



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE RETICULOCITOS
MICRONUCLEADOS, MEDIDA POR CITOMETRÍA
DE FLUJO, UTILIZANDO UN MODELO EN RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BETSY LEILANI GUZMÁN SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. REGINA DORINDA MONTERO
MONTTOYA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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.

Hoja de datos del jurado.

1. Datos del alumno.

Guzmán
Sánchez
Betsy Leilani
56 41 48 60
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311046151

2. Datos del tutor.

Dra.
Regina Dorinda
Montero
Montoya

3. Datos del sinodal 1.

Dra.
Patricia
Ramos
Morales

4. Datos del sinodal 2.

M. en C.
Bertha
Molina
Álvarez

5. Datos del sinodal 3.

Dra.
Adriana
Muñoz
Hernández

6. Datos del sinodal 4.

Dr.
Javier Alejandro
Belmont
Díaz

7. Datos de la tesis.

Cinética de eliminación de reticulocitos micronucleados,
medida por citometría de flujo, utilizando un modelo en rata
67 p.
2018

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Regina D. Montero Montoya, del Departamento de Toxicología Ambiental y Medicina Genómica en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Hago un agradecimiento especial a la Dra. Regina D. Motero Montoya por haberme permitido ser parte de su laboratorio, por todo su apoyo, su guía en mi formación profesional y por haber confiado en mí este proyecto de investigación.

~

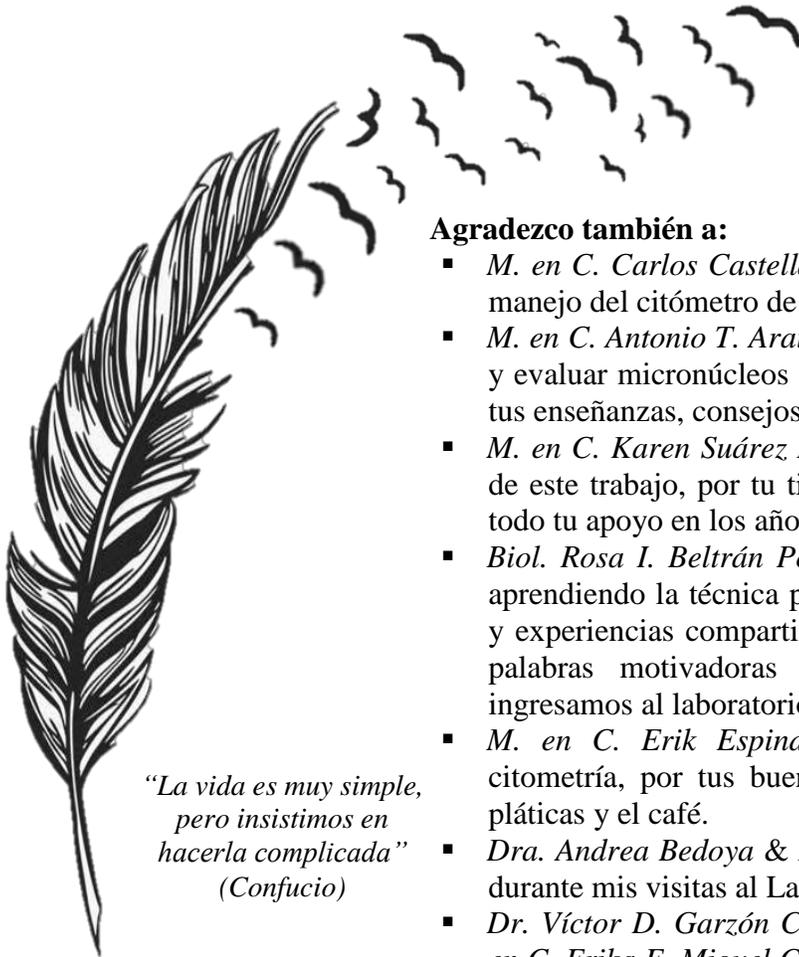
También agradezco al técnico académico Luis Serrano García por su apoyo en la esplenectomía de los animales, administración del compuesto, toma de muestra, fijación de la muestra y en general, por todo su apoyo en los años que llevo en el laboratorio.

~

Agradezco infinitamente a los sinodales que conformaron mi jurado: Dra. Patricia Ramos Morales, M. en C. Bertha Molina Álvarez, Dra. Adriana Muñoz Hernández y Dr. Javier Alejandro Belmont Díaz, por las observaciones al presente trabajo y los consejos dados, que sin duda ayudaron a mejorarlo bastante.

~

Además, agradezco a la Unidad de Modelos Biológicos y al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, ambos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por haberme brindado respectivamente su asesoría en la correcta manipulación de los animales y el uso adecuado del citómetro de flujo.



*“La vida es muy simple,
pero insistimos en
hacerla complicada”
(Confucio)*

“Estudiar biología, es la aventura más grande que alguien pudiera desear”

Agradezco también a:

- *M. en C. Carlos Castellanos Barba* por todo su apoyo y guía en el manejo del citómetro de flujo.
- *M. en C. Antonio T. Araujo Soto* por enseñarme la técnica para teñir y evaluar micronúcleos en reticulocitos por citometría de flujo, por tus enseñanzas, consejos y el tiempo dedicado.
- *M. en C. Karen Suárez Larios* por ayudarme en la parte estadística de este trabajo, por tu tiempo, tus consejos, enseñanzas, pláticas y todo tu apoyo en los años que llevo en el laboratorio.
- *Biol. Rosa I. Beltrán Portugal* por el apoyo y tiempo compartido aprendiendo la técnica para evaluar micronúcleos, por los consejos y experiencias compartidas cuando la técnica no nos salía, por tus palabras motivadoras y toda la ayuda brindada desde que ingresamos al laboratorio.
- *M. en C. Erik Espindola* por apoyarme con los software de citometría, por tus buenos y malos consejos, por los dulces, las pláticas y el café.
- *Dra. Andrea Bedoya & M. en C. Roxana Olguín Alor* por su ayuda durante mis visitas al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo.
- *Dr. Víctor D. Garzón Cortés, MVZ. Rubí E. Zavala Gaytán & M. en C. Erika E. Miguel Cruz* por sus enseñanzas, ayuda y dedicación

en el cuidado de los animales que se encuentran en la Unidad de Modelos Biológicos.

Además, agradezco a todos mis compañeros del laboratorio (los que aún permanecen y los que ya no están en él) por su ayuda, sus consejos, las enseñanzas y hacer tan agradable mi estancia en el laboratorio. Particularmente a *Rocío* y *Selene* por haber y seguir influyendo en mi formación profesional y personal, gracias. A *Damián* y *Uriel*, chicos les agradezco sus comentarios hacia mi trabajo y los momentos tan amenos en el laboratorio, sin ustedes el laboratorio no sería el mismo.

Finalmente, el mérito y toda mi gratitud a la culminación de mis estudios de licenciatura con este trabajo es *para mis padres*, ustedes siempre han sido mi apoyo y ejemplo a seguir, gracias por todo su esfuerzo para que yo sea una persona de bien. Agradezco también a *mi abuelita* por preocuparse de mi alimentación y mi salud; a mi hermano *Emmanuel* por todo, la verdad no sé qué haría sin ti; a mi hermano *Iván* por tus consejos y todos los momentos que hemos vivido juntos; a mis tíos, amigos y demás familiares, que siempre preguntaron *¿y la tesis?*, a todos ustedes muchas gracias por apoyarme y preocuparse por mi progreso.

Hoy por FIN...



“Gracias por acompañarme todos estos años de aventura Carolina O.”

“Gracias por apoyarme y ayudarme en todo Rodrigo I., gracias por mi árbol.”

ÍNDICE

Resumen	(7)
Abstract	(8)
Glosario de términos	(9)
Introducción	(11)
▪ Pruebas toxicológicas	
▪ Micronúcleos como biomarcador	
Antecedentes	(14)
▪ Ensayo de micronúcleos	
▪ Ensayo de micronúcleos <i>in vivo</i> en sangre periférica	
▪ Eliminación de eritrocitos micronucleados a través del bazo	
▪ El bazo y el ensayo de micronúcleos <i>in vivo</i>	
▪ Ensayo de micronúcleos <i>in vivo</i> por citometría de flujo	
Planteamiento del Estudio	(24)
Hipótesis	(24)
Objetivos	(24)
Diseño Experimental	(25)
▪ Modelo experimental	
▪ Compuesto genotóxico	
▪ Grupos de exposición	
▪ Vía de administración y régimen de tratamiento	
▪ Toma de muestra	
▪ Fijación de muestras	
▪ Tinción para detectar reticulocitos micronucleados por citometría de flujo	
▪ Adquisición y análisis de muestras por citometría de flujo	
▪ Análisis estadístico	
Resultados y discusión	(32)
▪ Peso corporal y estado general de los animales	
▪ Parámetros determinados por citometría de flujo	
▪ Frecuencia de reticulocitos micronucleados en sangre periférica de ratas con bazo, inducida por diferentes dosis agudas de hidroquinona	
▪ Efecto del bazo en la frecuencia de reticulocitos micronucleados obtenida con administración aguda de 50 mg/kg peso de hidroquinona en ratas esplenectomizadas	
▪ Cinética de inducción de reticulocitos micronucleados y eliminación a través del bazo	
▪ Uso de CD71 o ARN para identificar reticulocitos en el ensayo de micronúcleos <i>in vivo</i>	
▪ Efectos toxicológicos del compuesto hidroquinona	
Conclusiones	(47)
Contribuciones y perspectivas	(47)
Referencias	(48)
Anexos	(57)
▪ Anexo A: conceptos importantes	
▪ Anexo B: genotoxicidad del compuesto hidroquinona	
▪ Anexo C: reactivos y preparación de soluciones	
▪ Anexo D: compensación detectores Attune	

RESUMEN

El ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de roedores es uno de los ensayos de genotoxicidad *in vivo* más utilizado y recomendado por las agencias reguladoras alrededor del mundo para evaluar el potencial genotóxico de diversos agentes que llegan a médula ósea y dañan células precursoras. Este ensayo, en modelos como la rata que captura y elimina eficientemente a través del bazo eritrocitos micronucleados que entran a circulación sanguínea, se integró en la batería de pruebas estándar de genotoxicidad gracias a la evidencia proporcionada por varios estudios interlaboratorio que demostraron que al evaluar la inducción de micronúcleos en eritrocitos inmaduros de sangre periférica (reticulocitos), se descartaba la función de filtración y eliminación por parte del bazo de estas células dañadas, obteniendo una buena correlación con el mismo ensayo evaluado en precursores eritroides de médula ósea. No obstante, estudios enfocados en el tiempo que tardan en eliminarse los reticulocitos micronucleados que entran en circulación, es decir, su cinética de aparición y eliminación del torrente sanguíneo así como las posibles alteraciones debido a la función de filtración del bazo en la frecuencia de estas células micronucleadas, no ha sido completamente caracterizada, por tal motivo en el presente trabajo nos planteamos estudiar el tiempo que tardan en eliminarse estas células dañadas y si se eliminan completamente del sistema circulatorio. Con este propósito, se expusieron a 6 grupos (dos de ellos esplenectomizados) de ratas de la cepa Wistar de aproximadamente 5 semanas de edad, a diferentes dosis agudas (0, 25, 50 y 100 mg/kg peso) del compuesto genotóxico hidroquinona y se evaluó a lo largo de seis semanas por Citometría de Flujo la frecuencia de reticulocitos micronucleados y eritrocitos maduros micronucleados. Los resultados obtenidos presentaron gran variación cuando la inducción de micronúcleos se evaluó en la porción de reticulocitos con receptor de transferrina, en comparación con la inducción obtenida en la porción de reticulocitos considerados por su abundante contenido de ARN. Las frecuencias de reticulocitos micronucleados mostraron un aumento significativo solo con administración de 50 y 100 mg/kg peso de hidroquinona. Tanto las ratas con bazo así como las esplenectomizadas, exhibieron un aumento marcadamente significativo en la frecuencia de reticulocitos micronucleados el día 33 post-tratamiento, lo que indicó que a pesar de la eliminación constante que ejerció el bazo en el porcentaje de estas células micronucleadas (ya que la porción de eritrocitos maduros micronucleados claramente disminuyó en las ratas con bazo), es importante considerar otros tiempos de muestreo para exposiciones agudas, ya que los períodos de diferenciación de los precursores eritroides en los cuales puede incidir el compuesto a evaluar varían. Por lo tanto, este retraso en la respuesta tendría que ser considerado en el modelo de roedores cuando se usa para estudiar escenarios de exposición humana a benceno y otros compuestos que actúan de manera similar.

***Palabras clave:** ensayo de micronúcleos, reticulocitos, bazo, citometría de flujo, hidroquinona.

ABSTRACT

The Micronucleus assay in erythrocytes from rodent peripheral blood, is the *in vivo* genotoxicity assays most used and recommended by regulatory agencies in the world to evaluate the genotoxic potential of agents that reach the bone marrow and damage precursor cells. This assay, in models such as rat, which efficiently captures and eliminates micronucleated erythrocytes that enter in the blood circulation through the spleen, was integrated into the battery of standard genotoxicity tests, due to the evidence provided by several inter-laboratory studies which demonstrated that evaluating the induction of micronuclei in immature erythrocytes (reticulocytes), the filtration and elimination by the spleen of these damaged cells could be overcome, since with this methodology a good correlation with the same assay evaluating in erythroid precursors in bone marrow was obtained. However, studies focused on the time it takes to eliminate the micronucleated reticulocytes that entered into the circulation, i. e., their kinetics of appearance and elimination of the bloodstream as well as the possible alterations the filtering function of the spleen, affecting the frequency of these micronucleated cells, has not been well characterized, for this reason in the present work we considered studying the time it takes to eliminate these damaged cells and if they were completely eliminated from the circulatory system. To this goal, six groups of Wistar rats (two of them splenectomized), approximately 5 weeks of age, were exposed at different acute doses (0, 25, 50 and 100 mg/kg weight) of the genotoxic compound hydroquinone and the frequency of micronucleated reticulocytes and micronucleated mature erythrocytes was evaluated along six weeks by Flow Cytometry. The results showed a great variation when the induction of micronuclei in the portion of reticulocytes with transferrin receptor was evaluated, in comparison with the induction obtained in the portion of reticulocytes considered for their abundant RNA content. The frequencies of micronucleated reticulocytes were significantly increased only with the administration of 50 and 100 mg/kg body weight of hydroquinone. Both rats with and without spleen exhibited a markedly significant increase in the frequency of micronucleated reticulocytes on day 33 post-treatment, indicating that despite of the constant elimination exerted by the spleen on the percentage of these micronucleated cells (since the portion of micronucleated mature erythrocytes clearly decreased in the rats with spleen), it is important to consider other sampling time for acute exposures, because of the varying differentiation periods of the erythroid precursors in which the compound to be evaluated can affect. Therefore, this delayed response should be considered in the rodent model when it is used to study scenarios of human exposure to benzene and other compounds that act in a similar form.

***Key words:** micronucleus assay, reticulocytes, spleen, flow cytometry, hydroquinone.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATSDR*	Agencia para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades
BBS	Buffer de bicarbonato salino
BFB*	Ruptura-fusión-puente
BL1	Detector de naranja de tiazol
BL2	Detector de ficoeritrina
BL3	Detector de ficoeritrina combinada con cianina 7
CD61	Proteína integrina $\beta 3$
CD71	Receptor de transferrina
CD71+	Positivo al receptor de transferrina
CICUAL	Comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio
CSGMT*	Grupo de estudio colaborativo para la prueba de micronúcleos
CTF	Citometría de flujo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERITRO	Eritrocitos
FDA*	Administración de medicamentos y alimentos de los EE. UU.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC*	Detector de dispersión frontal
GPA	Glicoforina A
h	Horas
HQ	Hidroquinona
ICH	Consejo internacional para la armonización de requisitos técnicos para productos farmacéuticos de uso humano
JEMS*	Sociedad de mutágenos ambientales de Japón
MN	Micronúcleos
MN-ERITRO	Eritrocitos micronucleados (maduros e inmaduros excepto que se especifique)
MN-PCE	Eritrocitos policromáticos micronucleados
MN-RET	Reticulocitos micronucleados
MN-RET CD71+	Reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina
MN-RET NT+	Reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol
NCE	Eritrocitos normocromáticos
NT	Naranja de tiazol
NT+	Positivo al colorante naranja de tiazol
OCDE	Organización para la cooperación y el desarrollo económico
PCE	Eritrocitos policromáticos
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina combinada con cianina 7

R1	Compuerta que identifica eritrocitos por tamaño y complejidad celular
R2	Compuerta que identifica células individuales
R3	Compuerta que identifica células positivas al colorante naranja de tiazol
R4	Compuerta que identifica células positivas al receptor de transferrina
R5	Compuerta que identifica plaquetas
R6	Compuerta que identifica células nucleadas
R7	Compuerta que identifica reticulocitos positivos al colorante naranja de tiazol
R8	Compuerta que identifica reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol
R9	Compuerta que identifica eritrocitos maduros
R10	Compuerta que identifica eritrocitos maduros micronucleados
R11	Compuerta que identifica sólo reticulocitos positivos al receptor de transferrina
R12	Compuerta que identifica sólo reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina
R13	Compuerta que identifica reticulocitos en su etapa final de maduración y eritrocitos maduros
R14	Compuerta que identifica reticulocitos micronucleados en su etapa final de maduración y eritrocitos maduros micronucleados
RET	Reticulocitos
RET CD71+	Reticulocitos positivos al receptor de transferrina
RET NT+	Reticulocitos positivos al colorante naranja de tiazol
ROS*	Especies reactivas de oxígeno
SEM*	Error estándar de la media
SFB	Suero fetal bovino
SSC*	Detector de dispersión lateral
VL1	Detector de Hoechst 33342

***Por sus siglas en inglés**

INTRODUCCIÓN

▪ Pruebas toxicológicas

“La Toxicología es la ciencia que estudia los efectos adversos de agentes químicos, físicos y biológicos sobre los organismos, con el propósito de establecer la naturaleza de dichos efectos y determinar la relación dosis-respuesta” [Moreno, M. D., 2001]. Actualmente, la Toxicología juega un papel fundamental en la evaluación, regulación y prevención de los peligros presentes en el medioambiente, en el lugar de trabajo y en el desarrollo de nuevos fármacos, sin embargo para poder llegar a este punto, años de investigación básica han sido requeridos al estandarizar pruebas que permitan evaluar la toxicidad de diversos compuestos, así como el riesgo que conlleva su exposición. Estas pruebas son el principal instrumento de las organizaciones gubernamentales para la toma de decisiones respecto a las medidas de seguridad que se deben adoptar en el manejo de agentes tóxicos [Silbergeld, E., 1998].

Las pruebas de toxicidad (Anexo A) que se realizan en estudios epidemiológicos en humanos y en estudios toxicológicos en animales son el primer recurso de información para juzgar el riesgo a la salud humana. No obstante, dado que existen pocos estudios epidemiológicos en humanos, la investigación toxicológica confía en estudios en animales, principalmente en un grupo reducido de modelos aceptados para extrapolar los efectos adversos al ser humano, estos modelos incluyen: roedores, conejos, perros, cerdos y simios. Aunque debido a su menor costo, disponibilidad, facilidad de manejo y proporcionar resultados consistentes, las ratas y ratones son las especies más utilizadas en estudios toxicológicos. Los modelos de ratas (p.ej. Wistar, Sprague-Dawley) y ratones (p.ej. BALB/c, CD-1) usados en investigación, cuentan con una estabilidad genética que permite mantener en cada experimento condiciones rigurosamente controladas, de tal forma que se puede definir el vínculo causal entre exposición a un agente y manifestación de algún efecto [Jacobson-Kram & Keller, 2001; Moreno, M. D., 2001].

Las pruebas toxicológicas recomendadas para evaluar los efectos adversos y el riesgo a la salud, se detallan en las directrices emitidas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de uso Humano (ICH), la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (FDA), la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR), entre otras. Estas directrices contienen protocolos de pruebas estándar para evaluar la capacidad que tienen diversos agentes de producir cáncer (carcinogenicidad), daño en el material genético (genotoxicidad), daño en el sistema nervioso (neurotoxicidad), daño vinculado al desarrollo y la reproducción, etc. [Jacobson-Kram & Keller, 2001]. Al conjunto de pruebas estándar para evaluar cada uno de los efectos anteriores en la salud se le conoce como “batería de pruebas” e incluyen una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*, ya que una sola prueba no puede detectar todos los efectos que provocan los distintos agentes tóxicos [Parasuraman, S., 2011].

