN (MN-LINFBN + daño combinado en una célula binucleada). Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos para esta prueba estadística.

La prueba estadística de Spearman indicó que no existe relación entre los dos sistemas de evaluación de daño genotóxico, MN-RET y MN-LINFBN, evaluados con CF y mediante el ensayo del citoma CBMN, respectivamente. Este resultado se sustenta ya que los valores de probabilidad no son estadísticamente significativos, como se observa en la tabla 10 (relación numérica) y en la figura 7 (relaciones gráficas entre algunas de las variables), donde se observa una dispersión de los datos, alejándose de la línea de los valores esperados. Por lo tanto, se concluyó que los sistemas no son equiparables en su capacidad de detectar daño genotóxico en muestras humanas de niños sanos, siendo mayor la frecuencia de MN-RET que MN-LINFBN.

**Tabla 10.** Relación numérica (correlación de Spearman).

	Correlación de Spearman		
	Estadístico de prueba	n	Valor de $P$
MN-RET vs MN-LINFBN	0.483	32	0.129
MN-RET vs daño total CBMN	-0.877	32	0.280
MN-RETCD71 vs MN-LINFBN	0.044	32	0.813
MN-RETCD71 vs daño total CBMN	0.203	32	0.265

Se observa la relación numérica entre las variables obtenidas con los dos sistemas de evaluación de daño citogenético, ensayo del citoma CBMN y RET-MN empleando citometría de flujo. Valores estadísticamente no significativos, por lo tanto, no existe relación entre las variables ( $P < 0.05$ ).



**Figura 7.** Relación gráfica entre algunas variables obtenidas con los dos sistemas de evaluación de daño citogenético, ensayo del citoma CBMN y RET-MN empleado citometría de flujo. La relación entre las variables fue determinada con el análisis de correlación de Spearman, considerando valores de  $P < 0.05$  como estadísticamente significativos. Las gráficas de relación representan lo siguiente: a) MN-RETNT+ vs MN-LINFBN, con valor de  $R^2=0.0016$  con valor “rho” =0.04 y b) MN-RETNT+ vs daño total CBMN, valor de  $R^2=0.0394$  con valor de “rho”=0.20;  $P < 0.05$  en los dos casos, indicando que no existe relación entre las variables.

## DISCUSIÓN

Las muestras empleadas, para determinar la relación de los dos sistemas de evaluación de daño citogenético, fueron provenientes de niños, de entre 8 y 12 años, del Estado de Tlaxcala, los cuales están expuestos ambientalmente de manera “basal”, contaminación presente en prácticamente todos los ambientes que habita el ser humano, relacionándose, principalmente, con el humo originado por la quema de combustibles.

Se evaluaron linfocitos de sangre periférica en el ensayo del citoma CBMN y reticulocitos de sangre periférica en la evaluación automática con citometría de flujo para determinar las frecuencias de daño genotóxico; numéricamente los valores obtenidos en este estudio son equiparables con los reportados en otros estudios realizados en niños, para ambas metodologías; ver tablas 11 y 13. Sin embargo, no se encontró correlación entre los dos sistemas, siendo mayor la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos comparada con la de linfocitos. Esto podría deberse a que presentan una vida divergente, es decir, primero que la tasa de recambio es mayor en el linaje eritrocitario (intervalo mitótico “IM” de 16 h) que en el linaje linfocítico (con IM de 24 h), segundo, que la producción del linaje eritrocitario se restringe a la médula ósea y maduran ahí mismo y posteriormente en la sangre periférica, teniendo un tiempo de vida de 120 días, mientras que el linaje linfocítico, aunque puede ser originado en médula ósea, su tiempo de vida es muy corto (3-5 días), mientras que las que se producen en los ganglios linfáticos tienen periodos de vida más prolongados (meses a años), siendo estos linfocitos los que encontramos mayormente en la sangre periférica. Por lo tanto, aunque se emplearon muestras de sangre periférica para este trabajo, es muy probable que los dos tipos celulares evaluados hayan sido originados en tejidos diferentes y con tasas de recambio más altas para los eritrocitos, lo que los haría más susceptibles de sufrir daño al DNA. Esta misma alta tasa de recambio llevará a la rápida eliminación de las células dañadas, por lo que se considera que la presencia de MN en reticulocitos informa sobre daño reciente en el organismo, mientras que, en linfocitos el daño podría ser más antiguo (Costa y cols., 2011).

## EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

El ensayo del citoma CBMN se ha convertido en uno de los métodos mayormente empleado para medir daño cromosómico en linfocitos humanos (Fenech, 2006, 2007), ya que además de evaluar la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas, un biomarcador de ruptura cromosómica y/o pérdida cromosómica, también permite medir otros importantes biomarcadores (Chen y cols., 2010; Fenech, 2010; Thierens y Vral, 2009) como son los PNP, un biomarcador de la reparación errónea de DNA y/o fusión terminal de los telómeros que representan cromosomas dicéntricos y en anillo, así como las GN, un biomarcador de eliminación de DNA amplificado y/o complejos de reparación de DNA (Fenech, 2010; Fenech y cols., 2003; Umegaki y Fenech 2000).