En los últimos años, la batería de prueba estándar para evaluar daño en el material genético ha sido modificada por varias organizaciones (OCDE, ICH, etc.) debido a la necesidad de detectar la amplia gama de efectos genotóxicos, no obstante, cada organización concordó en que es preciso realizar al menos un ensayo *in vivo* para determinar la genotoxicidad de algún compuesto [Galloway, S. M., 2017].

Actualmente, uno de los ensayos de genotoxicidad *in vivo* más utilizado y recomendado por las agencias reguladoras alrededor del mundo, es el “Ensayo de Micronúcleos” evaluado en eritrocitos de sangre periférica de mamífero, ya que es capaz de detectar el potencial genotóxico de los agentes que llegan a médula ósea y dañan células precursoras [Klaassen & Watkins, 2001; Moreno, M. D., 2001].

▪ **Micronúcleos como biomarcador**

“Los *micronúcleos* (MN) son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear que corresponden a material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular” [Zalacaín & col., 2005]. Estos cuerpos citoplasmáticos se originan por rupturas cromosómicas (clastogénesis) o por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN (aneugénesis). Las rupturas cromosómicas mal reparadas o no reparadas dejan fragmentos de cromosomas acéntricos o fragmentos de cromátidas rezagadas que dan pie a la formación de MN (Fig. 1a y 1b), mientras que los errores durante la replicación y posterior división celular del ADN ocasionados por hipometilación de secuencias repetidas centroméricas y pericentroméricas, defectos en el ensamblaje o en las proteínas del cinetocoro, defectos en los genes encargados de los puntos de control de la mitosis, amplificación anormal de cromosomas y un huso mitótico disfuncional, inducen el rezago de cromátidas o cromosomas enteros que eventualmente pueden ser rodeados por una membrana nuclear y formar así MN (Fig. 1c y 1d) [Fenech & col., 2011].

Además de los anteriores mecanismos, los MN también pueden originarse por: 1) formación de puentes nucleoplásmicos o 2) a partir de amplificación génica mediante ciclos ruptura-fusión-puente (BFB). La primera sucede cuando una mala reparación de dos rupturas cromosómicas produce un cromosoma dicéntrico y un fragmento acéntrico. Los centrómeros del cromosoma dicéntrico durante la anafase se orientan a polos opuestos, formando así el puente nucleoplásmico entre los núcleos de las células hijas, mientras que el fragmento acéntrico queda rezagado y es envuelto por una membrana nuclear formando un micronúcleo (Fig. 1e). La segunda ocurre cuando puentes nucleoplásmicos se rompen de forma desigual, provocando que una de las células hijas reciba un cromosoma con copias adicionales de genes mientras la otra pierde genes, debido a que los extremos rotos de estos cromosomas carecen de secuencias teloméricas es probable que se fusionen con su réplica después de la síntesis de ADN, lo que perpetúa el ciclo BFB y ocasiona que en la siguiente división celular los genes cerca del punto de ruptura y fusión sean más amplificados, promoviendo su separación de los cromosomas para formar cromosomas diminutos, que pueden ser eventualmente eliminados por gemación nuclear y convertirse posteriormente en MN cuando se desprenda el tallo de material nucleoplásmico que une a la gemación con el núcleo (Fig. 1f) [Mateuca & col., 2006; Araujo, A. T., 2009; Fenech & col., 2011].

Los MN pueden presentarse de manera espontánea debido a procesos metabólicos endógenos que se reflejan en la frecuencia basal de células micronucleadas en individuos “no expuestos”, o por exposición a agentes tóxicos [Araujo, A. T., 2009]. La presencia de células micronucleadas por arriba de la frecuencia basal o espontánea indica una respuesta biológica anormal, por tal motivo desde hace algunos años, los MN son utilizados como un marcador biológico de daño genotóxico (biomarcador de efecto - Anexo A), es decir, como una característica medible indicadora de daño al ADN, lo que ha facilitado la evaluación de compuestos que afectan de diversas formas al material genético, ya que los MN pueden ser inducidos por agentes clastogénicos, aneugénicos o mutagénicos [Lasne & col., 1984; Hayashi, M., 2016].

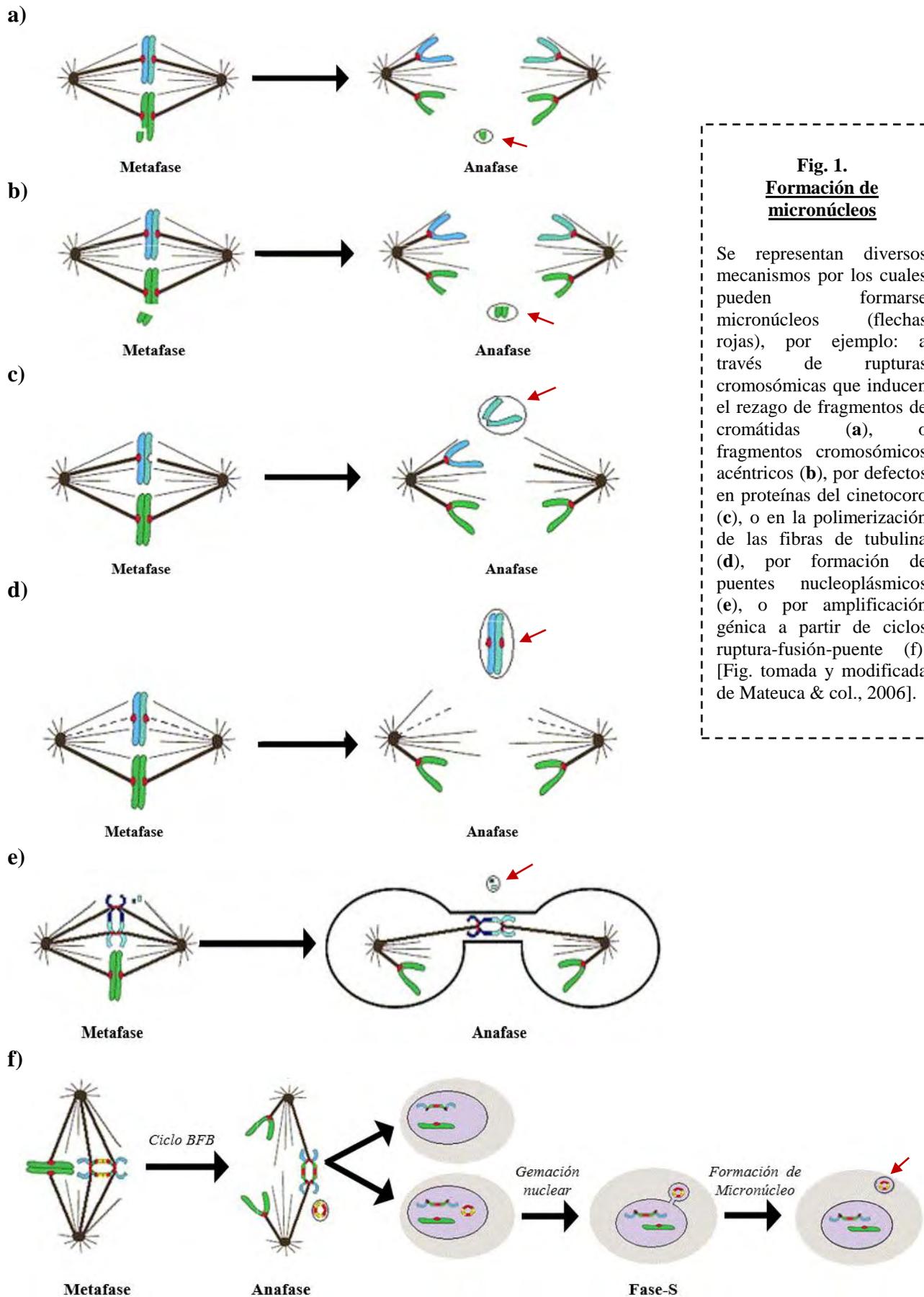


Fig. 1.
Formación de
micronúcleos

Se representan diversos mecanismos por los cuales pueden formarse micronúcleos (flechas rojas), por ejemplo: a través de rupturas cromosómicas que inducen el rezago de fragmentos de cromátidas (a), o fragmentos cromosómicos acéntricos (b), por defectos en proteínas del cinetocoro (c), o en la polimerización de las fibras de tubulina (d), por formación de puentes nucleoplásmicos (e), o por amplificación génica a partir de ciclos ruptura-fusión-puente (f). [Fig. tomada y modificada de Mateuca & col., 2006].

Además, la presencia de MN puede expresar deterioro en la salud relacionado con enfermedades crónicas como cáncer [Bhatia & Kumar, 2013], infecciones virales [Shi & col., 2015] y parásitos o bacterias [Khan & col., 2017], así como deficiencia en nutrientes requeridos en el metabolismo del ADN [Kawasaki & col., 2013]. Se han reportado también diferencias intra e interindividuales como la edad (frecuencia de células micronucleadas es más alta en individuos de mayor edad) y el género (por lo general, hay un mayor porcentaje de células micronucleadas en mujeres mayores de 30 años, que en hombres), sin embargo, los efectos por edad y género son rebasados por los efectos de exposición a tóxicos [Suárez, K., 2008; Fenech & col., 2011].

ANTECEDENTES

▪ Ensayo de micronúcleos

Los MN se describieron por primera vez a finales del siglo XIX por W. H. Howell e inicios del siglo XX por J. Jolly, dos hematólogos que observaron pequeños cuerpos nucleares positivos para la tinción de Feulgen en el citoplasma de eritrocitos humanos, en aquella época ellos los nombraron “fragmentos de material nuclear” y “corpúsculos intraglobulares” respectivamente, sin embargo con el tiempo estos fragmentos se denominaron en el campo de la hematología “cuerpos de Howell-Jolly”, en su honor [Araujo, A. T., 2009; Hayashi, M., 2016]. Años después de sus primeras descripciones, las mismas estructuras fueron observadas por varios citogenetistas al exponer distintas células *in vitro* a radiación, uno de ellos J. M. Thoday denominó a estos pequeños fragmentos nucleares “micronúcleos”, el término continuó apareciendo en sucesivas publicaciones y para finales de la década de los 50s los MN se introdujeron como una medida de daño causada por radiación [Decordier & Kirsch-Volders, 2006; Araujo, A. T., 2009].

Fue hasta inicios de los 70s cuando W. Schmid [1971] y J. A. Heddle [1973] sugirieron la evaluación de micronúcleos como una prueba para detectar el potencial genotóxico de diversos agentes, a través de exponer *in vivo* a mamíferos y evaluar subsecuentemente MN en precursores eritroides de médula ósea. Poco después, Heddle & Countryman [1976] demostraron al irradiar *in vitro* linfocitos humanos, que la prueba o ensayo de micronúcleos podía utilizarse como un marcador biológico de daño al material genético y que lo único necesario era elegir tipos celulares en proliferación, debido a que los mecanismos de formación de MN necesitan al menos un ciclo celular para expresar el daño causado al ADN [Heddle & col., 2011].

En años siguientes el ensayo de micronúcleos tomó dos vertientes, por un lado se desarrolló el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica a partir del ensayo de aberraciones cromosómicas para el que se usaba el cultivo *ex-vivo* de estas células [Moorhead & col., 1960; Heddle & col., 1983]. Este ensayo fue mejorado por Fenech & Morley [1985] al implementar la técnica de bloqueo de la citocinesis, proporcionando un enfoque eficiente para distinguir tanto daño al material genético (MN, puentes nucleoplásmicos y/o gemaciones nucleares) como citotoxicidad (apoptosis y necrosis). De la misma manera, el ensayo de micronúcleos *in vivo* realizado originalmente en médula ósea de ratón se

optimizó para poder integrarlo en los protocolos de pruebas toxicológicas de múltiples muestreos, cambiando la evaluación de médula ósea a sangre periférica e implementando la técnica de citometría de flujo para aumentar el poder estadístico del ensayo al identificar y evaluar una mayor cantidad de células en el menor tiempo posible [Headdle & col., 2011; Hayashi, M., 2016].

- **Ensayo de micronúcleos *in vivo* en sangre periférica**

El ensayo de micronúcleos *in vivo* se realizó durante muchos años, como lo describieron Schmid & Matter [1971] y Heddle [1973], en *eritrocitos policromáticos* (PCE) y *eritrocitos normocromáticos* (NCE) de médula ósea de ratón (Fig. 2), debido a que estas células anucleadas mantienen a los MN aún después de la expulsión de su núcleo, lo que facilitaba su evaluación. Sin embargo, los métodos de tinción comúnmente utilizados para identificar MN (Feulgen y Giemsa) presentaron algunas desventajas, la principal radicó en que teñían inclusiones celulares que contenían ARN u otros materiales ácidos del mismo color que el ADN, lo cual dificultó la evaluación de los micronúcleos y la implementación del ensayo en otros modelos [Heddle & col., 2011; Hayashi, M., 2016]. Particularmente, los modelos en rata se excluyeron del ensayo de micronúcleos *in vivo* durante varios años, debido a que muestras de médula ósea de rata presentan abundantes gránulos de mastocitos parecidos a MN, por lo que a pesar de ser el modelo animal para toxicología que proporciona de manera natural más información concerniente al metabolismo y la farmacocinética humana, los modelos en rata no se incorporaron al ensayo de MN sino hasta la década de los 80s, cuando los grupos de trabajo de J. T. MacGregor y M. Hayashi propusieron de manera independiente dos métodos de tinción diferencial con colorantes fluorescentes para mejorar la clasificación de las células evaluadas [Krishna & Theiss, 1995; Hayashi, M., 2016].

MacGregor & col. [1980] fueron los primeros en incursionar en la evaluación de MN en *eritrocitos inmaduros* (reticulocitos) de sangre periférica de ratón por ello, con el fin de simplificar la preparación y evaluación de las muestras, en 1983 introdujeron un método de tinción que empleaba Hoechst 33258 (colorante que tiñe específicamente ADN) y pironina Y (colorante que tiñe tanto ADN como ARN) para identificar MN a través de un doble marcaje fluorescente en *reticulocitos* (RET) caracterizados por la presencia de ARN en su citoplasma (Fig. 2). En ese mismo año, Hayashi & col. [1983] implementaron otro método de tinción con naranja de acridina (colorante fluorescente de efecto metacromático que discrimina ADN de ARN) para diferenciar claramente MN de otros artefactos (p.ej. gránulos basófilos) presentes en muestras de médula ósea de cualquier especie, lo cual permitió incorporar modelos en rata al ensayo de micronúcleos en este tejido.

Poco después, mejoras en el método implementado por Hayashi & col. [1990] a través de cubreobjetos previamente cubiertos con naranja de acridina en los que se aplicaba directamente la muestra de sangre sin fijar (tinción supravital), permitieron evaluar con facilidad *reticulocitos micronucleados* (MN-RET) en sangre periférica de ratón. Con esta tinción Hayashi & col. observaron que la incidencia máxima de MN-RET de sangre periférica, que contienen abundante ARN en su citoplasma, era comparable y se producía casi 12 h después que la incidencia máxima de *eritrocitos policromáticos micronucleados* (MN-PCE) en médula ósea. Estos hallazgos plantearon la posibilidad de utilizar RET de sangre periférica en el ensayo de MN *in vivo* como remplazo de PCE y NCE utilizados en médula ósea, lo cual permitiría apreciar el efecto crónico del agente en cuestión, realizar múltiples muestreos en los animales tratados, simplificar la preparación de las muestras y disminuir la cantidad de

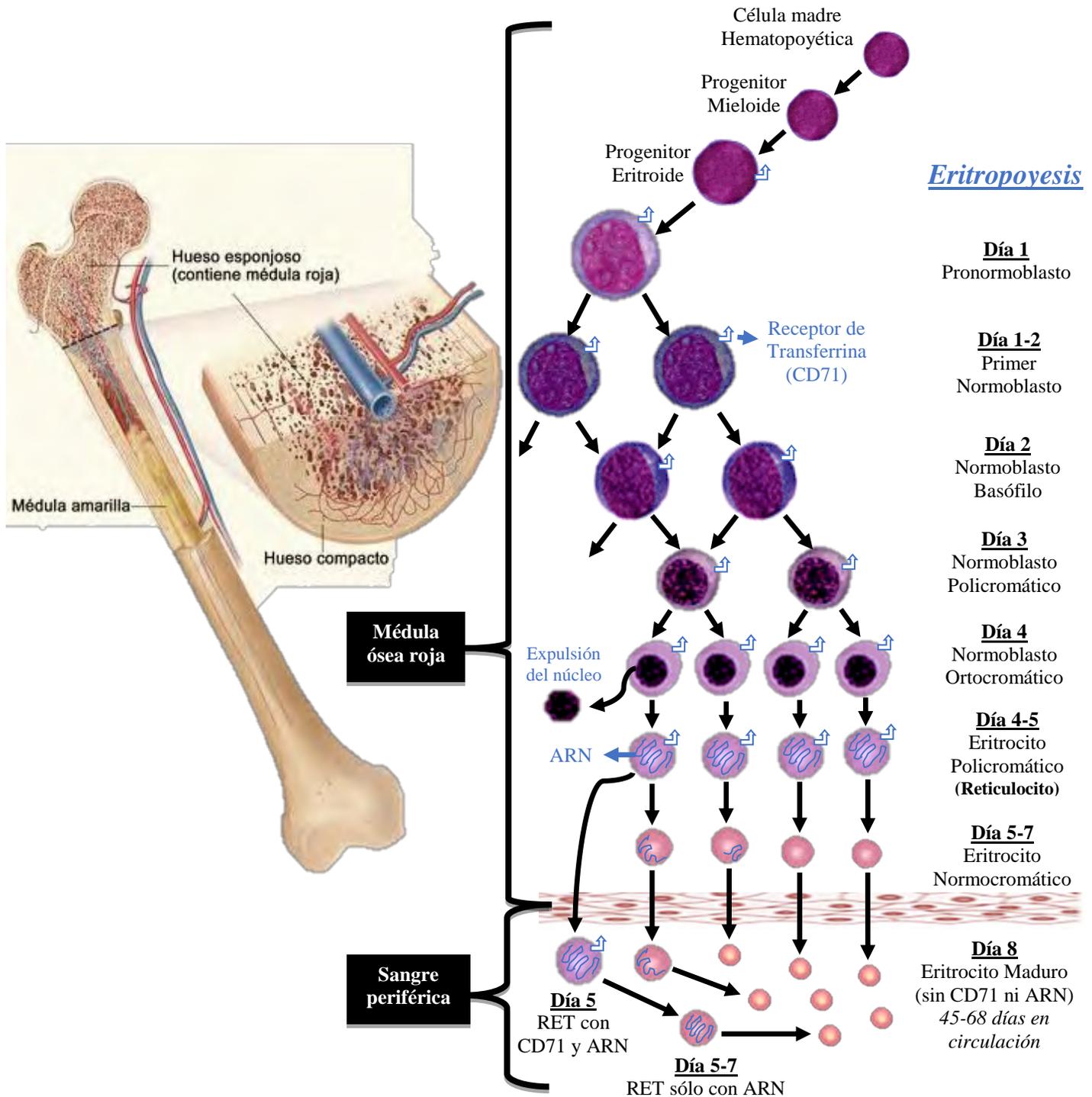


Fig. 2. Eritropoyesis en roedores

Esquema de la formación de glóbulos rojos o eritrocitos en roedores, la cual ocurre principalmente en médula ósea a partir de Células madre hematopoyéticas que proliferan y se diferencian a Células progenitoras mieloide y Células progenitoras eritroide [Harvey, J. W., 2012]. Las Células progenitoras eritroide generan Pronormoblastos, la división de un Pronormoblasto inicia una serie de aproximadamente cuatro divisiones en un período de 3-4 días, lo cual produce cerca de 16 Normoblastos ortocromáticos que no son capaces de volver a dividirse pero que continúan su etapa de maduración al aumentar su contenido de hemoglobina, disminuir su contenido de ARN ribosomal y expulsar su núcleo, después de lo cual son nombrados Eritrocitos policromáticos (PCE). Los PCE pueden completar su maduración en médula ósea al convertirse en Eritrocitos normocromáticos (NCE) o en sangre periférica donde son nombrados Reticulocitos (RET) [Jain, N. C., 1993; Thrall, M. A., 2006]. Se distinguen 2 tipos de RET en la corriente sanguínea, los que tienen ARN en su citoplasma (NT+) y un subconjunto de estos que portan al receptor de transferrina en su membrana (CD71+). En roedores los RET CD71+ dura aprox. 11 h en circulación, mientras que los RET NT+ circulan 1 o 2 días hasta perder todo su contenido de ARN y convertirse en Eritrocitos maduros, cuya vida media en pequeños roedores es de 45-68 días [Hughes-Jones & Wickramasinghe, 1996]. [Fig. tomada y modificada de Lofsness, K., 2008 y Winslow, T., 2014].

animales sacrificados. Sin embargo, la evaluación de MN en sangre periférica solo se planteó para ser realizada en ratones, ya que en esta especie las frecuencias de *eritrocitos micronucleados* (MN-ERITRO) basales e inducidas por algún agente, son similares tanto en médula ósea como en sangre periférica [Hayashi & col., 2000]. En otras especies como: ratas [Schlegel & MacGregor, 1984], perros [MacGregor & col., 1992], caballos [Bowdler, A. J., 2001] e incluso humanos [Schlegel & col., 1986], se había observado que los MN-ERITRO (maduros e inmaduros) inducidos por algún agente tóxico, son eliminados poco después de entrar a la circulación, debido a la función de filtración del bazo.

▪ **Eliminación de eritrocitos micronucleados a través del bazo**

El bazo es un órgano blando de consistencia friable que contiene al agregado más grande de tejido linfóide en el cuerpo [López, V., 2012]. Derivado del mesodermo embrionario, el bazo es un órgano ampliamente vascularizado, el cual recibe más del 5% del total del gasto cardíaco a través de la arteria esplénica, que se divide antes de llegar al órgano formando cinco o más ramas segmentarias, las cuales penetran en el hilio y se distribuyen en las trabéculas y parénquima del bazo, también llamada pulpa esplénica (Fig. 3) [López, V., 2012]. Una vez que las ramas segmentarias entran a la pulpa (roja o blanca), éstas reducen su tamaño y se denominan arterias centrales. Estas arterias vuelven a ramificarse hasta formar capilares arteriales o arteriolas, las cuales dirigen la sangre a los sinusoides esplénicos nombrados también sinusoides venosos o senos venosos, que son estructuras preliminares a las venas, únicas en este órgano [Ham, A. W., 1984; Bowdler, A. J., 2001].

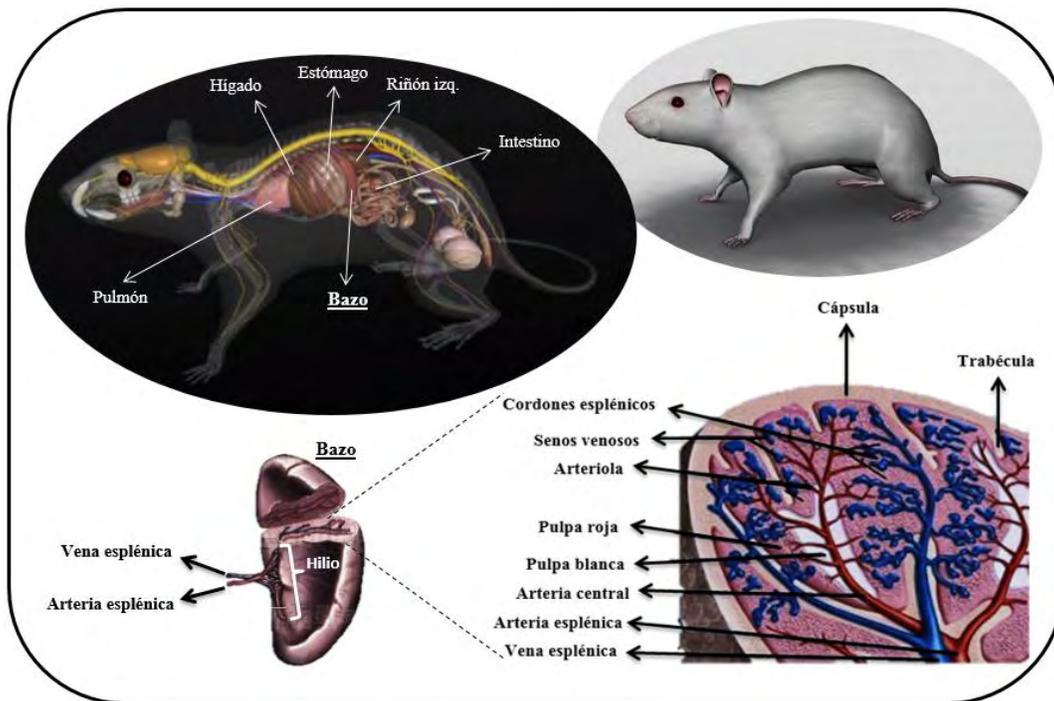


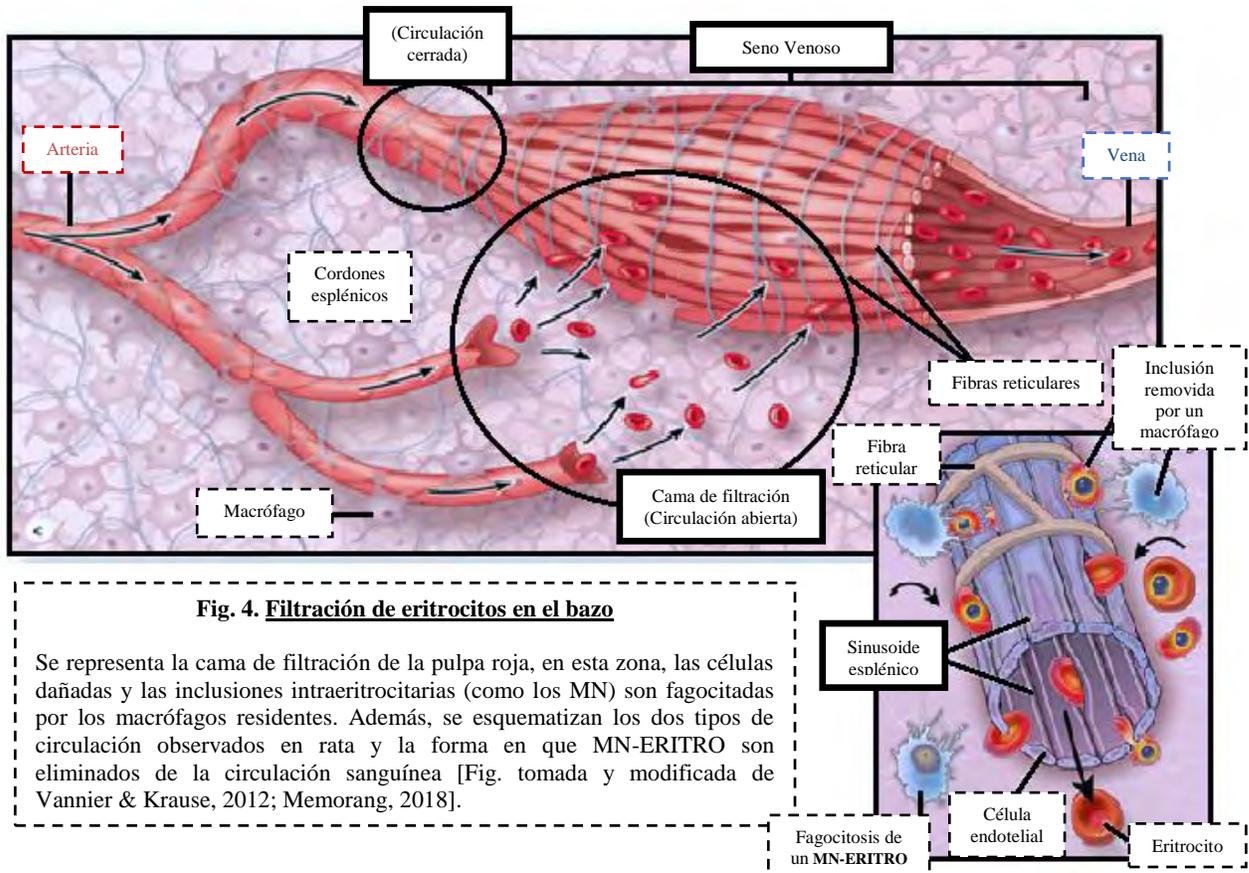
Fig. 3. Esquematación del bazo en rata

Se representa de manera general la localización y estructura del bazo en ratas. Este órgano linfóide se ubica en la parte alta de la cavidad abdominal, próximo al diafragma, y está formado externamente por una capa de tejido conectivo denso, fibras elásticas y músculo liso, denominada cápsula. De esta capa surgen involuciones hacia el interior (trabéculas), que forman compartimentos, los cuales en conjunto se denominan pulpa esplénica. Macroscópicamente pueden verse dos clases de pulpa esplénica: la pulpa roja y la pulpa blanca. La pulpa blanca es tejido linfóide distribuido en forma de pequeños islotes, mientras que la pulpa roja distribuida en el espacio restante, representa la parte del tejido linfático destinada a actuar como filtro celular [Ham, A. W., 1984; López, V., 2012]. [Fig. tomada y modificada de Bruzos & Bruzos, s.f.; Rey, C. A., 2016; Biosphera, 2018].

Existen tres teorías que explican la vía por la cual la sangre pasa del sistema arterial al sistema venoso (Fig. 4): 1) la teoría de la circulación cerrada, la cual propone que la sangre pasa de manera directa del capilar arterial al seno venoso, 2) la teoría de la circulación abierta, la cual propone que la sangre pasa primero a los cordones esplénicos y de ahí a los senos venosos, y 3) la teoría que propone la existencia de ambas circulaciones dependiendo del estado fisiológico del órgano [Ham, A. W., 1984; Bautista & col., 1994]. Seki & Abe [1985] observaron *la presencia de ambas circulaciones en el bazo de ratas*, mientras que en especies como el perro, gato, cerdo y caballo observaron únicamente circulación abierta. Fern & col. (*The complete spleen*) mencionan que en humanos, la circulación del bazo es predominantemente abierta, cruzando la sangre a través de la malla reticular de la pulpa roja (Fig. 4), cuyos principales componentes vasculares son los *senos venosos*, estructuras compuestas de una capa de células endoteliales largas y estrechas rodeadas de una membrana basal altamente fenestrada, y los *cordones esplénicos* o cordones de Billroth, retículo dispuesto en cordones situado entre dos sinusoides contiguos. Estos últimos, son zonas de actividad fagocitaria intensa donde se remueven elementos de la circulación a través de la gran cantidad de macrófagos residentes y linfocitos procedentes de la pulpa blanca que ahí se encuentran [Bowdler, A. J., 2001; López, V., 2012].

El proceso de filtración y eliminación de MN-ERITRO (maduros e inmaduros) que realiza el bazo aún no está claro, se sabe que *a través de circulación abierta eritrocitos viejos o anormales, inclusiones intraeritrocitarias y partículas extrañas, son removidas del torrente sanguíneo y fagocitadas por los macrófagos residentes* [López, V., 2012]. Además, se sabe que la forma en la que se lleva a cabo este proceso depende de cambios activos en las células endoteliales de los senos venosos y alteraciones en la membrana o daño en los eritrocitos que puede ser reconocido por los macrófagos. Los cambios activos en las células endoteliales influyen en el paso de los eritrocitos de la estructura reticular de los cordones esplénicos al seno venoso, mientras que alteraciones en la membrana de los eritrocitos como exposición de fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana, residuos de carbohidratos modificados en la membrana externa y/o proteínas de membrana modificadas, pueden inducir su eliminación al ser reconocidas estas modificaciones por receptores de macrófagos que se encuentran en los cordones esplénicos [Harvey, J. W., 2012; López, V., 2012].

Particularmente, en el caso de los MN-ERITRO y en general en los eritrocitos con alguna inclusión intraeritrocitaria, el bazo a través de circulación abierta realiza un proceso exclusivo de este órgano, ya que estas células dañadas pueden ser eliminadas completamente de la circulación o puede ser eliminada únicamente la inclusión intraeritrocitaria, manteniendo la integridad del eritrocito (Fig. 4). Lo que sucede es que los MN-ERITRO tienen que deformarse para pasar de los cordones esplénicos al seno venoso, ocasionando que: 1) el MN-ERITRO sea reconocido por un macrófago y fagocitado completamente en el proceso, o 2) que la inclusión (el MN) al no ser deformable como el resto del eritrocito, sea retenida y fagocitada por los macrófagos residentes de los cordones esplénicos [Harvey, J. W., 2012; López, V., 2012]. Este proceso no ha sido bien estudiado, sin embargo, a las zonas donde elementos son eliminados de la circulación, y que varían en localización y arreglo de las células reticulares que las componen, se les denomina “*camas de filtración*”. La cama de filtración o malla de la pulpa roja consiste en capilares arteriales terminales, que desembocan en este sitio especializado, y senos o capilares venosos que lo drenan (Fig. 4). La cantidad de sangre que desemboca en este sitio y su duración en él, es decir el tránsito esplénico, influye en la eliminación de las células dañadas o anormales del torrente sanguíneo, ya que se ha reportado que al aumentar el tránsito esplénico, las células sucumben a la destrucción por los macrófagos [Bowdler, A. J., 2001].



Además de su función de filtración, la malla de la pulpa roja participa en la diferenciación de RET en su etapa final de maduración, reteniéndolos en esta zona antes de su reincorporación a la circulación sanguínea como *eritrocitos maduros* (ERITRO maduros). Cabe mencionar que, aunque en menor medida, la cama de filtración de la zona Marginal que es una zona ubicada en la periferia de la pulpa blanca cuya superficie externa se mezcla con la estructura de la pulpa roja, también participa en la remoción de eritrocitos viejos, anormales u opsonizados de la circulación [Bowdler, A. J., 2001; López, V., 2012].

▪ **El bazo y el ensayo de micronúcleos *in vivo***

A pesar de la función de filtración del bazo en importantes modelos toxicológicos como la rata, las ventajas del uso de eritrocitos de sangre periférica en el ensayo de MN *in vivo* motivaron algunos estudios, como los realizados por Romagna & Staniforth [1989] y Hayashi & col. [1992], quienes reportaron la posibilidad de usar sangre periférica de ratas en este ensayo, si la evaluación se restringe únicamente a la subpoblación de *eritrocitos inmaduros* (RET), aquellos recién ingresados a la circulación y que por lo tanto, no han experimentado la función de filtración del bazo.

Particularmente, Hayashi & col. [1992] observaron que en ratas con bazo tratadas con Mitomicina C, la frecuencia de *reticulocitos micronucleados* (MN-RET) con abundante ARN en su citoplasma era

mayor que la frecuencia de MN-RET con poco ARN (los remanentes de ARN se pierden al madurar el RET), diferencia que no fue significativa en el grupo de ratas a las cuales se les extirpó el bazo (esplenectomizadas) tratadas con el mismo agente, lo que sugirió que alguna porción de MN-RET desaparece después de entrar al torrente sanguíneo debido a la presencia del bazo. Además, reportaron que en ratas con bazo administradas con ciclofosfamida, la incidencia de MN-RET con abundante ARN, obtenida a las 48 h después del último tratamiento, era similar a la incidencia de MN-PCE en médula ósea evaluada en el tiempo estándar establecido de muestreo (24 h después del último tratamiento). Estos resultados son la base para evaluar la porción más joven de ERITRO de sangre periférica de rata (RET con abundante ARN) en el sistema de MN a través del ensayo *in vivo*, ya que observaron que se descarta la función de filtración y eliminación por parte del bazo de estas células dañadas. *No obstante, estudios enfocados en el tiempo que tardan en eliminarse MN-ERITRO (maduros e inmaduros) que entran en circulación, es decir, su cinética de aparición y eliminación del torrente sanguíneo, así como las posibles alteraciones debido a la función de filtración del bazo en la frecuencia de estas células micronucleadas, no fue abordada* [Hayashi & col., 2000].

Los estudios realizados para validar el ensayo de MN *in vivo* en eritrocitos de sangre periférica de rata, se enfocaron principalmente en demostrar una buena correlación entre la frecuencia de MN-RET con abundante ARN en sangre periférica y la frecuencia de MN-PCE en médula ósea. Para ello, diversas colaboraciones interlaboratorio se efectuaron, una de las más importantes fue la del Grupo de estudio colaborativo para la prueba de MN de la Sociedad de mutágenos ambientales de Japón (CSGMT/JEMS), la cual a través del ensayo de MN y tinción supravital con naranja de acridina evaluó la genotoxicidad tanto en médula ósea como en sangre periférica de ratas tratadas con diferentes compuestos químicos, obteniendo una concordancia entre médula ósea y sangre periférica del 92%, lo que confirmó que al utilizar a la porción de RET con abundante ARN en su citoplasma, se descarta la función de filtración del bazo de estas células micronucleadas [Wakata & col., 1998].

Sin embargo, pese a que la correlación obtenida fue buena, la evaluación de MN-RET en sangre periférica a través de microscopía óptica implicaba una intensa mano de obra, ya que el porcentaje de RET que entran a circulación sanguínea es muy bajo (Tabla 1). Por lo tanto, para superar este problema y mejorar la objetividad y sensibilidad del ensayo de MN en sangre periférica, se propuso el uso de técnicas automatizadas de sistemas de Análisis de imágenes y Citometría de flujo (CTF). No obstante, la técnica de CTF tuvo mayor auge en el ensayo debido a que además de disminuir considerablemente el tiempo de evaluación y la mano de obra, esta técnica permite registrar y discernir con mayor objetividad una gran cantidad de RET a partir de los cuales se puede evaluar la presencia de MN [Hayashi & col., 2000].

- **Ensayo de micronúcleos *in vivo* por citometría de flujo**

La técnica de citometría de flujo permite distinguir poblaciones celulares a través de la medición simultánea de múltiples características físicas en células individuales, las cuales fluyen a través de una corriente y son incididas por un haz de luz láser que al llegar a cada célula se dispersa y ocasiona la excitación de partículas fluorescentes, acto que es registrado en un sistema óptico-electrónico acoplado que analiza tanto la dispersión de la luz frontal (Forward Scatter - FSC) para determinar el tamaño relativo de las células, así como la dispersión de luz lateral (Side Scatter - SSC) para determinar la complejidad o granularidad celular, además de la fluorescencia intrínseca o controlada de las mismas

para identificar poblaciones celulares definidas, principalmente a través de fluorocromos acoplados a anticuerpos [Becton-Dickinson, 2002; Salgado, M., 2002].

La técnica de citometría de flujo fue propuesta para el ensayo de micronúcleos en eritrocitos por Hutter & Stöhr [1982], poco después de que MacGregor & col. [1980; 1983] trabajara en sangre periférica de ratón, sin embargo, problemas metodológicos debidos principalmente a resultados falso-positivos y la no diferenciación entre la porción de RET con abundante ARN de la porción con poco ARN, llevaron a que ésta y otras metodologías como la propuesta por Leary & Tometsko [1986], no tuvieran trascendencia al incorporar el análisis por citometría de flujo al ensayo de MN *in vivo*. No obstante, avances significativos en esta área se produjeron cuando Grawé & col. [1992] describieron un método que era capaz de evitar resultados falso-positivos al utilizar colorantes fluorescentes como Hoechst 33342 y Naranja de tiazol para teñir ADN y ARN, respectivamente. Estos colorantes al ser excitados por luz ultravioleta y luz visible, a través de un citómetro de doble láser, permitieron distinguir RET basados en su contenido de ARN y disminuir la frecuencia de eventos falso-positivos al utilizar dos colorantes con diferentes longitudes de onda (Tabla 4).

La metodología propuesta por J. Grawé, a pesar de haber obtenido una buena correlación entre microscopia óptica y CTF en el ensayo de micronúcleos *in vivo* en sangre periférica de ratón, requería de un citómetro de doble láser, instrumento que no era muy común en los laboratorios de toxicología de aquella época. Por lo tanto, otros métodos alternativos se sugirieron para evaluar MN-RET de sangre periférica a través de un sólo láser. Estos nuevos métodos implicaban el uso de colorantes metacromáticos como naranja de acridina, fluorocromos acoplados a anticuerpos específicos contra proteínas de membrana características de alguna etapa o tipo celular, perlas magnéticas, columnas de fraccionamiento celular e incluso eritrocitos infectados con malaria como bio-estándar para definir el rango de evaluación de los MN [Hayashi & col., 2000; Dertinger & col., 2011; Montero & col., 2016].