Las frecuencias de MN (1.67‰), PNP (1.32‰) y GN (1.37‰) obtenidas en este estudio son numéricamente similares a las reportadas en otros trabajos realizados en niños, de entre 4 a 14 años, específicamente con los resultados de niños pertenecientes a los grupos controles, como se indica en la tabla 11, presentando variaciones entre cada población. Aunque los valores de este trabajo son numéricamente más bajos que los que reportaron en los estudios de Milosevic y cols. (2005) y de Gajski y cols. (2010), los rangos pueden ser equiparables y las diferencias pueden deberse, posiblemente, a cambios poblacionales, de estilos de vida, etc. de cada grupo de estudio.

Otro parámetro que comparamos con los estudios que lo reportan (ver tabla 11), es el índice de nucleación (IN), que es una medida de la respuesta al mitógeno empleado, fitohemaglutinina, que estimula a los linfocitos T en cultivo para que entren a división celular; este valor puede ir de 1 hasta más de 2, en las condiciones de cultivo, siendo 1 el más bajo posible (indicando que las células no se han podido dividir, por lo tanto, son mononucleadas) y los valores cercanos a 2, indican que la mayoría de las células en los diferentes cultivos completaron una división celular y, por lo tanto, casi todas son binucleadas (Fenech, 2007). El valor en esta investigación fue de 1.92 el cual, además de

encontrarse en los rangos reportados por Fenech (2007), se asemeja al IN reportado en el grupo de niños controles en otros estudios, como se observa en la tabla 11.

**Tabla 11.** Frecuencias de MN-LINFBN, en el ensayo del citoma CBMN, reportadas en otros estudios.

Exposición	Frec. MN Grupo control (‰)	Frec. MN Grupo expuesto (‰)	Otros parámetros (‰; excepto IN)	Tipo celular; método de análisis; características del grupo de estudio	Referencias
Bifenilos policlorados y metales pesados n= 61	3.30 (n=25)	8.13 (n=36)	-	Linfocitos de sangre periférica; método de citocalasina-B; un día de nacidos	Milosevic y cols., 2005
Radiación X n=20	3.10 (antes: a)	6.10 (después: d)	IN (a: 2; d: 2.20) PNP (a: 2.20; d: 5.25) GN (a: 1.75; d: 4.05)	Linfocitos de sangre periférica; método de citocalasina-B; niños de 4 a 14 años con enfermedad pulmonar	Gajski y cols., 2010
Contaminación radioactiva n=74	2 (n=30)	7.4 (afectados, n=16); 3.61 (no afectados, n=28)	-	Linfocitos de sangre periférica; método de citocalasina-B; niños de 9 a 14 años (afectados con tumor de la glándula tiroides)	Zotti-Martelli y cols., 1999
Contaminación en zona urbana en Ecatepec, Edo. de México n=62	1.10	-	IN (1.70) PNP (0.53) GN (3.02)	Linfocitos de sangre periférica; método de citocalasina-B; niños en edad escolar	Datos no publicados, obtenidos en el laboratorio
Contaminación basal en zona rural del Edo. de Tlaxcala n=32	1.67	-	IN (1.92) PNP (1.32) GN (1.37)	Linfocitos de sangre periférica; método de citocalasina-B; niños de 8 a 12 años	Este estudio

Se observan las frecuencias de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica en muestras de niños de entre 4-14 años, reportadas en otros estudios que realizaron biomonitorio humano, mediante el ensayo del citoma CBMN; índice de nucleación (IN), gemaciones nucleares (GN); puentes nucleoplásmicos (PNP).

## EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO EN RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

En años recientes se han desarrollado metodologías y técnicas automatizadas que permiten la evaluación de daño citogenético en muestras humanas para obtener las frecuencias de micronúcleos en reticulocitos (MN-RET) de sangre periférica, como el uso de la citometría de flujo, ya que de esta manera se reducen los tiempos de análisis, además de obtenerse un alto poder estadístico debido a que se pueden evaluar más células que con microscopía óptica (Cervantes-Ríos, 2014).

Aunque esta técnica sigue en desarrollo para analizar muestras humanas, en este estudio se evaluaron muestras de sangre periférica de niños, de entre 8 a 12 años habitantes de una comunidad rural-agrícola, obteniendo porcentajes similares a los que reportaron otros autores (ver tabla 12) de RET de 0.89% y de la subpoblación de éstos, los RET-CD71 (portadores del receptor de transferrina), de 0.08%. Como se observa, los valores de los RET-CD71 son muy bajos comparados con el porcentaje de reticulocitos identificados por su contenido de RNA en el citoplasma (ver tabla 7). Esto debido a que, de acuerdo con Woolley y colaboradores (2005), el receptor de transferrina se pierde rápidamente en la maduración de este tipo celular en sangre, mientras que el contenido de RNA, detectado por el colorante naranja de tiazol, toma de 24-48 horas para ser metabolizado (Bessman, 1990; Hughes-Jones y Wickramasinghe, 1996), permitiendo que en estas últimas células se puedan detectar eventos de daño genotóxico reciente (Montero y cols., 2016). Por lo tanto, se considera pertinente enfocarse en el marcador de identificación de RNA en citoplasma en los reticulocitos para evaluar MN.