Sin embargo, de las metodologías sugeridas la que tuvo mayor auge y posteriormente se vendió como un Kit comercial, fue la propuesta por Dertinger & col. en 1996. Esta metodología se basó principalmente en la identificación de MN-RET a partir de la expresión del receptor de transferrina (CD71), ya que al ser una proteína integral de membrana que media la captación de complejos transferrina-hierro, se pierde su expresión tempranamente en la maduración del RET circulante (aprox. 11 h después de salir a circulación sanguínea en ratas), debido a que disminuye la síntesis de hemoglobina [Marsee & col., 2010; Montero & col., 2016]. Por lo tanto, al utilizar a CD71 para identificar a los MN-RET que han ingresado a la circulación, S. Dertinger *descartaba en buena medida la función de filtración y eliminación por parte del bazo en estas células dañadas*. Además al conjugar al anticuerpo para reconocer a CD71 con el fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) se podían utilizar diferentes detectores de fluorescencia en un dispositivo de un solo láser, para discriminar entre la longitud de onda emitida por FITC (519 nm) y la longitud de onda emitida por el colorante yoduro de propidio (617 nm), utilizado para teñir ADN, lo que permitió que el ensayo de micronúcleos bajo esta metodología llegara a ser más reproducible y transferible a otros laboratorios, en comparación con la metodología propuesta por Grawé [Salgado, M., 2002; Bemis & col., 2008].

Pocos años después, el ensayo de MN por CTF se perfeccionó al implementar un tercer marcador para reconocer y eliminar del análisis a las plaquetas, estructuras que por sus características podían ser confundidas con MN-RET. Este tercer marcador fue la proteína Integrina $\beta 3$ (CD61), la cual participa en la adhesión y señalización celular de los trombocitos, por lo que pudo ser identificada a través del

anticuerpo anti-CD61 acoplado al fluorocromo Ficoeritrina (PE). Esta modificación hizo más sensible la detección de MN-RET, ya que superaba el problema que agregados de plaquetas o plaquetas pudieran estar interfiriendo con la evaluación [Dertinger & col., 2004]. Sin embargo, la validación rigurosa necesaria para poder incorporar el ensayo de micronúcleos en eritrocitos a la batería de pruebas estándar de genotoxicidad no se logró sino hasta 2008, después de varios estudios colaborativos en los cuales se analizó la reproducibilidad y transferibilidad del ensayo de MN *in vivo* de PCE en médula ósea por microscopia óptica a eritrocitos jóvenes (RET) en sangre periférica por CTF, tanto en modelos en rata como en ratones, evaluando una amplia gama de agentes genotóxicos conocidos [Hamada & col., 2001; Torous & col., 2001; Torous & col., 2005; MacGregor & col., 2006; Hayashi & col., 2007; Kissling & col., 2007].

Tabla 1. Frecuencia basal de reticulocitos micronucleados reportada en sangre periférica de ratas con bazo y esplenectomizadas, utilizando citometría de flujo.

% MN-RET ¹	% RET	Tiempo de Muestreo ²	Vehículo control	Edad	Modelo animal	Referencia
~ 0.13	~ 3.79	24 h	Agua destilada			
~ 0.17 ³	~ 2.5 ³					
~ 0.12	~ 3.8	24 h	Solución salina	4-5 semanas	Ratas macho Sprague-Dawley	MacGregor & col., 2006
~ 0.19 ³	~ 2.5 ³					
~ 0.09	~ 3.8	24 h	Buffer de fosfato salino			
~ 0.16 ³	~ 2.8 ³					
0.08±0.02	~ 1.47	3 h	Aceite de maíz			
0.10±0.05	~ 1.53	24 h				
0.09±0.02	~ 2.06	44 h			Ratas macho Han-Wistar	
0.13±0.03	~ 2.16	3 h		7-10 semanas	y Sprague-Dawley	Bowen & col., 2011
0.14±0.04	~ 1.85	24 h	Solución salina			
0.15±0.03	~ 2.33	44 h				
0.07±0.02	~ 2.26	3 h				
0.09±0.03	~ 2.45	24 h	Agua purificada			
0.09±0.03	~ 3.18	44 h				
~ 0.1	1.2-1.5	24 h	Buffer de fosfato salino	-	Ratas macho F344	Bhalli & col., 2013
~ 0.1	5.0-3.5		Agua	7-8 semanas	Ratas macho Sprague-Dawley	
~ 0.1	1.0-4.0	24 h	Aceite de sésamo			Chang & col., 2014
0.63±0.22	~ 1.59	24 h	Agua purificada	-	Ratas macho Wistar	Montero & col., 2016
0.77±0.39 ⁴	~ 7.23 ⁴					

¹ Salvo que se indique lo contrario, las ratas tenían bazo y se utilizó “CD71” como marcador para identificar RET.

² Tiempo en el que se realizó la toma de sangre posterior al último tratamiento con el vehículo control.

³ Ratas a las que se les extirpo el bazo 2-3 semanas antes del muestreo.

⁴ Marcador utilizado para identificar RET “naranja de tiazol”.

Si bien, el Grupo de trabajo de expertos de la ICH incluyó en la directriz S2(R1) publicada en Marzo de 2008, al ensayo de MN *in vivo* en eritrocitos de sangre periférica de roedores como una alternativa dentro de la batería de pruebas estándar para genotoxicidad, también hizo una consideración con respecto a los modelos en rata (y en general, a todos los modelos que tengan una eficiente filtración de células dañadas por parte del bazo), ya que al remover rápidamente MN-ERITRO de la circulación, era necesario que en estos modelos el método usado para la evaluación asegurara que el análisis de los MN se realizara en la porción más joven de eritrocitos (RET) y además asegurara que el tamaño de la muestra fuera lo suficientemente grande para proporcionar una sensibilidad estadística adecuada dado los niveles bajos de RET en sangre (Tabla 1). Por otro lado, en cuanto a la técnica de CTF el grupo de trabajo señaló que ésta puede ser utilizada para lograr una buena sensibilidad estadística, siempre que sea adecuadamente validada [ICH, 2008; 2011].

El ensayo de MN en eritrocitos de roedores por CTF a pesar de haber sido integrado a las pruebas de rutina de los laboratorios de toxicología, no fue abordado con relación a la fluctuación de estas células micronucleadas y su tasa de eliminación a través del bazo. Solo algunas investigaciones como las realizadas por MacGregor & col. [2006] y Hayashi & col. [2007] definieron el tiempo adecuado para evaluar *reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina* (MN-RET CD71+) basándose en las respuestas máximas asociadas a exposiciones agudas, obtenidas en menos de 100 h después del último tratamiento, lo que los llevó a establecer una ventana de muestreo entre las 36 y 72 h post-tratamiento.

Estudios posteriores realizados con otras especies que eliminan eficientemente células dañadas a través del bazo como perros, primates no humanos y humanos demostraron que al utilizar la técnica de CTF, podría incluso incorporarse el ensayo de MN en eritrocitos a los estudios de evaluación de seguridad y monitoreo de daño genotóxico en poblaciones humanas [Heddle & col., 2011]. Sin embargo, la frecuencia baja de *RET positivos al receptor de transferrina* (RET CD71+) en humanos (10-20 veces más baja que en ratas) llevó a Montero & col. [2016] a proponer una metodología por CTF basada tanto en el receptor de transferrina como en el contenido de ARN en citoplasma para identificar RET, ya que planteó que al evaluar solo a la porción de RET CD71+ se ignora a una gran cantidad de RET, que podrían ser evaluados y proveer valiosa información que permitiría disminuir la variabilidad obtenida entre los diferentes laboratorios que han realizado estudios en humanos.

No obstante, ya sea utilizando al receptor de transferrina o al ARN como marcador para identificar RET, es indispensable determinar en los modelos en los que se ha establecido la eficiente filtración por parte del bazo de estas células micronucleadas, el tiempo que permanecen en circulación antes de ser eliminadas del torrente sanguíneo, ya que ello permitirá obtener importante información farmacocinética y toxicológica de los agentes evaluados a través del ensayo de MN en eritrocitos de sangre periférica.

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Actualmente existen muchas investigaciones que han proporcionado evidencia suficiente para integrar el ensayo de micronúcleos en sangre periférica usando citometría de flujo, a los ensayos de toxicología general. Sin embargo, la eficiencia de la función del bazo en la captura y eliminación de eritrocitos micronucleados que entran a circulación sanguínea no ha sido completamente caracterizada, por tal motivo en el presente trabajo nos planteamos estudiar el tiempo que tardan en eliminarse estas células dañadas y si se eliminan completamente del sistema circulatorio.

HIPÓTESIS

Al ser el bazo el principal órgano encargado de la eliminación de eritrocitos micronucleados que entran a circulación sanguínea, las ratas con bazo tratadas con un agente genotóxico eliminarán significativamente este tipo de daño, mientras que las ratas esplenectomizadas tratadas con el mismo agente no lo harán.

OBJETIVOS

General

- ✚ Determinar la cinética de eliminación de reticulocitos y eritrocitos micronucleados a través del bazo.

Particulares

- Inducir la formación de micronúcleos en precursores eritroides de médula ósea de ratas con bazo y ratas esplenectomizadas, a través de la administración de un compuesto genotóxico a diferentes dosis.
- Evaluar mediante citometría de flujo la variación a lo largo de 6 semanas en la frecuencia de reticulocitos micronucleados y eritrocitos maduros micronucleados, presentes en muestras de sangre periférica de las ratas tratadas con el compuesto genotóxico seleccionado.
- Comparar las frecuencias obtenidas de reticulocitos micronucleados y eritrocitos maduros micronucleados en cada tiempo de muestro, para con ello determinar su cinética de eliminación.
- Comparar la frecuencia de reticulocitos micronucleados considerados por su contenido de ARN con respecto a la frecuencia de reticulocitos micronucleados que portan el receptor de transferrina en su membrana, para con ello determinar la información que se pierde al evaluar únicamente a una porción de los reticulocitos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

▪ Modelo experimental

El modelo experimental utilizado fue ratas macho Wistar, 27 ejemplares, de al menos cinco semanas de edad (200g – 285g), las cuales se aclimataron durante una semana a condiciones de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, humedad relativa del $48\% \pm 1$ y ciclos de luz/oscuridad de 12 h, además se les proporcionó agua y alimento sin restricción.

Todo el trabajo con los animales, incluida la toma de las muestras, se realizó en la sección 1 de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), protocolo con número de folio ID 279.

▪ Compuesto genotóxico

En el presente estudio se decidió utilizar al compuesto genotóxico hidroquinona (Anexo B) para inducir la formación de MN en precursores eritroides de médula ósea de ratas, debido a los resultados positivos que se han obtenido en este laboratorio al evaluar a la hidroquinona (HQ) a través del ensayo de micronúcleos en sangre periférica [Montero & col., 2016]. Además, existe un gran interés por parte de este grupo de trabajo en conocer los efectos genotóxicos a largo plazo que ocasiona la exposición a benceno y sus metabolitos (como la HQ).

Por otro lado, a pesar de los estudios reportados en donde se ha evaluado la genotoxicidad y en específico, la mutagenicidad del compuesto HQ *in vivo* (Anexo B), aún no es claro el efecto a largo plazo que este compuesto puede causar. Sin embargo, al investigar los efectos tóxicos del benceno en médula ósea, se ha visto que la HQ puede ser la responsable de la anemia aplásica y leucemia mieloide aguda observada a largo plazo por exposición a benceno [Gokden & Lazzarotto, 2012]. De modo que, evaluar el efecto genotóxico (asociado con la incidencia o progresión de tumores) que ocasiona la HQ a largo plazo en médula ósea, a través del ensayo de MN en eritrocitos de sangre periférica, no solo permitió observar como la HQ contribuye con la toxicidad del benceno, sino también permitió conocer la cinética de eliminación de los MN-RET, lo cual fue el principal objetivo de este estudio.

▪ Grupos de exposición

Las 27 ratas se dividieron aleatoriamente en seis grupos de tratamiento de acuerdo con la Tabla 2. A los grupos 5 y 6 se les extirpó el bazo con la ayuda del personal de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, 15 días antes del primer tratamiento. El grupo 1 y el grupo 5 se utilizaron como grupos control negativo y recibieron únicamente 1 ml de agua potable, mientras que el resto de los grupos recibieron dosis diferentes del compuesto genotóxico hidroquinona utilizando 1 ml de agua potable como vehículo.

Adicionalmente, se realizaron mediciones semanales del peso corporal y observaciones del comportamiento de cada grupo de ratas durante todo el estudio.

Tabla 2. Grupos de tratamiento.

Grupo	No. de animales	Bazo	Hidroquinona administrada
1	5	Con bazo	0 mg/kg peso
2	5	Con bazo	25 mg/kg peso
3	5	Con bazo	50 mg/kg peso
4	5	Con bazo	100 mg/kg peso
5	3	Sin bazo ¹	0 mg/kg peso
6	4	Sin bazo ¹	50 mg/kg peso

¹ Grupo de ratas esplenectomizadas 15 días antes del primer tratamiento.

▪ **Vía de administración y régimen de tratamiento**

El compuesto hidroquinona (HQ) se administró vía oral por medio de una sonda durante dos días consecutivos (1 dosis/ 24 h /2 días), (Tabla 3). Los grupos control negativo recibieron el mismo régimen de tratamiento administrando únicamente el vehículo.

La administración del compuesto HQ se realizó por vía oral debido a que la vía de administración comúnmente usada (intraperitoneal) para demostrar la genotoxicidad *in vivo* de la HQ, se considera inapropiada de acuerdo con los mecanismos de exposición al compuesto (Anexo B).

▪ **Toma de muestra**

El régimen de muestreo que a continuación se explica, se basó en un estudio realizado por Hamada & col. en 2001, quienes evaluaron la inducción de MN en eritrocitos de sangre periférica de 15 compuestos químicos administrados de forma continua durante 28 días. Además, para no estresar a las ratas y al mismo tiempo obtener la mayor cantidad de información posible, se dividió el muestreo de cada semana como se indica en la Tabla 3. Esta forma de muestreo no interfirió con la comparación de las frecuencias evaluadas, ya que se comparó a lo largo del tiempo dentro de cada grupo de tratamiento, no entre grupos.

Se tomó una muestra de sangre de la punta de la cola de todos los animales de cada grupo 24 h antes del tratamiento, y 24 h después de finalizado el tratamiento se tomó la segunda muestra de los grupos 3 y 6; 48 h después de finalizado el tratamiento se tomó la segunda muestra de los grupos 2 y 4; finalmente 72 h después de finalizado el tratamiento se tomó la segunda muestra de los grupos 1 y 5. Se realizaron 4 muestreos más en cada grupo (uno por semana) siguiendo el mismo orden que el segundo muestreo (el primer día de la semana grupos 3 y 6, el segundo día grupos 2 y 4, finalmente el tercer día grupos 1 y 5). Se dejó una semana de reposo entre el penúltimo y el último muestreo (Tabla 3).

Se colectaron aproximadamente 0.3 ml de sangre de cada muestra, lo cual se mezcló con 3µl de heparina para evitar su coagulación. Las muestras se resguardaron en una hielera hasta el momento de su fijación.

Tabla 3. Protocolo de administración y muestreo.

Días (h) post-tratamiento	0 (0 h)	1era Administración de HQ	2da Administración de HQ	1 (24 h)	2 (48 h)	3 (72 h)
Semanas						
1	Muestreo todos los grupos	Todos los grupos	Todos los grupos	Muestreo grupos (3 y 6)	Muestreo grupos (2 y 4)	Muestreo grupos (1 y 5)
	5	6	7	8	9	10
2	Muestreo grupos (3 y 6)	Muestreo grupos (2 y 4)	Muestreo grupos (1 y 5)	-	-	-
	12	13	14	15	16	17
3	Muestreo grupos (3 y 6)	Muestreo grupos (2 y 4)	Muestreo grupos (1 y 5)	-	-	-
	19	20	21	22	23	24
4	Muestreo grupos (3 y 6)	Muestreo grupos (2 y 4)	Muestreo grupos (1 y 5)	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
	33	34	35	36	37	38
6	Muestreo grupos (3 y 6)	Muestreo grupos (2 y 4)	Muestreo grupos (1 y 5)	-	-	-

Nota. Los grupos utilizados se describen en la Tabla 2.

▪ **Fijación de muestras**

Todo el proceso de fijación se realizó a 4°C. Para cada muestra se tomaron 100 µl de sangre y se disolvieron homogéneamente en 320 µl de solución heparinizada (heparina diluida a 500U/ml con BBS). En seguida se tomaron 180 µl de la sangre diluida con una micropipeta, se introdujo la punta en un criotubo con 2 ml de metanol a -80°C, que se encontraba en agitación por medio de un vórtex, entonces se dejó caer la muestra en el centro a través de un solo impulso. Finalmente, se tapó el criotubo y agitó con el vórtex por 5 segundos más, terminando con una agitación manual. Se fijó un solo tubo por cada muestra de sangre. Todos los criotubos ya fijados, se resguardaron a -80° C hasta el momento de su tinción.

▪ **Tinción para detectar MN-RET por citometría de flujo**

La tinción para detectar MN-RET se realizó como lo describieron Montero & col. [2016]. Para cada muestra, se utilizaron 500 µl de sangre fijada previamente y se diluyeron en 11.5 ml de BBS al 1% de SFB, manteniendo una temperatura no mayor a 4°C. En seguida, se centrifugó la dilución a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se aspiró el sobrenadante dejando aproximadamente 100 µl para ser resuspendidos con el paquete celular, de esta suspensión se tomaron 25 µl y se incubaron en oscuridad con la mezcla de anticuerpos (Anexo C). Se realizaron dos períodos de incubación, primero a 4°C durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se adicionó 2 ml de la mezcla de colorantes (Anexo C) a la suspensión con anticuerpos y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente, todas las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos para posteriormente resguardarlas a 4°C hasta su evaluación en el Citómetro de flujo, aproximadamente 12 h después de la última incubación.

▪ **Adquisición y análisis de muestras por citometría de flujo**

Las muestras se adquirieron en el Citómetro Attune® Acoustic Focusing con láser azul (longitud de onda emitida a 488 nm) y violeta (longitud de onda emitida a 405 nm), ubicado en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. La adquisición u obtención de los tipos celulares deseados y el análisis, se controlaron con el Software Attune® Cytometric. Los canales utilizados para la adquisición fueron: el canal BL1-H con el que se detectó la fluorescencia de naranja de tiazol, el canal BL2-H con el que se detectó la fluorescencia de PE, el canal BL3-H con el que se detectó la fluorescencia de PE-Cy7 y el canal VL1-H con el que se detectó la fluorescencia de Hoechst 33342 (Tabla 4). Para evitar traslape entre cada detector, debido a la cercanía de las longitudes de onda de los fluorocromos utilizados, se realizó una compensación previa a cada adquisición con controles adecuados (Anexo D).

Tabla 4. Detectores utilizados para identificar cada marcador celular evaluado.

Detector	Láser	Fluorocromo detectado	Longitud de onda de la emisión (nm)	Marcador celular
BL1-H	Azul	Naranja de tiazol (NT)	533	ARN
BL2-H	Azul	Ficoeritrina (PE)	570	Integrina β3 (CD61)
BL3-H	Azul	Ficoeritrina combinada con cianina 7 (PE-Cy7)	780	Receptor de Transferrina (CD71)
VL1-H	Violeta	Bisbenzimidida Hoechst 33342	460	ADN

[De acuerdo con Montero & col., 2016]

Cada muestra se analizó por triplicado, estableciendo un límite de adquisición de 5,000 RET positivos al receptor de transferrina por cada triplicado, con un total de 15,000 RET CD71+ por muestra.

Para determinar el límite de adquisición se crearon 3 compuertas (Fig. 5): la compuerta que cuantificó eritrocitos a través de discernir entre tamaño y complejidad celular (R1), la compuerta que cuantificó únicamente células individuales (R2) considerada a partir de la subpoblación R1, y la compuerta que cuantificó células positivas a CD71-PE-Cy7 (R4) considerada a partir de la subpoblación R2. El citómetro terminó la adquisición cuando se contabilizaron por cada triplicado 5,000 células positivas a CD71-PE-Cy7 en R4, cuando el aparato contabilizó un total de 500,000 células o cuando el volumen establecido de adquisición (300 μ l) fue insuficiente.

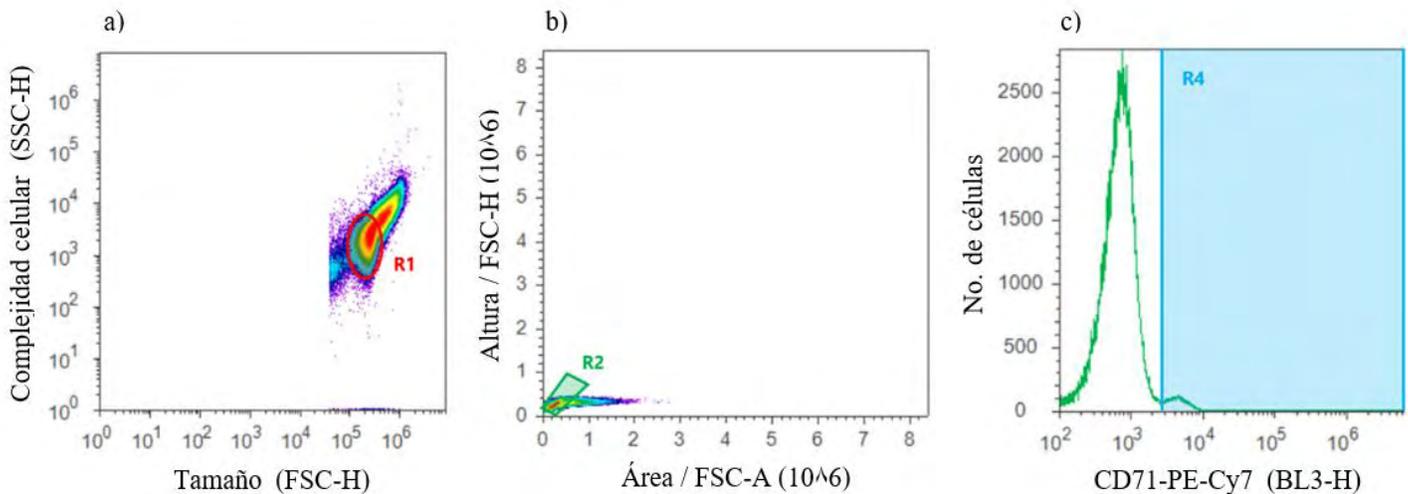


Fig. 5. Compuertas de adquisición

Se muestran las gráficas a partir de las cuales se obtuvieron 15,000 células CD71+. **a)** tamaño vs complejidad celular, usada para seleccionar la población de eritrocitos (compuerta R1); **b)** área vs altura, usada para determinar células individuales (compuerta R2) a partir de la subpoblación R1; **c)** distribución de frecuencias de células positivas a CD71-PE-Cy7 (compuerta R4) a partir de la subpoblación R2. Se marcan en paréntesis los detectores utilizados para cuantificar cada señal.

Todos los datos obtenidos a partir de cada muestra se almacenaron junto con la matriz de adquisición y se analizaron en otra computadora usando el software Attune Cytometric (v2.1), en donde se crearon compuertas adicionales (Fig. 6) a partir de la subpoblación R2, para determinar específicamente el número de ERITRO maduros y RET, con y sin micronúcleos.

Una de las compuertas adicionales se creó para identificar RET a través de su contenido de ARN marcado con naranja de tiazol (compuerta R3), mientras que las otras dos compuertas se crearon para identificar células no eliminadas durante la fase de lavado de la tinción: como plaquetas, identificadas a través de la proteína Integrina β 3 acoplada a PE (compuerta R5), y algunas células nucleadas no eliminadas, identificadas a través de la intensidad de fluorescencia del colorante Hoechst 33342 (compuerta R6).

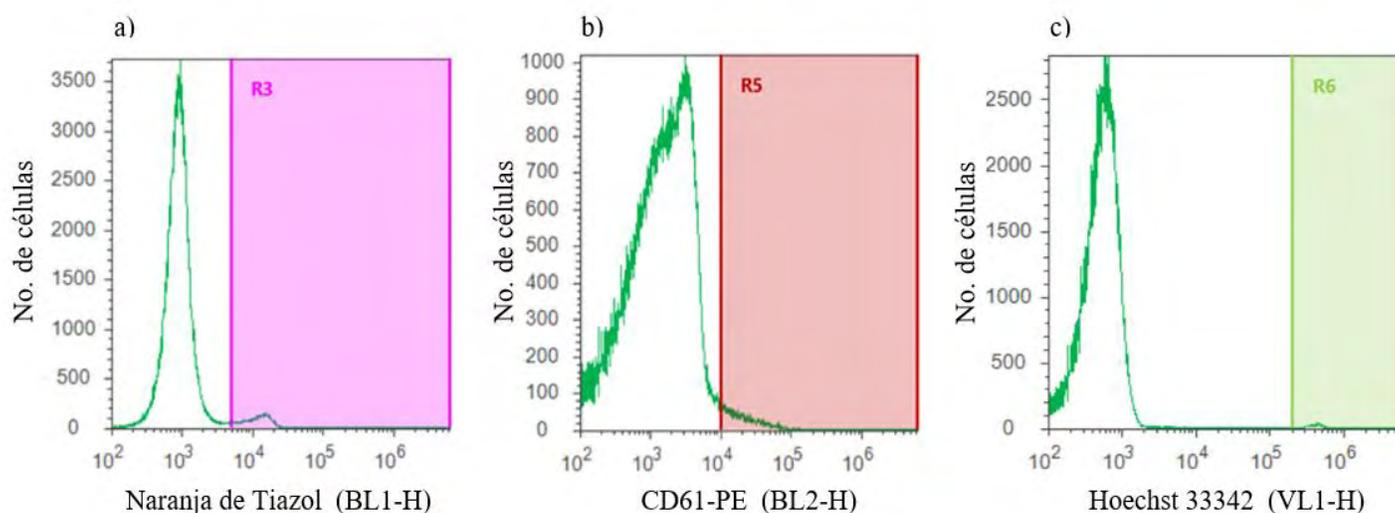


Fig. 6. Compuertas establecidas para discernir Eritrocitos de otros tipos celulares

Se muestran las gráficas creadas a partir de la subpoblación R2 para identificar a las células de interés. **a)** Corresponde a células con un gran contenido de ARN, positivas a Naranja de tiazol (compuerta R3), identificadas por el detector BL1-H; **b)** corresponde a células positivas al anticuerpo anti-CD61 acoplado a PE (compuerta R5), identificadas por el detector BL2-H; **c)** corresponde a células nucleadas, las cuales tienen una alta intensidad de fluorescencia del colorante Hoechst 33342 debido a su gran contenido de ADN (compuerta 6), identificadas por el detector VL1-H.

Finalmente, a partir de compuertas derivadas de las ya establecidas y operaciones que a continuación se explican, se delimitó la población en la cual se evaluaron los MN-RET. Primero se formaron las compuertas NOT R5 para excluir plaquetas y NOT R6 para excluir células nucleadas, posteriormente se juntaron estas compuertas simples [(NOT R5) AND (NOT R6)] para excluir a las dos poblaciones al mismo tiempo. En seguida, se creó otra compuerta derivada en la que se seleccionó a la población celular de R2 (células individuales de menor tamaño) y se descartó a las plaquetas y células nucleadas [((NOT R5) AND (NOT R6)) AND R2]. Esta última compuerta derivada se utilizó en las gráficas de la Fig. 7 para determinar la cantidad de células positivas y negativas a Hoechst 33342 con relación a las células positivas y negativas tanto a NT como a CD71-PE-Cy7. Estas gráficas se delimitaron a través de cuadrantes, para definir la separación entre células positivas y negativas a cada colorante.

En ambas gráficas de la Fig. 7, la delimitación entre células positivas y negativas a Hoechst 33342, se estableció en el valor logarítmico de 10^4 . Mientras que la delimitación entre RET positivos o negativos a NT se estableció en el nivel en que la población positiva formaba una figura circular, al final del cuello formado entre las dos poblaciones, con el fin de evaluar sólo las células con mayor señal positiva a NT. En cambio, la delimitación para las células positivas a CD71-PE-Cy7 fue menos restrictiva, y se trató de abarcar al mayor número de células positivas al anticuerpo CD71 acoplado al fluorocromo PE-Cy7.

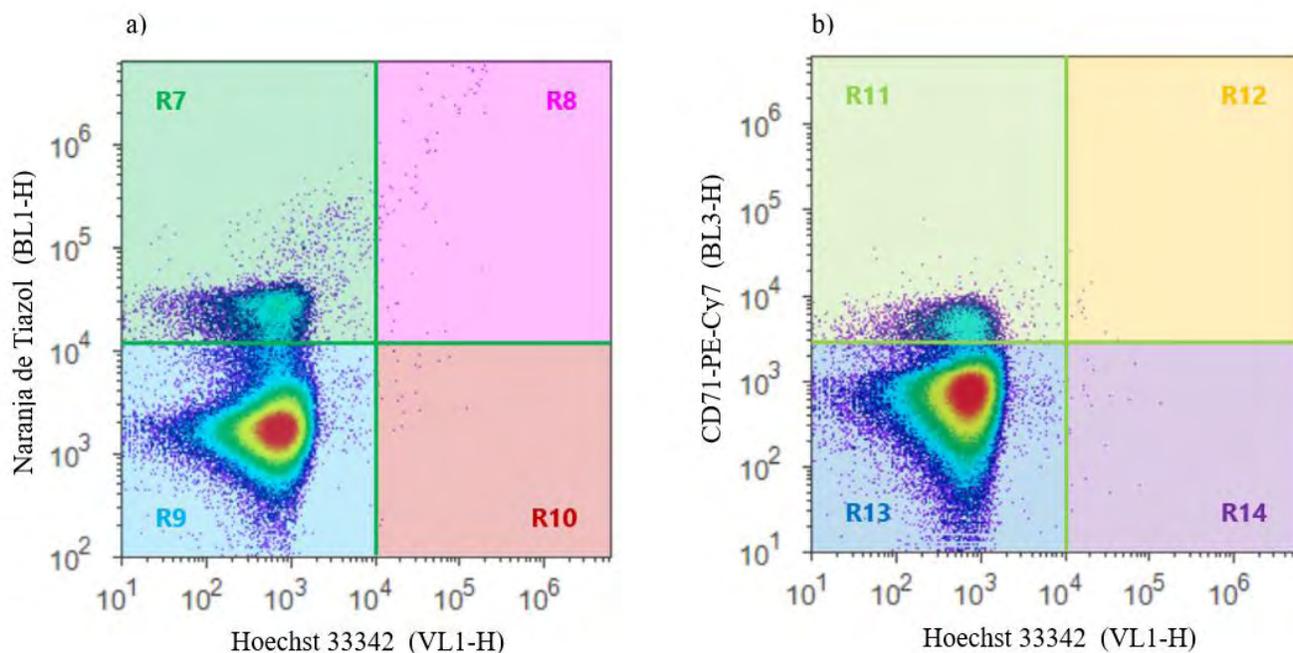


Fig. 7. Determinación de reticulocitos micronucleados

Se representan 2 gráficas de densidad a partir de las cuales se obtuvo el porcentaje de MN-RET. **a)** células positivas a NT pero negativas a Hoechst (reticulocitos -R7), células positivas a NT y Hoechst (reticulocitos micronucleados -R8), células negativas tanto a NT como a Hoechst (eritrocitos maduros -R9), células negativas a NT pero positivas a Hoechst (eritrocitos maduros micronucleados -R10); **b)** células positivas a CD71 pero negativas a Hoechst (reticulocitos recién formados -R11), células positivas a CD71 y Hoechst (reticulocitos micronucleados recién formados -R12), células negativas tanto a CD71 como a Hoechst (eritrocitos maduros y reticulocitos en su etapa final de maduración -R13), y células negativas a CD71 pero positivas a Hoechst (eritrocitos maduros micronucleados o reticulocitos micronucleados en su etapa final de maduración -R14). Se marcan en paréntesis los detectores utilizados para cuantificar cada señal, ambas gráficas se obtuvieron a partir de la subpoblación [(NOT R5) AND (NOT R6)) AND R2].

Con los resultados de la Fig. 7, se determinó la frecuencia de reticulocitos micronucleados (MN-RET) y eritrocitos maduros micronucleados (MN-ERITRO maduros) en promedio por cada grupo de tratamiento de acuerdo con las subpoblaciones reportadas en Montero & col., [2016] (Tabla 5). Se promediaron los datos de cada rata antes de calcular las frecuencias.

Tabla 5. Parámetros determinados por CTF para cada animal.

<i>Frecuencias determinadas en porcentaje</i>	<i>Regiones específicas/ subpoblaciones evaluadas¹</i>
% RET NT+ (reticulocitos positivos al colorante naranja de tiazol)	$[(R7+R8)/(R2 \text{ sin } R5 \text{ y } R6)] \times 100$
% RET CD71+ (reticulocitos positivos al receptor de transferrina)	$[(R11+R12)/(R2 \text{ sin } R5 \text{ y } R6)] \times 100$
% MN-RET NT+ (reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol)	$[R8/(R7+R8)] \times 100$
% MN-RET CD71+ (reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina)	$[R12/(R11+R12)] \times 100$
% MN-ERITRO maduros (eritrocitos maduros micronucleados)	$[R10/(R9+R10)] \times 100$

¹Consideradas a partir de la Fig. 7.

▪ Análisis estadístico

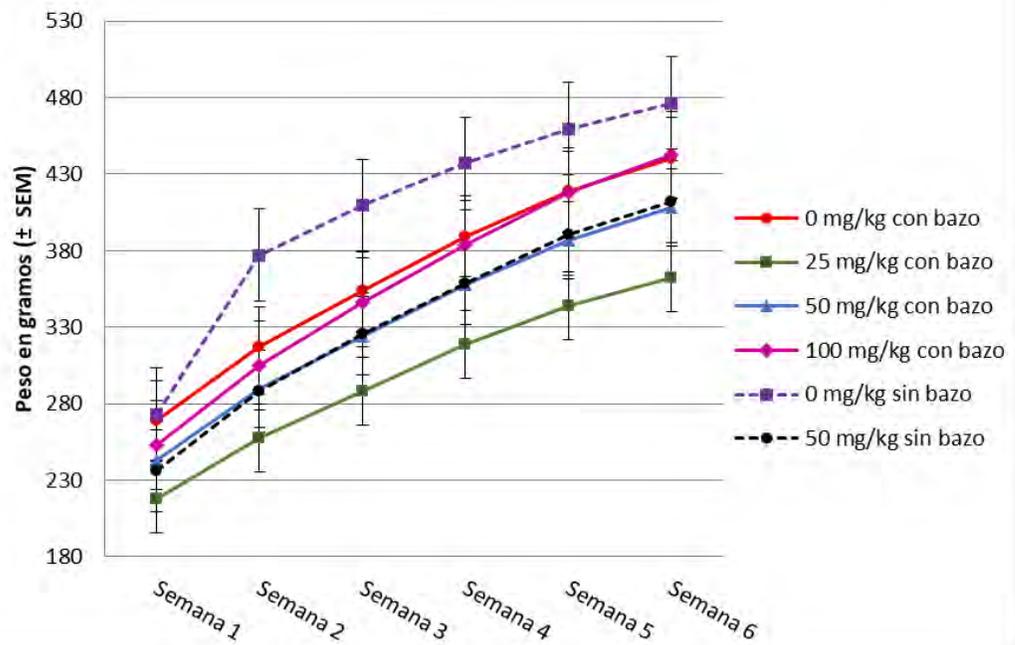
El análisis estadístico y las gráficas se realizaron usando el software Prism 6 (GraphPad). Se efectuaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y U-Mann Whitney) para determinar la existencia de diferencias significativas en los datos evaluados a lo largo del tiempo dentro de cada grupo de tratamiento y entre grupos de tratamientos, contemplando un nivel de significación del ensayo = 0.05 ($\alpha = 0.05$). Adicionalmente, se realizaron análisis de regresión lineal para determinar la relación entre los parámetros evaluados por CTF y la variable tiempo, reportando el coeficiente de determinación R^2 como medida de bondad de ajuste de la recta a la nube de puntos y el valor p como medida del grado de relación entre las variables evaluadas. Se consideraron valores de $p < 0.05$ como indicativo de la existencia de relación entre las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

▪ Peso corporal y estado general de los animales

Ningún animal murió durante el experimento, ni mostró comportamiento fuera de lo normal como hiperactividad, falta de apetito o cansancio excesivo. En cuanto al peso corporal (Fig. 8), los datos no mostraron diferencias significativas entre los grupos a lo largo del tiempo (K-W, $p = 0.1734$). A pesar de que algunos grupos de tratamiento aumentaron de peso considerablemente respecto a otros, su error estándar siempre se traslapó, lo que indicó que el peso de todos los grupos de tratamiento en cada muestreo, no estaba tan disperso uno del otro.

Fig. 8.
Peso promedio por grupo de tratamiento
Se representa a través del tiempo, el peso promedio y error estándar de la media (SEM) de cada grupo de tratamiento administrado con diferentes dosis del compuesto hidroquinona.



Se pudo observar que el tratamiento con hidroquinona no tuvo efecto negativo en el crecimiento normal de cada grupo de ratas administradas con el compuesto genotóxico. De hecho, todas las ratas aumentaron de peso cada semana, incluso aquellas a las que se les extirpó el bazo no mostraron anomalías en cuanto al crecimiento post-tratamiento. En general, no se observaron efectos negativos en el comportamiento y peso corporal de cada grupo de ratas con administración de HQ a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg peso.

▪ **Parámetros determinados por citometría de flujo**

Los parámetros determinados en este estudio por CTF corresponden a las frecuencias (obtenidas a lo largo de 6 semanas) de MN-RET y MN-ERITRO maduros en promedio por cada grupo de tratamiento con bazo (Tabla 6) y esplenectomizado (Tabla 7). Las frecuencias de MN-RET se evaluaron a través de dos marcadores para identificar este tipo celular: **1)** la presencia del receptor de transferrina en su membrana (células positivas al anticuerpo anti-CD71 acoplado al fluorocromo PE-Cy7) y **2)** la presencia de abundante ARN en su citoplasma (células positivas al colorante fluorescente naranja de tiazol). Los parámetros obtenidos permitieron estudiar la cinética de eliminación de los MN-RET, la genotoxicidad a largo plazo ocasionada por el compuesto HQ y la confiabilidad de la metodología utilizada actualmente para evaluar la inducción de MN en eritrocitos jóvenes (RET) de sangre periférica.

▪ **Frecuencia de MN-RET en sangre periférica de ratas con bazo, inducida por diferentes dosis agudas de hidroquinona**

Las frecuencias de MN-RET obtenidas pre-tratamiento y post-tratamiento del compuesto genotóxico hidroquinona, utilizando los dos marcadores para identificar RET: la presencia del receptor de transferrina en su membrana (CD71+) y la presencia de abundante ARN en su citoplasma (NT+), se analizaron en cada grupo de tratamiento con bazo para determinar el tiempo que transcurre entre la aparición y eliminación de MN-RET en circulación sanguínea por dosis agudas de HQ.

Las frecuencias obtenidas de MN-RET CD71+ (Fig. 9a) indicaron una clara disminución a lo largo del tiempo en el grupo control negativo (0 mg/kg peso de HQ) y el grupo tratado con la menor dosis (25 mg/kg peso de HQ), mientras que los grupos tratados con 50 y 100 mg/kg peso del compuesto mantuvieron un valor promedio constante aún 6 semanas después de finalizado el tratamiento. Por otro lado, la frecuencia de MN-RET NT+ (Fig. 9b) presentó con respecto al tiempo una relación positiva en los grupos tratados con 50 ($R^2 = 0.5156$, $p < 0.0001$) y 100 ($R^2 = 0.6333$, $p < 0.0001$) mg/kg peso de HQ, mientras que el grupo control negativo y el grupo tratado con la menor dosis mostraron relación nula o negativa respectivamente, con valores siempre por debajo de las dosis más altas administradas. Lo que indicó que a pesar de la variabilidad obtenida en la frecuencia de MN-RET, el daño al ADN de precursores eritroides en médula ósea por dosis elevadas de HQ, se puede observar en forma de MN en RET de sangre periférica semanas después de la última administración del compuesto.

Tabla 6. Frecuencias promedio de MN-RET y MN-ERITRO maduros en ratas con bazo tratadas con 0, 25, 50 y 100 mg/kg peso de hidroquinona.