**Tabla 12.** Frecuencias reportadas de reticulocitos en sangre periférica en humanos.

Marcadores de identificación		Referencias
RNA en citoplasma (%)	Receptor de transferrina CD71* (%)	
0.5-3	-	Hatton y cols., 2013
-	0.05-0.5	Dertinger y cols., 2003; 2002
3.9	0.1	Montero y cols., 2016
0.89	0.08	Este estudio

Tomada y modificada de Montero y cols., 2016. \*: Reticulocitos portadores del receptor de transferrina (subpoblación más joven de este tipo de células). Este receptor se pierde rápidamente en la maduración de estas células en sangre.

En cuanto a las frecuencias de MN, los resultados de esta investigación no son numéricamente equiparables con los valores reportados en otros estudios (ver tabla 13), tal vez porque aquellos se enfocaron sólo en la identificación de RETCD71 para evaluar MN. En este trabajo se usó la población celular mayor, reconocida por el contenido de RNA en su citoplasma (Tablas 7 y 8), los RET.

Las frecuencias promedio de MN en reticulocitos en este trabajo, identificados por su contenido de RNA en citoplasma, fueron de 3.658%, y en cuanto a MN-RETCD71 de 7.219%, siendo más elevada en esta subpoblación que en la total de reticulocitos. Esto puede explicarse porque el promedio de la suma total de los datos sin procesar de las 32 muestras analizadas, para reticulocitos identificados por su contenido de RNA fue de 12,119 y en éstos se identificaron 440 MN, en promedio (ver Tabla 7) y en la subpoblación de reticulocitos, los RET-CD71, el promedio fue de 1,178 y en éstos se identificaron 81 MN, corroborando que hay más reticulocitos identificados por su contenido de RNA que por el receptor de transferrina CD71, y por lo tanto, al momento de determinar las frecuencias, se ve más elevado el número de MN en RETCD71 que en RET. Estos números son superiores a los reportados anteriormente en niños (Montero y cols., 2016) de la misma comunidad, lo cual indica que la distribución de estos datos es mayor a lo descrito anteriormente y que al incrementar el número de estudios se tendrá una mejor determinación de los valores basales. No obstante, es de esperar que la distribución probablemente varíe entre poblaciones, de la misma manera que varía la frecuencia de MN en el sistema de MN en linfocitos (Alvarado-Hernández y cols., 2013), mostrado en tabla 11.

Todo lo anterior, nos indica que se requiere seguir estandarizando y usando la evaluación de MN-RET para poder determinar las frecuencias basales de daño genotóxico en este tipo celular en poblaciones sanas y, posteriormente, emplear universal y ampliamente el sistema en estudios de monitoreo humano.

**Tabla 13.** Frecuencias de MN-RET en niños, reportadas en otros estudios que emplearon la citometría de flujo.

Exposición	Frec. MN-RET (%)	Frec. MN-RETCD71 (%)	Referencias
Rayos X por tomografía computarizada o cateterismo cardíaco n=21	-	0.1 (STC, n=11) a: 0.17; d: 0.22 (HTC, n=10)	Khattab y cols., 2017 *
Comunidad agrícola en Tlaxcala n=20 niños	1.5	6.8	Montero y cols., 2016 *†
Infección y desnutrición n=76	-	0.44 (BN, n=18) 1.08 (BNI, n=23) 1.63 (DESMI, n=21) 2.02 (DESGI, n=14)	Cervantes- Ríos y cols., 2014 *
Infantes expuestos transplacentariamente a zidovudina n=12	-	1.67 (CU) 1.55 (0-3 días) 0.45 (4-6 semanas) 0.12 (4-6 meses‰)	Witt y cols., 2007 *
Contaminación basal en zona rural-agrícola del Edo. De Tlaxcala n=32	3.65	7.2	Este estudio *†°

Estudios que reportan las frecuencias de micronúcleos en población de reticulocitos (MN-RETNT+ y MN-RETCD71+) en muestras de sangre periférica de niños y en muestras de cordón umbilical (CU), empleando citometría de flujo. STC, significa niños sin historial de tomografías computarizadas; HTC, niños con historial de tomografías computarizadas; a, antes; d, después; BN, niños bien nutridos; BNI, niños bien nutridos con infecciones; DESMI, niños con desnutrición moderada e infecciones; DESGI, niños con desnutrición grave e infecciones. \* Basados en el protocolo de Dertinger y cols. (2007; 2003; 2004); † con base en protocolo de Bemis y cols. (2008); ° con base en el protocolo de Abramsson y cols. (2000).