Toma de muestra Parámetros evaluados	Pre-tratamiento	Post-tratamiento	1ra semana-post	2da semana-post	3ra semana-post	5ta semana-post
	Día 0	Día 1-3	Día 5-7	Día 12-14	Día 19-21	Día 33-35
0 mg/kg de HQ						
% RET CD71+	1.73±0.29	1.86±0.85	0.76±0.28**	1.46±0.63	0.82±0.06**	0.99±0.24*
% RET NT-	4.73±0.36	4.64±0.37	4.09±0.29*	3.04±0.18**	2.56±0.24**	2.06±0.51**
% MN-RET CD71+	0.29±0.11	0.23±0.10	0.1±0.04*	0.32±0.20	0.12±0.06*	0.02±0.01**
% MN-RET NT-	0.66±0.27	0.65±0.58	0.78±0.27	0.86±0.32	0.29±0.10*	0.86±0.36
% MN-ERITRO maduros	0.01±0.005	0.01±0.01	0.001±0.0003**	0.007±0.0002*	0.001±0.0005**	0.0008±0.0004**
25 mg/kg de HQ						
% RET CD71+	1.07±0.46	1.42±0.52	1.5±0.35	0.89±0.32	1.007±0.33	0.75±0.09
% RET NT-	6.01±0.52	6.05±0.40	4.8±1.02	2.98±0.43*	2.03±0.25*	1.9±0.23*
% MN-RET CD71+	0.48±0.14	0.21±0.08	0.08±0.01*	0.22±0.19	0.02±0.01*	0.05±0.01*
% MN-RET NT-	0.89±0.23	0.38±0.4*	0.2±0.09*	0.17±0.02*	0.09±0.03*	0.21±0.11*
% MN-ERITRO maduros	0.01±0.003	0.009±0.0008	0.001±0.0005*	0.001±0.0005*	0.0006±0.0004*	0.0007±0.0002*
50 mg/kg de HQ						
% RET CD71+	1.52±0.69	1.1±0.57	1.7±0.35	1.12±0.30	0.84±0.32	0.75±0.15
% RET NT-	5.43±0.44	4.39±0.51	4.6±0.67	3.73±0.19**	2.97±0.49**	2.85±0.37**
% MN-RET CD71+	0.43±0.38	0.52±0.32	0.08±0.03**	0.52±0.29	0.25±0.16	0.53±0.16
% MN-RET NT-	0.58±0.04	0.76±0.04**	0.43±0.21	0.96±0.24*	0.92±0.32*	1.29±0.25**
% MN-ERITRO maduros	0.01±0.002	0.02±0.004*	0.001±0.0006**	0.009±0.0004	0.001±0.0002**	0.008±0.001*
100 mg/kg de HQ						
% RET CD71+	1.94±0.56	1.8±1.10	1.13±0.43	0.24±0.07**	0.65±0.12**	0.52±0.22**
% RET NT-	6.07±0.51	5.41±0.37	5.16±0.90	3.23±0.39**	2.85±0.34**	2.27±0.39**
% MN-RET CD71+	0.39±0.19	0.41±0.18	0.09±0.06**	0.51±0.16	0.13±0.05**	0.61±0.37
% MN-RET NT-	0.76±0.22	0.49±0.18	1.17±0.36	3.47±0.58**	1.3±0.16**	4.79±0.91**
% MN-ERITRO maduros	0.01±0.004	0.01±0.004	0.001±0.0007**	0.001±0.0004**	0.001±0.0003**	0.001±0.0004**

Nota. Las frecuencias (presentadas en porcentaje) corresponden al promedio de los datos obtenidos de cada rata. Las diferencias significativas con respecto al control por grupo de tratamiento (Día 0) son señaladas con un asterisco (*) si $p < 0.05$ y con dos asteriscos (**) si $p < 0.01$. Prueba estadística utilizada U de Mann-Whitney. Frecuencias de reticulocitos positivos al receptor de transferrina (RET CD71+), reticulocitos positivos al colorante naranja de tiazol (RET NT+), reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina (MN-RET CD71+), reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol (MN-RET NT+) y eritrocitos maduros micronucleados (MN-ERITRO maduros), obtenidas a partir de Tabla 5.

Tabla 7. Frecuencias promedio de MN-RET y MN-ERITRO maduros en ratas esplectomizadas tratadas con 0 y 50 mg/kg peso de hidroquinona.

Toma de muestra Parámetros evaluados	Pre-tratamiento		Post-tratamiento		1ra semana- post		2da semana- post		3ra semana- post		5ta semana- post	
	Día 0		Día 1-3		Día 5-7		Día 12-14		Día 19-21		Día 33-35	
0 mg/kg de HQ												
% RET CD71+	2.39±0.48	2.27±0.49	0.81±0.27	1.4±0.17	0.76±0.15	0.86±0.34						
% RET NT+	4.12±0.65	4.4±1.51	3.03±0.84	2.59±0.41	2.92±0.47	1.74±0.18						
% MN-RET CD71+	0.23±0.10	0.28±0.05	0.14±0.09	0.02±0.008	0.13±0.07	0.02±0.01						
% MN-RET NT+	1.2±0.71	1.44±0.05	1.67±0.50	0.73±0.13	1.64±0.93	1.19±0.44						
% MN-ERITRO maduros	0.01±0.004	0.01±0.003	0.001±0.0004	0.0009±0.0003	0.001±0.0002	0.001±0.0001						
50 mg/kg de HQ												
% RET CD71+	1.29±0.63	1.92±0.16	1.16±0.69	1.44±0.40	0.71±0.14	0.63±0.15						
% RET NT+	5.42±0.55	6.97±0.39*	6.08±0.65	3.18±0.26*	3.08±0.18*	2.48±0.13*						
% MN-RET CD71+	0.63±0.33	0.39±0.05	0.16±0.09*	0.17±0.06*	0.16±0.02*	0.45±0.02						
% MN-RET NT+	1.76±0.37	1.35±0.08*	1.86±0.12	2.4±0.20	2.15±0.80	2.78±0.33*						
% MN-ERITRO maduros	0.02±0.002	0.02±0.003	0.001±0.0003*	0.01±0.004	0.001±0.0005*	0.01±0.002						

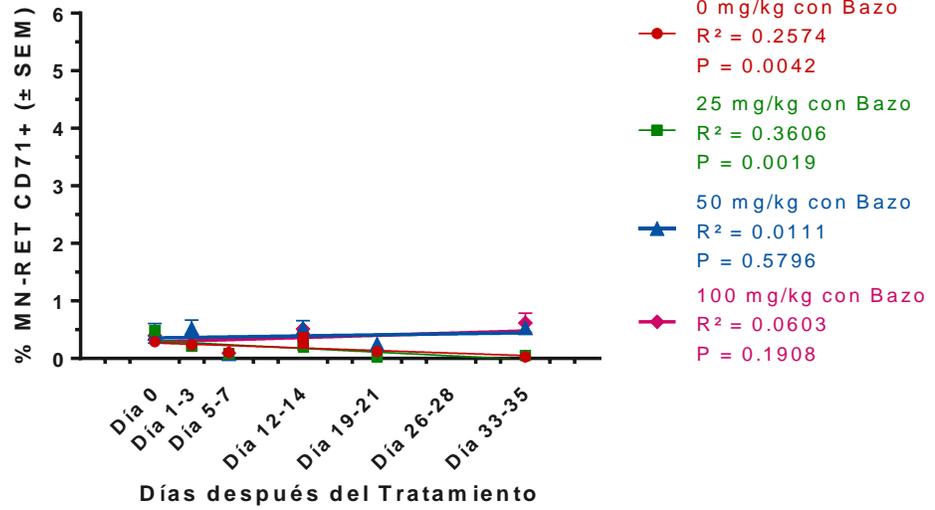
Nota. Las frecuencias (presentadas en porcentaje) corresponden al promedio de los datos obtenidos de cada rata. Las diferencias significativas con respecto al control por grupo de tratamiento (Día 0) son señaladas con un asterisco (*) si $p < 0.05$ y con dos asteriscos (***) si $p < 0.01$. Prueba estadística utilizada U de Mann-Whitney. Frecuencias de reticulocitos positivos al receptor de transferrina (RET CD71+), reticulocitos positivos al colorante naranja de tiazol (RET NT+), reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina (MN-RET CD71+), reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol (MN-RET NT+) y eritrocitos maduros micronucleados (MN-ERITRO maduros), obtenidas a partir de Tabla 5.

Fig. 9.
Frecuencia de MN-RET en
sangre periférica de ratas
con bazo administradas
con dosis agudas de HQ

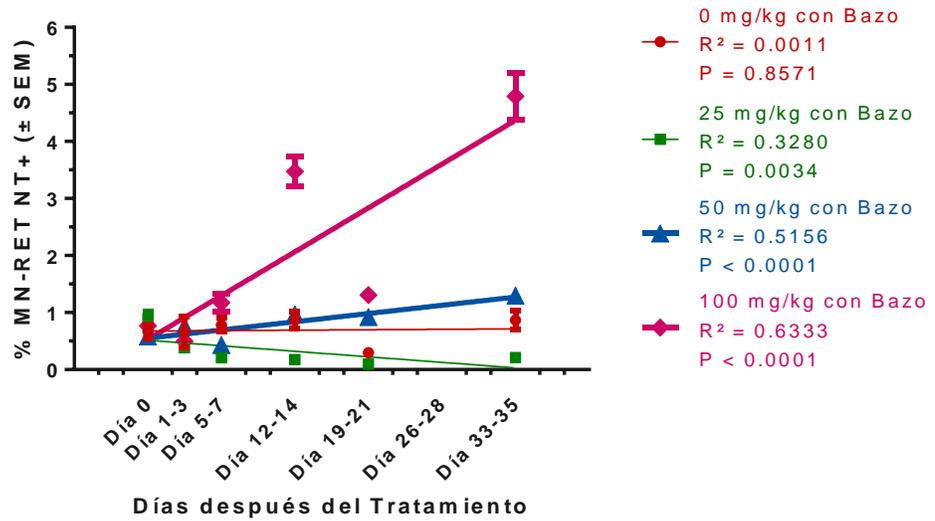
Frecuencias de: a) reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina (MN-RET CD71+), b) reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol (MN-RET NT+), y c) eritrocitos maduros micronucleados (MN-ERITRO maduros) en sangre periférica después de la administración aguda de diferentes dosis (0, 25, 50 y 100 mg/kg peso) del compuesto genotóxico hidroquinona. Los valores representados son las medias \pm el error estándar (SEM) de 5 ratas con bazo por grupo de tratamiento.

Las frecuencias se evaluaron a lo largo de 6 semanas, por lo que para observar la relación entre el tiempo y la frecuencia de estas células micronucleadas se utilizó el método de regresión lineal, en donde el coeficiente de determinación R^2 indicó la bondad de ajuste de la recta y los valores $p < 0.05$ la existencia de relación entre las variables evaluadas. Día 0 representa la toma de muestra pre-tratamiento.

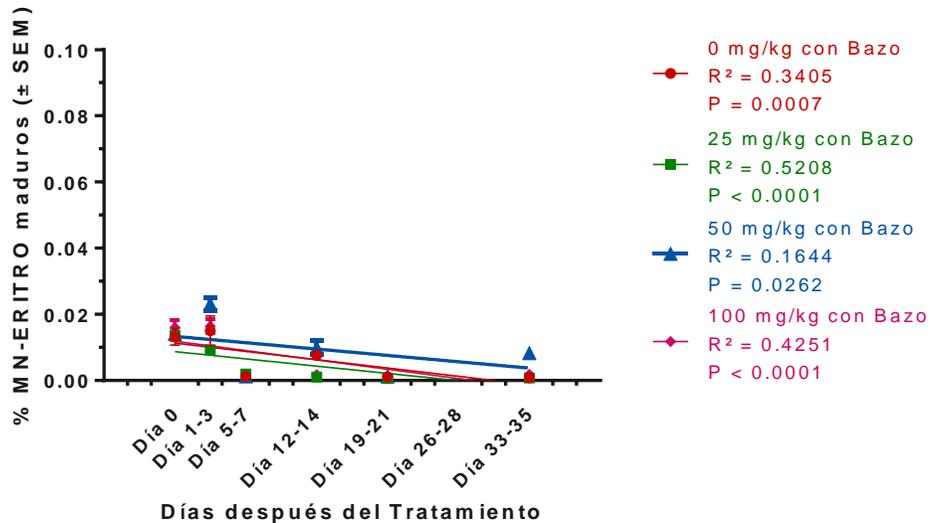
a)



b)



c)



Para verificar que efectivamente las disminuciones observadas en las frecuencias de MN-RET eran debidas a eliminación de estas células dañadas del torrente sanguíneo y no por ser excluidas al haber concluido su etapa de maduración, se analizó la frecuencia de MN-ERITRO maduros y su relación con el tiempo post-tratamiento del compuesto genotóxico (Fig. 9c), los resultados obtenidos mostraron una clara disminución de la frecuencia de MN-ERITRO maduros en todos los grupos de tratamiento con bazo, exponiendo valores ligeramente por arriba del control negativo (0 mg/kg peso) solo el grupo tratado con 50 mg/kg peso de HQ, único grupo que además mostró un aumento significativo (U de Mann-Whitney $p=0.0159$) con respecto a su control interno (pre-tratamiento día 0) 24 h después de la última administración del compuesto. Lo que indicó que aunque los MN-RET que entran a circulación sanguínea están siendo eliminados, cuando el daño va en aumento, un porcentaje muy pequeño de ellos puede mantenerse en circulación aún después de la madurez.

Los resultados obtenidos de las frecuencias de MN-RET y MN-ERITRO maduros a lo largo de 6 semanas después de un tratamiento agudo con 50 y 100 mg/kg peso de HQ, demostraron que el daño genotóxico causado por el compuesto a precursores eritroides de médula ósea puede tardar en expresarse, por ello a pesar de que existe una constante eliminación de células micronucleadas, la evaluación de la frecuencia de MN-RET en tiempos posteriores al estándar de 24-48 h post-tratamiento puede dar un panorama más general del daño causado. En este estudio por ejemplo, se observaron dos periodos post-tratamiento en los cuales después de una eliminación constante de células micronucleadas (día 5-7 y día 19-21), éstas aumentaron considerablemente su porcentaje (día 12-14 y día 33-35) respecto al muestreo previo, dichos periodos se observaron en las dosis más altas de HQ administrada, tanto en MN-RET como en MN-ERITRO maduros, ya que mientras las frecuencias de células micronucleadas en estos grupos (50 y 100 mg/kg peso) aumentaban considerablemente, en el grupo control negativo y el grupo administrado con la menor dosis disminuían o mantenían un valor promedio constante.

Dado que la HQ además de inducir daño al ADN también induce muerte celular de progenitores hematopoyéticos [Gokden & Lazzarotto, 2012], lo que puede reflejarse en la disminución del porcentaje de RET en circulación sanguínea y esto impactar en la frecuencia de MN-RET, debido a que las células pueden estar muriendo antes de expresar el daño al material genético en forma de MN. Entonces se decidió evaluar las frecuencias de RET CD71+ (Fig. 10a) y RET NT+ (Fig. 10b) en sangre periférica de cada grupo de tratamiento con bazo durante todo el estudio, para con ello determinar la citotoxicidad que ejerció el compuesto administrado sobre la médula ósea y el impacto que tuvo en la frecuencia de MN-RET.

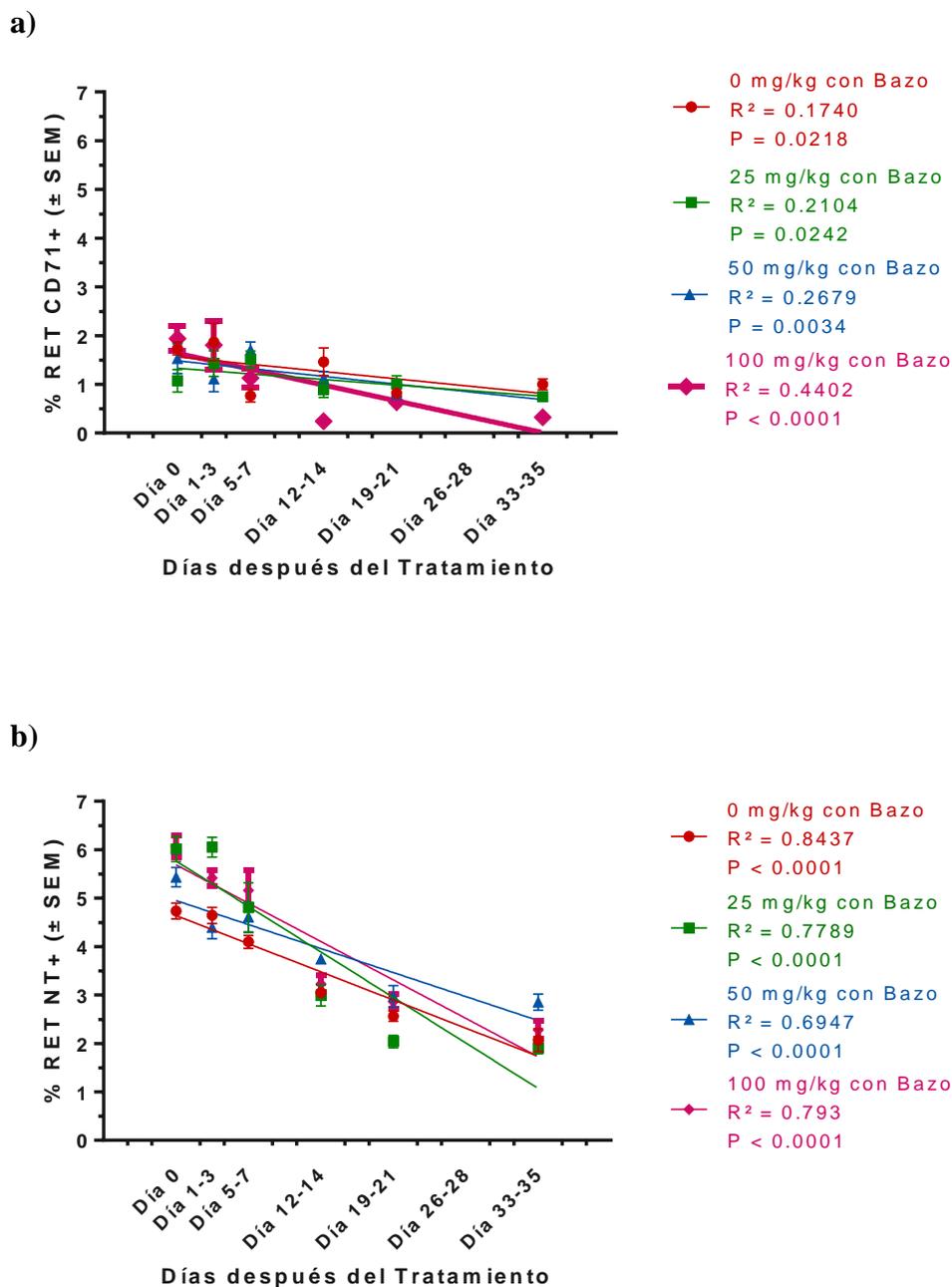
Los resultados obtenidos indicaron una relación negativa entre el tiempo post-tratamiento del compuesto y la frecuencia de RET (evaluada a través de los dos marcadores) en todos los grupos de tratamiento. Sin embargo, el grupo tratado con 100 mg/kg peso de HQ presentó en la frecuencia de RET CD71+ una pendiente más inclinada ($Y = -0.3259X + 1.964$) en comparación con el resto de los grupos evaluados con el mismo marcador (50 mg/kg: $Y = -0.1593X + 1.642$; 25 mg/kg: $Y = -0.1150X + 1.446$; 0 mg/kg: $Y = -0.1504X + 1.714$), los cuales mantuvieron una tendencia muy similar (atribuida principalmente a la extracción continua de sangre), lo que indicó que a mayor dosis de HQ administrada, ésta interfiere con la eritropoyesis y específicamente con la expresión del receptor de transferrina, ya que al evaluar la frecuencia de RET a través de su contenido de ARN en citoplasma (RET NT+), no se presentó el mismo patrón.

Finalmente, la disminución del porcentaje de RET en sangre periférica *se puede atribuir a tres efectos*: 1) el sangrado semanal realizado para la adquisición de muestra, el cual no permitió que se recuperaran los niveles de RET en sangre; 2) el efecto citotóxico conocido que ejerce el compuesto HQ sobre la médula ósea (muerte celular de progenitores hematopoyéticos) y 3) un efecto citostático causado por la HQ, el cual inhibió la proliferación de progenitores eritroides y evitó que el daño causado al material genético observado semanas después en forma de MN, se expresara inmediatamente.

Fig. 10.
Frecuencia de RET en sangre periférica de ratas con bazo, tratadas con diferentes dosis agudas de hidroquinona

Frecuencias de: **a)** reticulocitos positivos al receptor de transferrina (RET CD71+), y **b)** reticulocitos positivos al colorante naranja de tiazol (RET NT+) en sangre periférica, obtenidas de los grupos con bazo administrados de forma aguda con 0, 25, 50 y 100 mg/kg peso de HQ. Los valores representados son las medias \pm el error estándar (SEM) de 5 ratas por grupo de tratamiento.

Las frecuencias se evaluaron a lo largo de 6 semanas, por lo que para observar la relación entre el tiempo y la frecuencia de RET se utilizó el método de regresión lineal, en donde el coeficiente de determinación R^2 indicó la bondad de ajuste de la recta y los valores $p < 0.05$ la existencia de relación entre las variables evaluadas. Día 0 representa la toma de muestra pre-tratamiento.



▪ **Efecto del bazo en la frecuencia de MN-RET obtenida con administración aguda de 50 mg/kg peso de hidroquinona en ratas esplenectomizadas**

El bazo es considerado el principal órgano encargado de la eliminación de MN-RET que entran a circulación sanguínea, por lo tanto en este estudio, como parte de la cinética de eliminación de los MN-RET, se evaluó el efecto de la función del bazo como filtrador de células micronucleadas y su eficiencia al comparar a lo largo del tiempo las frecuencias de: MN-RET CD71+, MN-RET NT+ y MN-ERITRO maduros de dos grupos de ratas esplenectomizadas (a las que se les extirpo el bazo) tratadas con 0 y 50 mg/kg peso de HQ, con sus contrapartes no esplenectomizadas (las cuales contaban con bazo) tratadas con las mismas dosis.

Los resultados obtenidos indicaron desde la toma de muestra pre-tratamiento (día 0) que las ratas esplenectomizadas presentaban un mayor porcentaje de células micronucleadas (atribuido a la intervención quirúrgica realizada) que su contraparte no esplenectomizada, a pesar de esto, el efecto del compuesto HQ sobre la médula ósea y la función de filtración del bazo fueron claramente observados a través del marcador naranja de tiazol (Fig. 11b), ya que los grupos esplenectomizados mantuvieron valores siempre por arriba de su contraparte, lo que se esperaba dado que al extraer el bazo los MN-RET que entran a circulación sanguínea no son eliminados por este órgano. No obstante, debido a que el tiempo que tardan en madurar los RET en sangre es de aproximadamente 2 días [Hughes-Jones & Wickramasinghe, 1996], la relación positiva entre el tiempo post-tratamiento del compuesto y la frecuencia de MN-RET NT+ ($R^2 = 0.4892$, $p < 0.0001$) observada en el grupo esplenectomizado administrado con 50 mg/kg peso de HQ, no se debe únicamente a una acumulación de MN-RET no eliminados del torrente sanguíneo (ya que el estudio duró 6 semanas) sino también, a un daño causado en la médula ósea que no se expresó inmediatamente.

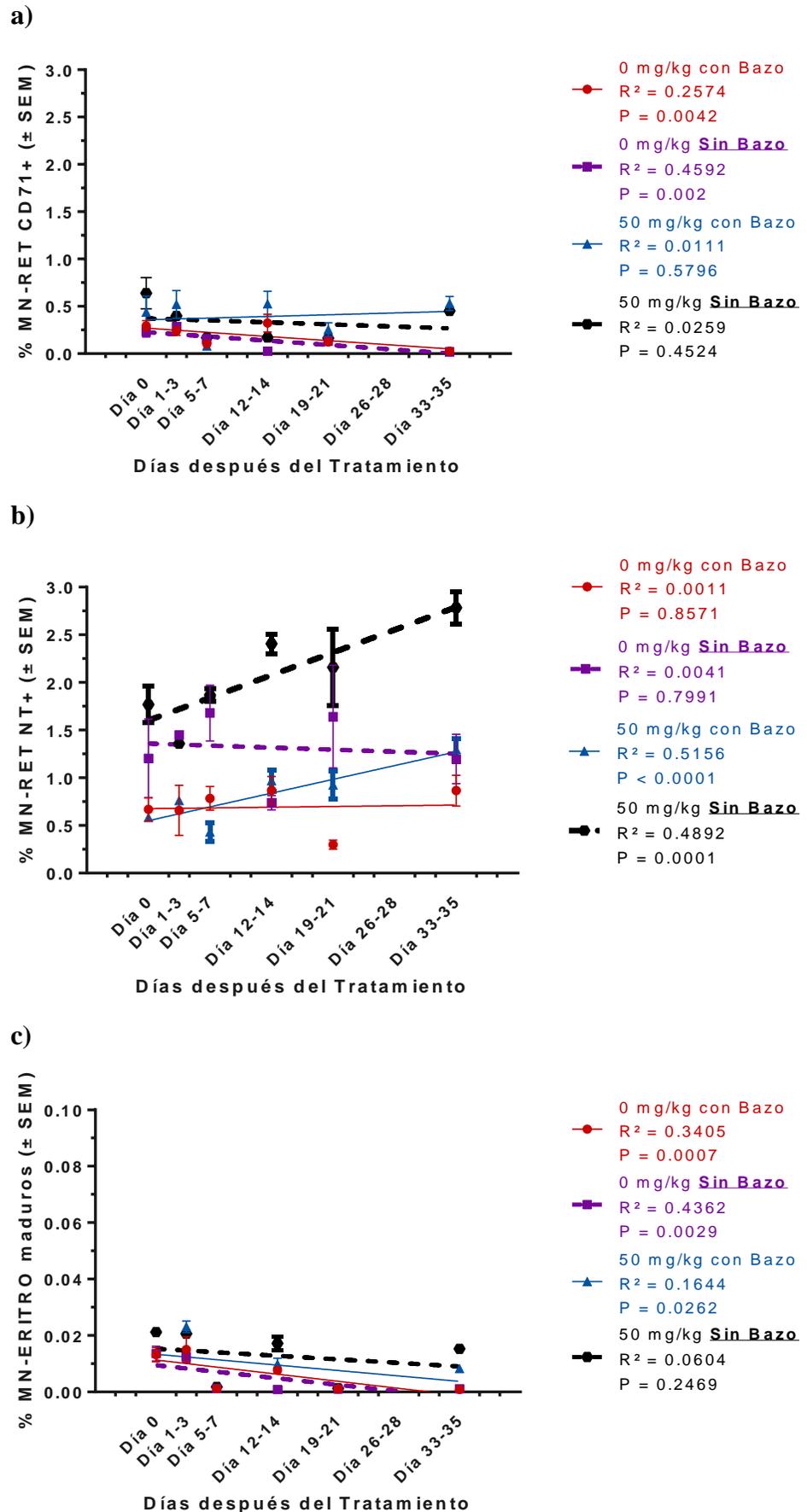
Por otro lado, al evaluar la frecuencia de MN-RET a través del receptor de transferrina en su membrana (Fig. 11a), no se observó en el grupo esplenectomizado tratado con 50 mg/kg peso de HQ el efecto del compuesto genotóxico, este grupo al igual que su contraparte con bazo presentaron fluctuaciones a lo largo de todo el estudio, sin embargo, sus frecuencias nunca excedieron a la obtenida en la toma de muestra pre-tratamiento, contrario a lo observado con el marcador NT. Además, los grupos control negativo con bazo y esplenectomizado, evaluados a través del receptor de transferrina, presentaron una relación negativa entre el tiempo post-tratamiento del compuesto y la frecuencia de MN-RET CD71+ ($R^2 = 0.2574$, $p = 0.0042$ y $R^2 = 0.4592$, $p = 0.0020$, respectivamente), aún sin la función de filtración del bazo por parte del grupo esplenectomizado.

Por lo tanto, para analizar si en los grupos esplenectomizados los descensos observados en las frecuencias de MN-RET se debían a que los RET maduraban y no por la eliminación de estas células a través de otros mecanismos diferentes al bazo, se evaluó la frecuencia de MN-ERITRO maduros (Fig. 11c). Los resultados no mostraron relación significativa entre el tiempo post-tratamiento del compuesto y la frecuencia de MN-ERITRO maduros en el grupo esplenectomizado tratado con 50 mg/kg peso de HQ, contrario a lo obtenido en el grupo con bazo tratado con la misma dosis, el cual presentó una relación negativa estadísticamente significativa al igual que los grupos control negativo con bazo y esplenectomizado. Esto indicó que los MN-RET de ratas esplenectomizadas prevalecen un mayor tiempo en circulación, incluso después de madurar, lo que denota la importancia del bazo en la eliminación de este tipo de células dañadas.

Fig. 11.
El efecto del bazo en la frecuencia de eritrocitos micronucleados

El efecto que ejerce el bazo en la frecuencia de reticulocitos micronucleados en circulación sanguínea, inducidos por la administración aguda de 0 y 50 mg/kg peso del compuesto hidroquinona, se determinó al comparar en los grupos con bazo y esplenectomizados (sin bazo), tratados con las mismas dosis, la relación entre el tiempo post-tratamiento del compuesto y la frecuencia (medida en porcentaje) de: **a)** reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina (MN-RET CD71+), **b)** reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol (MN-RET NT+), y **c)** eritrocitos maduros micronucleados (MN-ERITRO maduros).

Los valores representados son las medias \pm el error estándar (SEM) de 3-5 ratas por grupo de tratamiento. La relación entre las dos variables por grupo de tratamiento es representada a través de la recta obtenida por el método de regresión lineal, donde el coeficiente de determinación R^2 indica la bondad de ajuste de la recta y los valores $p < 0.05$ la existencia de relación entre las variables evaluadas. Día 0 representa la toma de muestra pre-tratamiento.



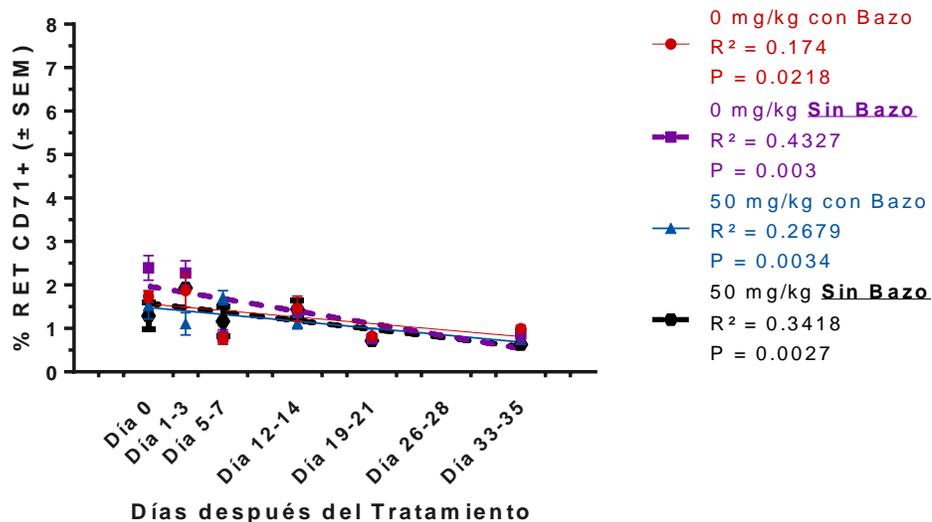
Sin embargo, al haberse observado descensos significativos a lo largo del tiempo en la frecuencia de MN-ERITRO maduros en ratas esplenectomizadas (Tabla 7), es importante considerar que, aunque el bazo sea el principal órgano encargado de la eliminación de MN-ERITRO (maduros e inmaduros), existen otros mecanismos como la fagocitosis que realizan los macrófagos en circulación sanguínea [Ham, A. W., 1984; Harvey, J. W., 2012] o en el hígado [Theurl & col., 2016], que también pueden contribuir a la eliminación de este tipo de células dañadas. Incluso otras explicaciones de los descensos observados pueden relacionarse con un error de muestreo debido al escaso porcentaje de MN-ERITRO maduros en sangre periférica (<0.05 según lo obtenido aquí y lo reportado por Montero & col. en 2016 en ratas no tratadas) o al bajo número de animales utilizados en los grupos esplenectomizados.

Fig. 12.
Frecuencia de RET en ratas esplenectomizadas tratadas con HQ

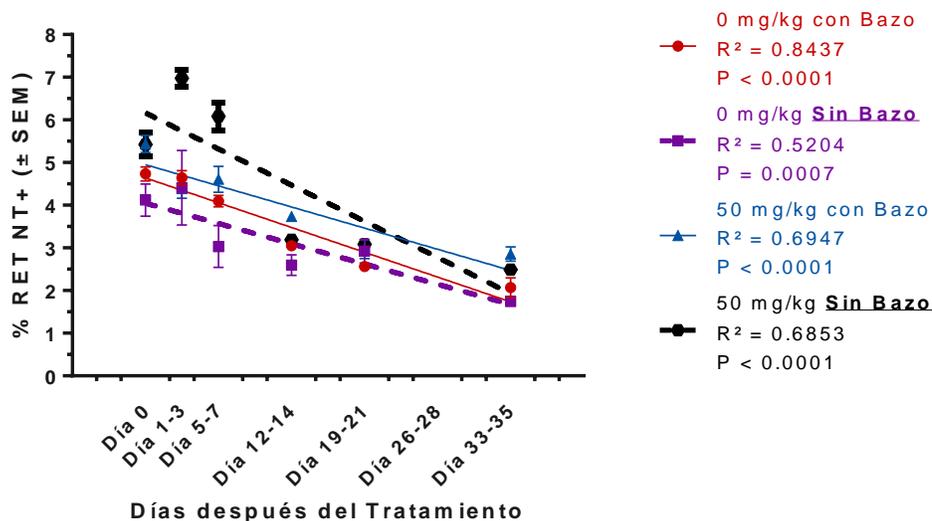
Frecuencias de: **a)** reticulocitos positivos al receptor de transferrina (RET CD71+), y **b)** reticulocitos positivos al colorante naranja de tiazol (RET NT+), de ratas con bazo y esplenectomizadas (sin bazo) tratadas con 0 y 50 mg/kg peso de HQ. Los valores representados son las medias \pm el error estándar (SEM) de 3-5 ratas por grupo de tratamiento.

Las frecuencias se evaluaron a lo largo de 6 semanas, por lo que para observar la relación entre el tiempo y la frecuencia de RET se utilizó el método de regresión lineal, en donde el coeficiente de determinación R^2 indicó la bondad de ajuste de la recta y los valores $p < 0.05$ la existencia de relación entre las variables evaluadas. Día 0 representa la toma de muestra pre-tratamiento.

a)



b)



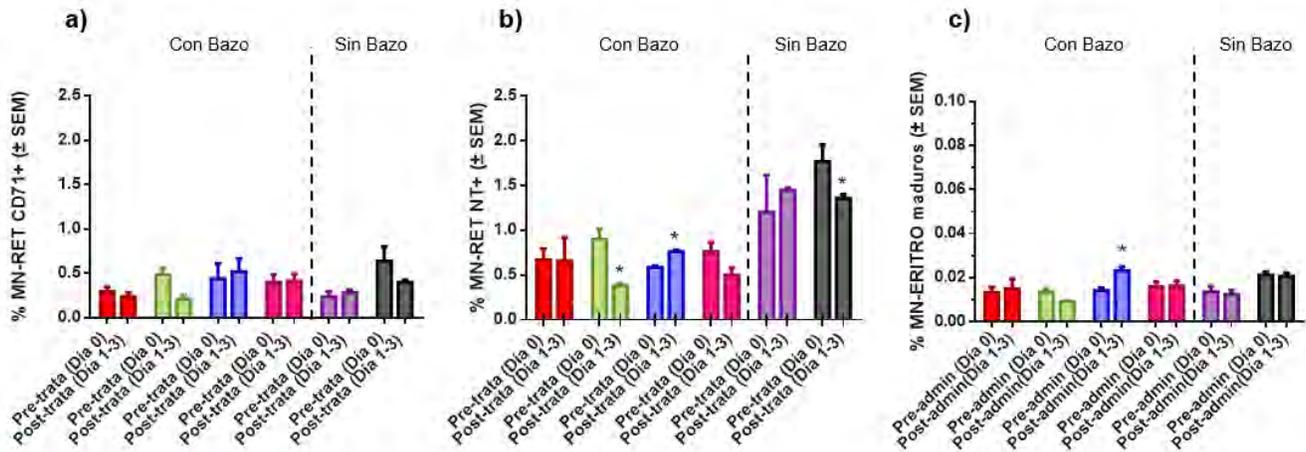
Por otra parte, para estudiar si el resultado negativo en el aumento de la frecuencia de MN-RET CD71+ en el grupo de ratas esplenectomizadas administradas de forma aguda con 50 mg/kg peso de HQ, se debía a citotoxicidad causada por el compuesto en médula ósea, se evaluó la frecuencia de RET CD71+ (Fig. 12a) en sangre periférica a lo largo del tiempo post-tratamiento. Sin embargo, los resultados indicaron una relación negativa ($R^2 = 3418$, $p=0.0027$) similar a la obtenida en el grupo control negativo esplenectomizado, lo que indicó que, si bien la HQ pudo ejercer algún efecto citotóxico, otro factor como el sangrado continuo para la obtención de muestra, provocó una disminución constante en la frecuencia de RET en sangre periférica, ya que los RET NT+ también presentaron relaciones negativas en los dos grupos esplenectomizados (Fig. 12b).

▪ **Cinética de inducción de MN-RET y eliminación a través del bazo**

Desde los años 90 se han realizado estudios para incorporar el ensayo de micronúcleos *in vivo* en mamíferos a los ensayos de toxicología general, ya que esta prueba permite evaluar el peligro mutagénico de los compuestos al considerar factores del metabolismo *in vivo*, la farmacocinética y los procesos de reparación del ADN [FDA, 2000]. Sin embargo, el efecto de la función del bazo como filtrador de células micronucleadas en modelos animales de importancia toxicológica como la rata, llevó a que este ensayo en sangre periférica se realizara en tipos celulares específicos y en tiempos determinados después del último tratamiento con el compuesto a evaluar.

La fuerte selección reportada que ejerce el bazo en células micronucleadas [MacGregor & col., 1980; MacGregor & col., 1983; Schlegel & MacGregor, 1984; Hayashi & col., 1990; Hayashi & col., 1992; MacGregor & col., 1992; Krishna & Theiss, 1995; Dertinger & col., 1996; Hayashi & col., 2000; Torous & col., 2001], provocó que la inducción de micronúcleos sólo sea evaluada durante las primeras 24 a 48 h después de un tratamiento agudo, a pesar de que el análisis de células micronucleadas en muestras de sangre periférica obtenidas en diversos momentos post-tratamiento, proporciona importante información complementaria sobre el curso temporal de la inducción. Lo que se corroboró en este estudio con el compuesto hidroquinona, pues a pesar de la fuerte selección que ejerció el bazo, muestreos posteriores a las 24 h post-tratamiento presentaron frecuencias superiores a la obtenida en el primer muestreo post-tratamiento, incluso algunos de los grupos tratados no mostraron un aumento significativo al comparar su nivel basal de MN y la frecuencia obtenida 24 h después de la última administración del compuesto (Fig. 13), a pesar de que se ha demostrado que la hidroquinona, a dosis altas similares a las que se aplicaron en este estudio, induce un gran porcentaje de células micronucleadas 24 h después de finalizado el tratamiento [Whysner & col., 1995; McGregor, D., 2007; Montero & col., 2016].

Los resultados negativos obtenidos en este estudio con el compuesto HQ en la inducción de MN en el tiempo estándar establecido de muestreo (24-48 h post-tratamiento), denotan la variabilidad que se ha reportado en pruebas de genotoxicidad con HQ (Anexo B). Sin embargo, resultados positivos obtenidos semanas después de finalizado el tratamiento, nos llevan a proponer que la inducción de MN en RET de sangre periférica por dosis agudas de cualquier compuesto, no se debe limitar a evaluarse únicamente 24-48 h después de la última administración, ya que información importante de la toxicidad del compuesto puede obtenerse en muestreos posteriores al tiempo estándar actualmente establecido.



- 0 mg/kg con Bazo
- 25 mg/kg con Bazo
- 50 mg/kg con Bazo
- 100 mg/kg con Bazo
- 0 mg/kg Sin Bazo
- 50 mg/kg Sin Bazo

Fig. 13. Frecuencia de MN-ERITRO post-tratamiento

Frecuencias de: a) reticulocitos micronucleados positivos al receptor de transferrina (MN-RET CD71+), b) reticulocitos micronucleados positivos al colorante naranja de tiazol (MN-RET NT+), y c) eritrocitos maduros micronucleados (MN-ERITRO maduros), obtenidas pre y post-tratamiento de diferentes dosis (0, 25, 50 y 100 mg/kg) del compuesto hidroquinona en ratas con bazo y ratas esplenectomizadas (sin bazo). Las diferencias significativas con respecto al control por grupo de tratamiento (Pre-trata, día 0) son señaladas con un asterisco (*) si $p < 0.05$. Prueba estadística utilizada U de Mann-Whitney.