## RELACIÓN ENTRE LOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE DAÑO CITOGENÉTICO, MN-LINFBN Y MN-RET, EN SU CAPACIDAD PARA DETECTAR EVENTOS DE GENOTOXICIDAD EN MUESTRAS HUMANAS

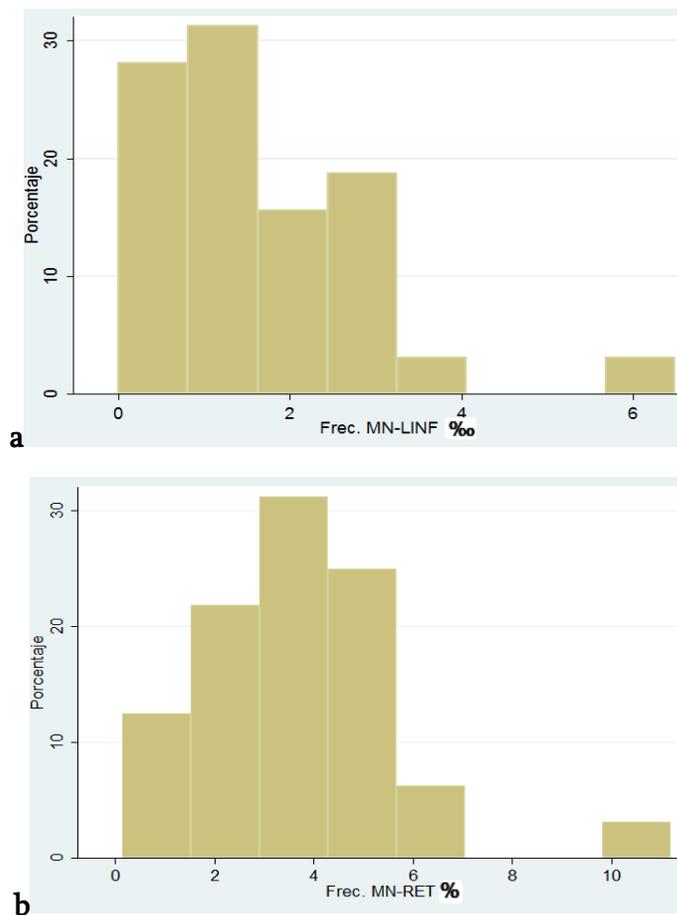
Por un lado, el ensayo del citoma CBMN emplea linfocitos para realizar la evaluación de daño genotóxico, mientras que la técnica de RET-MN emplea reticulocitos.

Aunque ambos tipos celulares se producen en la médula ósea y circulan en sangre periférica, la población eritroide es exclusiva de estos compartimentos, mientras que la linfoide puede residir y/o madurar en otros órganos y tejidos como el bazo, el timo, los ganglios y los nódulos linfáticos (Miale, 1985). Los linfocitos pueden diferenciarse en dos tipos principales, los B y los T, que en sangre periférica corresponden al 20% y 80%, respectivamente (Martínez y col., 2002). Asimismo, su tiempo de vida puede extenderse de meses hasta años, contrario a los reticulocitos que tienen una vida promedio de 120

días (Martínez y Sanmiguel, 2002). Estas diferencias sugieren que en linfocitos se evalúa un daño más duradero que en los reticulocitos, pues debido a que los linfocitos tienen periodos de vida más largos, el recambio es menor que en el linaje eritroide. Las células linfocitarias iniciales que pueden dividirse corresponden a  $2 \times 10^{11}$  y las células del linaje eritroide iniciales son  $1.5 \times 10^{11}$ , pero tienen intervalos mitóticos de 24 y 16 horas, respectivamente (Miale, 1985), es decir, que en dicho tiempo alcanzan el doble de la población inicial, lo que hace más susceptibles de sufrir daño al DNA a los reticulocitos. Sin embargo, cuando existe un factor ambiental constante, como la exposición a plaguicidas, pueden elevarse las frecuencias de MN en ambos sistemas y por lo tanto se correlacionaría, como lo reportó Costa y cols. (2011), o por otro lado, en exposiciones agudas a yodo radioactivo aplicado con fines médicos para combatir el cáncer de tiroides, Stopper y cols. (2005) vieron una fuerte correlación en el incremento de daño al DNA inducido por el último tratamiento en ambos tipos celulares, debido a que el yodo emite radiación, que es un agente capaz de dañar a todas las células. Así, bajo un reto continuo de exposición, como en las exposiciones ocupacionales o con fines médicos, sería de esperar que los MN incrementen en los dos sistemas. Sin embargo, en el presente trabajo se buscó la correlación en muestras de niños que no tienen exposición ocupacional ni por causas médicas, sino una exposición ambiental “de fondo”, relacionada con humo de combustibles y no se observó dicha correlación.

Finalmente, también es importante remarcar que con el ensayo del citoma CBMN se evaluaron hasta 2,000 células binucleadas, mientras que con la técnica de conteo de MN-RET empleando citometría de flujo, se analizaron en promedio hasta 12,119 células, incrementando tanto el número de células evaluadas como la posibilidad de encontrar mayor cantidad de MN. De hecho, con la técnica de citometría, la frecuencia de MN se reporta en porcentaje, mientras que con la del ensayo del citoma CBMN, se describen los eventos por mil células (‰), además de que, en la primera, no hay valor cero en la frecuencia de MN, mientras que en MN-LINFBN sí se tienen valores de cero posiblemente

porque se evaluaron hasta 2,000 células, pero no quiere decir que no hay MN en dichas células, sino que tendrían que evaluarse más para encontrar al menos uno, pero no hay certeza en cuántas células más se podría encontrar. Respecto a los valores de la mediana se localizan en puntos diferentes. Éste valor en MN-RET es de 3.65%, mientras que MN-LINF es de 1.5%, observando que la distribución se desplaza hacia la izquierda en MN-LINF, como se observa en los gráficos de la figura 8.



**Figura 8.** Gráficas de distribución de las frecuencias de MN (8 categorías): a) micronúcleos en linfocitos (MN-LINF) binucleados y b) micronúcleos en reticulocitos (MN-RET). El porcentaje corresponde a los individuos que entran en cada una de las categorías de las frecuencias de MN en ambos sistemas.

## CONCLUSIONES

- ✓ Aunque se analizaron muestras de sangre periférica para determinar las frecuencias de MN, a través de los sistemas de MN en linfocitos binucleados y en reticulocitos, no se encontró correlación entre ambos indicadores.
- ✓ En condiciones de alta exposición o de una exposición crónica se esperaría que hubiera una clara correlación entre el daño genotóxico producido en uno y otro tipo celular, como lo reportaron en otros estudios.
- ✓ Valores de MN en el sistema de MN-LINF es similar a los reportados en otros estudios realizados en niños, de entre 4-14 años, específicamente con los resultados de los grupos control, aunque presentan variaciones, posiblemente debido a las diferencias poblaciones, estilos de vida, etc.
- ✓ Las diferencias entre las frecuencias de MN en ambos tipos celulares podrían ser adjudicadas a las vidas divergentes que expresan, ya que los reticulocitos tienen tasas de recambio más rápidas y su periodo de vida es más corto (120 días) comparado con los linfocitos (periodo de vida que puede llegar de meses hasta años), y debido a que los donadores no presentan una exposición ocupacional ni con fines médicos, la presión de la exposición ambiental es baja y por lo tanto, no afecta por igual a ambos tipos celulares, ejerciendo mayor presión en las células en constante proliferación, que son los reticulocitos.
- ✓ El alto número de células evaluadas en el sistema de MN en reticulocitos permite encontrar una frecuencia basal de MN en cada muestra porque permite analizar mayor cantidad de células que con microscopía óptica.

## PERSPECTIVAS

- Continuar con la estandarización de la técnica de evaluación de MN en reticulocitos de sangre periférica en muestras humanas, debido a las variaciones que se observan en la frecuencia basal.

- Aumentar el tamaño de la muestra de individuos control, y hacer otros estudios en niños, en jóvenes y en adultos, hombres y mujeres.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abramsson-Zetterberg, L.; Durling, L.; Yang-Wallentin, F.; Rytter, E.; Vessby, B. 2006. The impact of folate status and folic acid supplementation on the micronucleus frequency in human erythrocytes. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 31: 33-40.
- Abramsson-Zetterberg, L., Grawé, J.; Zetterberg, G. 1995. Flow cytometric analysis of micronucleus induction in mice by internal exposure to <sup>137</sup>Cs at very low dose rates. *Rev. Radial. Bioi.* Vol. 67: 29-36.
- Abramsson-Zetterberg, L.; Zetterberg, G.; Bergqvist, M.; Grawe, J. 2000. Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. *Rev. Environ. Mole. Mutagen.* Vol. 36: 22-31.
- Alvarado-Hernandez, D.; Montero-Montoya, R.; Serrano-García, L.; Arellano-Aguilar, O.; Jasso-Pineda, Y.; Yáñez-Estrada, L. 2013. Assessment of exposure to organochlorine pesticides and levels of DNA damage in mother-infant pairs of an agrarian community. *Rev. Environ. Mole. Mutagen.* Vol. 54: 99-111.
- Álvarez, M. 2001. *Genética, ambiente y salud*. 2ª ed. Universidad de Guadalajara.
- ATSDR. 2016. Resúmenes de salud pública – Benceno (Benzene). Sitio web: [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs3.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs3.html) (consulta: 4 marzo de 2018).
- Becton, Dickinson and Company. 2004. *Methods for reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry, and cupravital dyes); approved guideline - Second Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document H44-A2.
- Bemis, J.; Torous, D.; Tometsko, C.; Dertinger, S. 2008. Cross-species genetic toxicity assessment accomplished by flow cytometric analysis of blood. *Rev. Prot. in Toxicol. Supplement* 36.

- Bessman, J. 1990. NCBI Bookshelf. Clinical methods: the history, physical and laboratory examinations. H.K. Walker, W. D. Hall and J. W. Hurst (editores) 3ra edición. Butterworth Publishers, Boston, U.S.A. 735 p.
- Bolognesi, C.; Landini, E.; Perrone, E.; Roggieri, P. 2004. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. Rev. Mutat. Res. Vol. 557: 109-107.
- Bonassi, S.; El-Zein, R.; Bolognesi, C.; Fenech, M. 2011. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. Rev. Mutagen. Vol. 26: 93-100.
- Bonassi, S.; Fenech, M.; Lando, C.; Lin, Y.; Ceppi, M.; Chang, W.; Holland, N.; Kirsch-Volders, M.; Zeiger, E.; Ban, S.; Barale, R.; Bigatti, M.; Bolognesi, C.; Jia, C.; Di Giorgio, M.; Ferguson, L.; Fucic, A.; Garcia, O.; Hrelia, P.; Krishnaja, A.; Lee, T.; Migliore, L.; Mikhalevich, L.; Mirkova, E.; Mosesso, P.; Müller, W.; Odagiri, Y.; Scarfi, M.; Szabova, E.; Vorobtsova, I.; Vral, A.; Zijno, A. 2001. Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. Vol. 37: 31-45.
- Bonassi, S.; Znaor, A.; Ceppi, M.; *et al.* 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Rev. Carcinogen. Vol. 28: 625-631.
- Cedano, D.; Martínez, G.; Torres-Bugarín, O.; Zúñiga, G.; Trujillo, H. 2011. Estudio de la factibilidad del cerdo como modelo indicador de agentes genotóxicos mediante el conteo de eritrocitos micronucleados. Rev. Abánico Vet. Vol. 1: 21-26.
- Cervantes-Ríos, E.; Ortiz-Muñiz, R.; Martínez-Hernández, A.; Cabrera-Rojo, L.; Graniel-Guerrero, J. Rodríguez-Crus, L. 2014. Malnutrition and infection influence the

- peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 1: 68-74.
- Chen, Y.; Tsai, Y.; Wang, N.; Hyrien, O.; Wilkins, R.; Ferrarotto, C.; Sun, H.; Dertinger, S. 2010. Validating high-throughput micronucleus analysis of peripheral reticulocytes for radiation biodosimetry: benchmark against dicentric and CBMN assays in a mouse model. *Rev. Health Phys.* Vol. 98: 218-27.
- Costa, C.; Silva, S.; Neves, J.; Coelho, P.; Costa, S.; Laffon, B.; Snawder, J.; Teixeira, P. 2011. Micronucleus frequencies in lymphocytes and reticulocytes in a pesticide exposed population in Portugal. *Rev. Toxicol. and Environ. Health, Part A.* Vol. 74: 960-970.
- Countryman, P.; Heddle, J. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Rev. Mutagen.* Vol. 41: 321-332.
- Dawson, D.; Bury, H. 1961. The significance of Howell-Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears. *Rev. Clin. Path.* Vol. 14: 374-378.
- Dertinger, S.; Chen, Y.; Miller, R.; Brewer, K.; Smudzin, T.; Torous, D.; Hall, N.; Olvany, K.; Murante, F.; Tomersko, C. 2003. Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 542: 77-87.
- Dertinger, S.; Miller, R.; Brewer, K.; Smudzin, T.; Torous, D.; Roberts, D.; Avlasevich, S.; Bryce, S.; Sugunan, S.; Chen, Y. 2007. Automated blood micronucleated reticulocyte measurements for rapid assessment of chromosomal damage. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 626: 111-119.
- Dertinger, S.; Torous, D.; Hall, N.; Murante, F.; Gleason, S.; Miller, R.; Tometsko, C. 2002. Enumeration of micronucleated CD71-positive human reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 515: 3-14.

- Dertinger, S.; Tourus, D.; Tometsko, K. 1996. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 371: 283-92.
- Dertinger, S.; Tourus, D.; Hayashi, M.; MacGregor, T. 2011. Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage. *Rev. Mutagen.* Vol. 26: 139-145.
- Eastmond, D.; Tucker, J. 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Rev. Environ. Mol. Mutagen.* Vol. 13: 34-43.
- El-Zein, R.; Fenech, M.; Lopez, M.; Spitz, M.; Etzel, C. 2008. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Rev. Cancer Epidemiol.* Vol. 5: 1111-1119.
- Evans, H.; Neary, G.; Williamson, F. 1959. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Rev. Radiat. Biol.* Vol. 1: 216-229.
- Fenech, M.; Chang W.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 534: 65-75.
- Fenech, M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 600: 58-66.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Rev. Nature Protocols.* Vol. 2.
- Fenech, M. 2010. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Rev. Health Phys.* Vol. 98: 234-43.

- Fenech, M.; Holland, N.; Chang, W.; Zeiger, E.; Bonassi, S. 1999. The HUMAN MicroNucleus project - an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 428: 271-283.
- Fenech, M.; Kirsch-Volders, M.; Natarajan, A.; Surrallés, J.; Crott, J.; Parry, J.; Norppa, H.; Eastmond, D.; Tucker, D.; Thomas, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Rev. Mutagen.* Vol. 26: 125-32.
- Fenech, M.; Morley, A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 147: 29-36.
- Gajski, G.; Milković, Đ.; Ranogajec-Komor, M.; Miljanić, S.; Garaj-Vrhovac, V. 2010. Application of dosimetry systems and cytogenetic status of the child population exposed to diagnostic X-rays by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Rev. Applied Toxicol.* No. 31: 608-617.
- Grawé, J.; Zetterberg, G.; Amnéus, H. 1992. Flow-cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Rev. Cytom.* Vol. 13: 750-758.
- Haaf, T.; Raderschall, E.; Reddy, G.; Ward, C.; Radding, C.; Golub, E. 1999. Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *Rev. Cell Biol.* Vol. 144: 11-20.
- Hassan, A. 2015. *Everyday Environmental Toxins: Children's Exposure Risks.* Ed. AAP. 3 p.
- Hatton, C.; Hughes-Jones, N.; Hay, D.; Keeling, D. 2013. *Haematology.* Ed. Wiley-Blackwell. Pp 54-56.
- Hayashi, M.; MacGregor, J.; Gatehouse, D.; Adler, I.; Blakey, D.; Dertinger, D.; Krishna, G.; Morita, K.; Russo, A.; Sotou, S. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments,

- integration with toxicity testing, and automated scoring. *Rev. Environ. Mole. Mutagen.* Vol. 35: 234–252.
- Hayashi, M.; Morita, T.; Kodama, Y.; Sofuni, T.; Ishidate M. Jr. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 245: 245-9.
- Heddle, J.; Hite, M.; Kirkhart, B.; Mavournin, K.; MacGregor, J.; Newell, G.; Salamone, M. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Vol. 123: 61-118.
- Heddle, J.; Fenech, M.; Hayashi, M.; MacGregor, J. 2011. COMMENTARY. Reflections on the development of micronucleus assays. *Rev. Mutagen.* Vol. 26: 3-10.
- Hughes-Jones, N.; Wickramasinghe, S. 1996. Lectures on Haematology 6ta edición. Blackwell Science. 277 p.
- IARC: International Agency for Research on Cancer. 2004. IARC Classifies Formaldehyde as Carcinogenic to Humans. Press Release No. 153.
- Iarmarcovai, G.; Botta, A.; Orsiere, T. 2006. Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Rev. Toxicol. Lett.* Vol. 166: 1-10.
- Khattab, M.; Walker, D.; Albertini, R.; Niklas, J. Lundblad, L.; Vacek, P.; Walker, V. 2017. Frequencies of micronucleated reticulocytes, a dosimeter of DNA doublestrand breaks, in infants receiving computed tomography or cardiac catheterization. *Rev. Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ.* Vol. 820: 8-18.
- Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Knasmueller, S.; Holland, N.; Bolognesi, C.; Fenech, M. 2014. Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals - A HUMN project perspective. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 759: 49-58.
- Klaassen, C.; Watkins, J. 2005. Fundamentos de toxicología. Ed. Mc Graw Hill. España. 24p.

- Klein, G.; Klein, E. 1952. The viability and the average desoxypentosenucleic acid content of micronuclei-containing cells produced by colchicine treatment in the Ehrlich ascites tumors. *Rev. Cancer Res.* Vol. 12: 484-489.
- Krishna, G.; Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 455: 155-166.
- Lehman, C. 2017. Definition of Toxic Endpoint. Sitio web: <https://sciencing.com/definition-toxic-endpoint-6603458.html> (consulta: 2017-10-23).
- Lindberg, H.; Wang, X.; Jarventaus, H. Falck, G.; Norppa, H.; Fenech, M. 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 617: 33-45.
- Lindholm, C.; Norppa, H.; Hayashi, M.; Sorsa, M. 1991. Induction of micronuclei anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 260: 369-75.
- MacGregor, J.; Wehr, C.; Gould, D. H. 1980. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Rev. Environ. Mutagen.* Vol. 2: 509-514.
- MacGregor, J.; Wehr, C.; Langlois, R. 1983. A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y. *Rev. Mutat. Res.* Vol. 120: 269-275.
- Manahan, S. 2003. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. 3ra. Edición Lewis Publishers. 424 p.
- Martínez, F.; Sanmiguel, J. 2002. *Hematología. Manual básico razonado*. Editorial Elsevier 3ra edición. España. Pp 143-144.
- Mavournin, K.; Blakey, D.; Cimino, M.; Salamone, M.; Heddle, J. 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report

- of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Rev. Mutat. Res. Vol. 239: 29-80.
- Miale, J. 1985. Hematología. Medicina de laboratorio. Editorial Reverté 6ta edición. Barcelona. Pp 13-30.
- Milosevic, O.; Grujicic, D.; Arsenijevic, S.; Marinkovic, D. 2005. Monitoring of lymphocyte micronuclei among newborns from Kragujevac in Central Serbia before and after environmental contamination. Rev. Exp. Med. Vol. 205: 1-9.
- Montero, R.; Norppa, H.; Autio, K.; Lindholm, C.; Ostrosky, P.; Sorsa, M. 1991. Determination of 6-thioguanine resistant lymphocytes in human blood by immunohistochemical antibromodeoxyuridine staining. Rev. Mutagen. Vol. 6: 169-170.
- Montero, R.; Serrano, L. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. Rev. Environ. Mole. Mutagen. Vol. 38: 38-45.
- Montero, R.; Araujo, A.; Serrano, L.; Castellanos, C. 2016. Use of RNA content to identify reticulocytes in the *in vivo* micronucleus test in humans. Rev. Current Topics in Toxicol. Vol. 12: 111-123.
- Moore, L.; Titenko-Holland.; Quintana, P.; Smith, M. 1993. Novel biomarkers of genetic damage in humans: use of fluorescence *in situ* hybridization to detect aneuploidy and micronuclei in exfoliated cells. Rev. Toxicol. Environ. Health. Vol. 40: 349-357.
- Morishima, A., M. Milstein, R.T. Henrich and G.G. Nahas. (1976). The Pharmacology of Marihuana, Raven, New York. Ed. M.C. Braude and S. Szara. Pp 711-722.
- Norppa, H.; Falck, G. 2003. What do human micronuclei contain. Rev. Mutagen. Vol. 18: 221-233.
- Programa de gestión ambiental de sustancias tóxicas de atención prioritaria. Instituto Nacional de Ecología. 1997. 15 p.

- Pampalona, J.; Soler, D.; Genescà, A.; Tusell, L. 2010. Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Rev. Gen. Ch. Cancer*. Vol. 49: 368-78.
- Pastor, S. 2002. Biomonitorización citogenético de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Universidad Autónoma de Barcelona. 56 p.
- Sato, S.; Taketomi, M.; Nakajima, M. 1995. Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7<sup>th</sup> collaborative study organized by CSGMT/MMS. *Rev. Mutat. Res*. Vol. 338: 51-57.
- Savage, J. 1988. A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. *Rev. Mutat. Res*. Vol. 207: 33-36.
- Secretaría de Salud, Folleto. 2003. El ácido fólico y la prevención de defectos al nacimiento. Sitio Web:  
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/ACIDOFOLICO.pdf>  
(consulta: 28 de abril de 2018).
- Shelby, M.; Witt, K. 1995. Comparison of results from mouse bone marrow chromosome aberration and micronucleus tests. *Rev. Environ. Mol. Mutagen*. Vol. 25: 302-313.
- Shimizu, N.; Shimura, T.; Tana, T. 2000. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Rev. Mutat. Res*. Vol. 448: 81-90.
- Shimizu, N.; Shingaki, K.; Kaneko-Sasaguri, Y.; Hashizume, T.; Kanda, T. 2005. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Rev. Exp. Cell Res*. Vol. 302: 233-243.
- Slack, J. 2000. Stem cells in epithelial tissues. *Rev. Science*. Vol. 287: 1431-3.

- Sondell, M.; Fex-Svenningsen, A.; Kanje, M. 1997. The insulin-like growth factors I and II stimulate proliferation of different types of Schwann cells. *Rev. Neuroreport*. Vol. 8: 2871-6.
- Stopper, H.; Hempel, C.; Reiners, S.; Vershenya, S.; Lorenz, R.; Vukicevic, V.; Heidland, A.; Grawe, J. 2005. Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring. *Rev. Toxicol. Lett*. Vol. 156: 351-60.
- Suárez, K. 2008. Efecto de los polimorfismos de CYP1A1 y CYP2E1 en la frecuencia de micronúcleos en una población mestiza de Tlaxcala. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 13-15.
- Thierens, H.; Vral, A. 2009. The micronucleus assay in radiation accidents. *Rev. Ann. Ist. Super Sanita*. Vol. 45: 260-4.
- Thomas, P.; Holland, N.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, P.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; Knasmueller, S.; Fenech, M. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Rev. NATURE Protocols*. Vol. 4: 825-837.
- Torres-Bugarín, O.; Zavala-Cerna, M.; Macriz-Romero, N.; Flores-García, A.; Ramos-Ibarra, M. 2013. Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *Rev. El Residente*. Vol. 8: 4-11.
- Umegaki, K.; Fenech, M. 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Rev. Mutagen*. Vol. 15: 261-9.
- Wakata, A.; Miyamae, Y.; Sato, S.; Suzuki, T.; Morita, T.; Asano, N.; Awogi, T.; Kondo, K.; Hayashi, M. 1998. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: the summary of the 9th collaborative study by CSGMT/MMS\_JEMS. *Rev. Environ. Mol. Mutagen*. Vol. 32: 84-100.

- Witt, K.; Cunningham, C.; Patterson, K.; Kissling, G.; Dertinger, S.; Livingston, E.; Bishop, J. 2007. Elevated frequencies of micronucleated erythrocytes in infants exposed to zidovudine *in utero* and postpartum to prevent mother-to-child transmission of HIV. *Rev. Environ. Mole. Mutagen.* No. 48: 322-329.
- Woolley, I.; Wood, E.; Sramkoski, R.; Simmerman, P.; Miller, J.; Kazura, J. 2005. *Immunoematology.* Vol. 21: 15-20.
- Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L.; Patiño, A. 2005. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Rev. An. Sist. Sanit. Navar.* Vol. 28: 227-236.
- Zotti-Martelli, L.; Migliore, L.; Panasiuk, G.; Barale, R. 1999. Micronucleus frequency in Gomel (Belarus) children affected and not affected by thryroid cancer. *Rev. Mutat. Res.* No. 440: 35-43.