En cuanto a la eliminación de MN-RET, en este estudio se observaron patrones de eliminación similares a los reportados por Hamada & col. [2001] y por MacGregor & col. [2006] con algunos compuestos administrados de forma aguda y en un tratamiento de 28 días consecutivos. MacGregor & col. al igual que nosotros, observaron un descenso significativo en la frecuencia de reticulocitos micronucleados en circulación sanguínea transcurridas 48-72 h después de la última administración de los compuestos evaluados, mientras que Hamada & col. a pesar de haber realizado administraciones continuas, observaron descensos y ascensos variables en la frecuencia de MN-RET en algunas dosis administradas de 1-β-D-Arabinofuranosilcitosina y Metilmetanosulfonato que coincidieron con los patrones obtenidos en este estudio, descenso de la frecuencia de MN-RET entre los días 4-7, ascenso de la frecuencia entre los días 12-14 y de nuevo descenso de la frecuencia hacia los días 19-21. Aunque Hamada & col. hicieron una administración continua de los compuestos, sus resultados nos indicaron que a pesar de la filtración de MN-RET que realiza el bazo, la HQ administrada de forma aguda en dosis elevadas puede tener un efecto genotóxico a largo plazo, similar a lo observado con otros compuestos en una administración continua.

Si bien, lo anterior no aclara cuanto tiempo tardan en eliminarse los MN-RET de circulación sanguínea, los resultados obtenidos en este estudio a través del marcador NT en ratas con bazo y ratas esplenectomizadas, indicaron que *existe una eliminación constante por parte del bazo de MN-RET*, lo cual mantuvo las frecuencias de estas células micronucleadas en los grupos con bazo, siempre por debajo de las frecuencias obtenidas en los grupos esplenectomizados administrados con las mismas dosis, por lo que se infiere que las frecuencias de MN-RET observadas semanas después de finalizado el tratamiento en los grupos con bazo administrados con elevadas dosis de HQ, se relacionan con el daño aleatorio causado a los precursores eritroides de médula ósea y su desigual diferenciación, más que a momentos específicos de eliminación de células micronucleadas.

De hecho, Motulsky & col. [1956] al estudiar la cinética de hematíes marcados con ^{51}Cr en ratas, observaron que la incorporación de los hematíes al hígado y bazo se completa en 2 a 4 minutos, por lo que la filtración de MN-RET a través del bazo se realiza en muy poco tiempo después de salir a circulación sanguínea, lo importante es que a pesar de esa filtración, el aumento en la frecuencia de MN-RET en sangre periférica inducidos por algún agente tóxico, indica un daño mayor al que es capaz de eliminar normalmente el bazo. Por lo tanto, el tiempo estándar establecido para la evaluación del ensayo de micronúcleos en sangre periférica, más que depender del periodo observado que tarda el bazo en eliminar a los MN-RET después de un tratamiento agudo, debe de considerar que al evaluar la inducción de MN en un solo tiempo de muestreo, se está dando por hecho que el compuesto evaluado solo genera una oleada de inducción de MN, es decir, solo incide en precursores eritroides inmediatos y no en células progenitoras.

Cabe mencionar que MacGregor & col. [2006] reportaron que contrario a su expectativa original y a lo que se había publicado anteriormente, el ensayo de micronúcleos en sangre periférica por CTF evaluado en la porción de RET CD71+, no reduce significativamente el efecto de la selección esplénica frente a los MN-RET evaluados por su contenido de ARN en citoplasma (NT+), aquellos que podrían llevar un poco más de tiempo en circulación sanguínea, lo que quiere decir que los MN-RET ya sea CD71+ o NT+ experimentan de manera similar filtración continua a través del bazo, por lo que delimitar el tiempo de muestreo y el tipo celular evaluado evitan obtener información complementaria sobre el curso temporal de la inducción y la toxicidad a largo plazo que el compuesto puede causar. Sin embargo, es importante considerar un punto relevante obtenido en este estudio con el grupo esplenectomizado administrado con 50 mg/kg peso de HQ, ya que en este grupo se esperaba que el porcentaje de MN-RET al no ser eliminado por el bazo, representara un aumento en la frecuencia de MN-ERITRO maduros, sin embargo esto no sucedió, las razones exactas se desconocen pero se infiere que otros mecanismos fisiológicos diferentes al bazo pueden estar actuando en su eliminación, no obstante, se deben realizar más estudios para confirmarlo.

▪ **Uso de CD71 o ARN para identificar RET en el ensayo de micronúcleos *in vivo***

El ensayo de micronúcleos *in vivo* es realizado principalmente para evaluar la capacidad que tienen diversos agentes químicos y físicos de inducir daño genotóxico, el cual es asociado con la incidencia o progresión de tumores y con efectos adversos para la reproducción y el desarrollo. En la mayoría de las situaciones en las que se realiza este ensayo, el agente a evaluar se administra de forma aguda a ratas o ratones, y se determina la frecuencia de MN-PCE en médula ósea o MN-RET en sangre periférica dentro de las primeras 24 a 48 h después del último tratamiento [Krishna & Hayashi, 2000].

Cuando la evaluación de MN se realiza en sangre periférica, se ha estandarizado que la porción de células a evaluar sean los reticulocitos que contienen al receptor de transferrina (RET CD71+), es decir, aquellos eritrocitos inmaduros recién ingresados a la circulación que por el corto tiempo de vida del receptor de transferrina en sangre (11 h aprox. en ratas) se asegura que no han experimentado la función de filtración del bazo o ésta ha sido mínima. Sin embargo, la evaluación de MN en RET CD71+ de sangre periférica implica que de todos los MN-RET (inducidos por cualquier agente) que pudieran estar en circulación sanguínea, solo el porcentaje de ellos que cuenta con el receptor de transferrina es considerado en el ensayo de micronúcleos, descartando a una gran proporción de MN-RET que no han sido eliminados por el bazo. Lo que pudo corroborarse en este estudio, ya que los resultados obtenidos al

evaluar la inducción de MN en reticulocitos considerados por su abundante contenido de ARN (RET NT+) fueron más consistentes y presentaron un incremento considerable en comparación con los resultados obtenidos al evaluar la inducción de MN sólo en la porción de RET CD71+.

Si bien los resultados obtenidos con los MN-RET NT+, aquellos que conservan sus ribosomas de 24 a 48 h en circulación antes de convertirse en MN-ERITRO maduros [Hughes-Jones & Wickramasinghe, 1996] o ser eliminados en algún momento por el bazo, presentaron resultados más consistentes (Fig. 9b, 11b), los resultados obtenidos con los RET CD71+ permitieron observar que el compuesto administrado en este estudio, ejerció un efecto negativo en la expresión del receptor de transferrina (Fig. 10a), lo cual ya había sido reportado por Wu & col. [2011] en células progenitoras eritroides. Por lo tanto, se considera que evaluar la inducción de MN a través de los dos marcadores utilizados en este estudio para identificar RET, permite evidenciar el daño genotóxico y citotóxico que provocan los compuestos en médula ósea.

▪ **Efectos toxicológicos del compuesto hidroquinona**

En este estudio, utilizar HQ para inducir la formación de MN en células de médula ósea, no solo permitió abordar la cinética de eliminación de los MN-RET, sino también, evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad a largo plazo que ocasiona la exposición aguda a este compuesto. Sin embargo, la variabilidad observada en la inducción de células micronucleadas en todas las dosis administradas de HQ en el tiempo estándar establecido de muestreo (Fig. 13), nos llevó a pensar en un principio que el compuesto había sido mal administrado, ya que en estudios previos realizados en este mismo laboratorio [Montero & col., 2016], se reportaron aumentos marcadamente significativos en la frecuencia de MN-RET (tanto CD71+ como NT+) a las 24 h post-tratamiento, utilizando la misma metodología y dosificación similar a la reportada aquí. La no concordancia de resultados cuando el análisis se llevó a cabo en el mismo laboratorio, refleja la variabilidad de respuestas reportadas en el ensayo de MN *in vivo* por administración vía oral (Anexo B).

No obstante, muestreos posteriores a las 24 h post-tratamiento indicaron aumento significativo en la frecuencia de MN-RET y disminución significativa en el porcentaje de RET en sangre periférica dependiente del tiempo, en las dosis más altas de HQ administrada, tanto en ratas con bazo así como esplenectomizadas, lo que nos llevó a pensar que la HQ en médula ósea *puede inhibir primero la eritropoyesis al impactar en células progenitoras* y disminuir el porcentaje de RET en sangre periférica, *y posteriormente cuando estas células progenitoras en médula ósea se están recuperando y diferenciando se expresa el daño causado al ADN en forma de MN*, los cuales se observaron en RET de sangre periférica semanas después del tratamiento. Es decir, *la HQ administrada de forma aguda puede provocar un daño genotóxico inmediato al impactar en células eritroides de médula ósea que se están diferenciando* (resultados positivos 24-48 h post-tratamiento), pero también puede provocar un daño genotóxico a largo plazo que no ha sido reportado ya que la evaluación *in vivo* de los compuestos se limita a un único muestreo realizado 24-48 h post-tratamiento.

Nuestra deducción del efecto a largo plazo se basa en estudios reportados por Gokden & Lazzarotto [2012], donde se observó que la HQ inhibe la hematopoyesis al modificar la respuesta de citocinas e inducir la muerte de células progenitoras hematopoyéticas. Además, estudios realizados por Wu & col. [2011] en progenitores eritroides demostraron que la administración de HQ a dosis no tóxicas

impacta en la diferenciación eritroide al observarse un descenso en la síntesis de hemoglobina dependiente del tiempo, incluso la expresión del receptor de transferrina (CD71) y la proteína GPA se ven reducidas a la par que se desregula a la baja los niveles de ARNm de algunos genes que codifican para factores de transcripción como GATA-2. Lo reportado previamente y los resultados obtenidos en este estudio, indicaron que la HQ no solo daña a nivel genotóxico, sino también a nivel citotóxico y que ambos pueden estar relacionados a través de un efecto citostático (inhibición de la multiplicación y diferenciación celular) que ejerce la HQ sobre precursores eritroides en médula ósea.

La importancia de evaluar la relación entre estos dos efectos tóxicos en médula ósea, radica en que a pesar de que la HQ es un metabolito muy estudiado del benceno, aún no se tiene clara su contribución a la toxicidad de este compuesto. Sin embargo, se ha comprobado que la HQ administrada por vía oral, subcutánea o intraperitoneal, llega a médula ósea y ahí es oxidada por la alta actividad enzimática de mieloperoxidasas a 1,4-benzoquinona, metabolito reactivo al cual se le atribuye la mayor parte de la toxicidad del compuesto, ya que es un generador importante de especies reactivas de oxígeno (ROS), como radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que producen daño al ADN, proteínas y lípidos de membrana [McGregor, D., 2007; López, R., 2018]. Particularmente, en el ADN los radicales libres causan cambios en las bases nitrogenadas, daño a la cadena de azúcares, pérdida de bases de purina, formación de aductos ADN-proteína y rupturas de cadena sencilla o doble que pueden llevar a la creación de MN [López, R., 2018; Kohen & Nyska, 2002].

En este estudio, la genotoxicidad de la HQ en médula ósea observada a través del ensayo de MN en RET de sangre periférica puede atribuirse en un principio a la oxidación del compuesto a benzoquinona y semiquinona, metabolitos que pudieron provocar rupturas de cadena sencilla o doble al interactuar con oxígeno molecular (O_2) y generar ROS. Sin embargo, debido a que la HQ se administró de forma aguda, otro u otros mecanismos debieron haber actuado para explicar las frecuencias elevadas de MN-RET observadas semanas después de finalizado el tratamiento, ya que se ha reportado que la HQ a dosis de 50 mg/kg peso administrada por vía oral, se metaboliza y excreta en no más de 8 h [English & col., 1988; 2005].

Por lo tanto, el efecto genotóxico observado a largo plazo con el compuesto HQ además de relacionarlo con el efecto citostático mencionado anteriormente, también lo relacionamos con procesos de reparación no efectivos que pudieron ocasionar deficiencias o errores durante la replicación y posterior división celular del ADN. De hecho, estudios *in vivo* en médula ósea de ratón han reportado que la HQ induce aberraciones cromosómicas expresadas como cromosomas dicéntricos y rupturas cromosómicas [DeCaprio A. P., 1999], por lo que una explicación del efecto genotóxico a largo plazo se puede relacionar con la formación de puentes nucleoplásmicos debido a una mala reparación de dos rupturas cromosómicas, y a ciclos ruptura-fusión-puente que pudieron haber prolongado la expresión del daño causado por la HQ en forma de MN.

En resumen, en este estudio a pesar de la eliminación continua de células micronucleadas que realizó el bazo, se corroboró que la HQ a dosis bajas (25 mg/kg peso) no demuestra un efecto genotóxico a través del ensayo de MN en RET de sangre periférica, mientras que a dosis elevadas (50 y 100 mg/kg peso) además de un efecto genotóxico inmediato tiene un efecto genotóxico a largo plazo que probablemente está relacionado con mala reparación de rupturas cromosómicas y con citotoxicidad que se observó que impacta en la expresión del receptor de transferrina, a lo cual se atribuyen los resultados negativos en la inducción de MN evaluada a través del marcador CD71. Por lo tanto, estos resultados

deben ser considerados para revisar la respuesta obtenida por diferentes compuestos al ser evaluados mediante la prueba de MN *in vivo* por CTF, tal y como está validada actualmente, ya que podrían conducir a resultados falso-negativos.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio indicaron que existe una eliminación constante a través del bazo de células micronucleadas, ya que la sangre recorre todo el cuerpo varias veces al día. La relevancia que tiene esta eliminación en el ensayo de micronúcleos *in vivo* en RET de sangre periférica radica en que a pesar de la eliminación continua, el daño causado por el compuesto a evaluar es mayor al que normalmente puede filtrar el bazo, por lo tanto el tiempo que tardan en eliminarse los MN-RET de circulación sanguínea más que depender del tiempo que tardan en cruzar la células dañadas a través del bazo, depende de la cantidad de daño que causó el compuesto evaluado sobre precursores eritroides de médula ósea, y su ritmo de diferenciación y transporte a circulación sanguínea.

Cabe mencionar que la metodología utilizada en este estudio permitió obtener mayor información toxicológica del compuesto evaluado, ya que el efecto genotóxico de la HQ pudo haber sido considerado como negativo si sólo se hubiera acotado a la porción de RET CD71+, tal y como está validada actualmente la prueba de MN *in vivo*. Además, debido al aumento marcadamente significativo en la frecuencia de MN-RET en la sexta semana post-tratamiento del compuesto HQ, se expresa que es importante considerar otros tiempos de muestreo para exposiciones agudas ya que los períodos de diferenciación de los precursores eritroides en los cuales puede incidir el compuesto a evaluar varían. Por lo tanto, este retraso en la respuesta tendría que ser considerado en el modelo de roedores cuando se usa para estudiar escenarios de exposición humana a benceno y otros compuestos que actúan de manera similar.

CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

- Los resultados indicaron que existe una eliminación constante por parte del bazo de MN-RET, lo cual mantiene las frecuencias de MN en sangre periférica en un nivel basal.
- Los descensos y ascensos observados en la frecuencia de MN-RET después de una dosificación aguda, se relacionan con el daño aleatorio causado a los precursores eritroides de médula ósea y su desigual diferenciación, más que a momentos específicos de eliminación de células micronucleadas.
- El ensayo de MN en eritrocitos jóvenes de sangre periférica, tal y como está validado actualmente, da por hecho que el compuesto evaluado solo incide en precursores eritroides inmediatos y no en células progenitoras, las cuales tardan un mayor tiempo en diferenciarse.

- La metodología utilizada actualmente para evaluar MN-RET, puede llevar a resultados falso-negativos, si como se observó aquí, el compuesto evaluado ejerce una fuerte citotoxicidad impactando en el receptor de transferrina.
- Es necesario realizar más investigación con el compuesto HQ (y con compuestos con actividad similar) para corroborar la relación obtenida en este estudio en cuanto a la genotoxicidad y citotoxicidad que ejerció el compuesto en médula ósea.
- Dado los resultados obtenidos en este estudio, es importante revisar los criterios bajo los cuales se validan las pruebas que se utilizan para determinar el potencial genotóxico de los compuestos.

REFERENCIAS

- ACGIH-AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (1997) TLVs and BELs, Cincinnati, OH, p.27.
- ADLER, I-D. & KLIESCH, U. (1990) Comparison of single and multiple treatment regimens in the mouse bone marrow micronucleus assay for hydroquinone (HQ) and cyclophosphamide (CP). *Mutat. Res.*, 234: 115–123.
- ADLER, I-D., KLIESCH, U., VAN HUMMELEN, P. & KIRSCH-VOLDERS, M. (1991) Mouse micronucleus tests with known and suspect spindle poisons: Results from two laboratories. *Mutagenesis*, 6: 47–53.
- ANDERSON, D., YU, T. W. & SCHMEZER, P. (1995) An investigation of the DNA-damaging ability of benzene and its metabolites in human lymphocytes, using the comet assay. *Environ. Mol. Mutag.*, 26: 305–314.
- ANTOCCIA, A., DEGRASSI, F., BATTISTONI, A., CILLIUTTI, P., & TANZARELLA, C. (1991) *In vitro* micronucleus test with kinetochore staining: Evaluation of test performance. *Mutagenesis*, 6: 319–324.
- ARAUJO, A. T. (2009) Estudio de la naturaleza de las gemaciones de cromatina producidas en respuesta a una agresión química (tesis de maestría). UNAM, México.
- BARALE, R., MARRAZZINI, A., BETTI, C., VANGELISTI, V., LOPRIENO, N. & BARRAI, I. (1990) Genotoxicity of two metabolites of benzene: Phenol and hydroquinone show strong synergistic effects in vivo. *Mutat. Res.*, 244: 15–20.
- BAUTISTA, M. J., CARRASCO, L., PÉREZ, J., CHACÓN, F., HERVAS, J. & SIERRA, M.A. (1994) Estudio comparativo del bazo en los diferentes mamíferos domésticos. *An. Vet. (MURCIA)*, 9-10: 83-97.
- BECTON, DICKINSON AND COMPANY (2002) Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. USA. Recuperado de [<https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>]
- BEMIS, J. C., TOROUS, D. K., TOMETSKO, C. R. & DERTINGER, S. D. (2008) Cross-

Species Genetic Toxicity Assessment Accomplished by Flow Cytometric Analysis of Blood. *Current Protocols in Toxicology*, 36: 2.14.1 – 2.14.15.

BHALLI, J. A., DING, W., SHADDOCK, J. G., PEARCE, M. G., DOBROVOLSKY, V. N. & HEFLICH, R. H. (2013) Evaluating the weak *in vivo* micronucleus response of a genotoxic carcinogen, Aristolochic acids. *Mutation Research*, 753: 82– 92.

BHATIA, A. & KUMAR, Y. (2013) Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. *APMIS*, 121: 569-581.

BIOSPHERA.ORG (2018) Software anatomía do Rato 3D [Fig.]. Recuperada de [https://biosphera.org/br/produto/software-anatomia-simplificada-do-rato-3d/]

BOWDLER, A. J. (2001) *The complete spleen: A handbook of structure, function and clinical disorders*. USA: Humana Press Inc.

BOWEN, D. E., WHITWELL, J. H., LILLFORD, L., HENDERSON, D., KIDD, D., MC GARRY, S., PEARCE, G., BEEVERS, C. & KIRKLAND, D. J. (2011) Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutation Research*, 722: 7– 19.

BRUZOS, T. & BRUZOS, D. (s.f.) Anatomía del bazo [Fig.]. Recuperada de [http://www.sabelotodo.org/anatomia/bazo.html]

CHANG, Y., ZHOU, C., HUANG, F., TOROUS, D. K., LUAN, Y., SHI, C., WANG, H., WANG, X. & COL. (2014) Inter-laboratory validation of the *in-vivo* flow cytometric micronucleus analysis method (MicroFlow®) in China. *Mutation Research*, 772: 6–13.

CHEN, H. & EASTMOND, D. A. (1995) Synergistic increase in chromosomal breakage within the euchromatin induced by an interaction of the benzene metabolites phenol

and hydroquinone in mice. *Carcinogenesis*, 16: 1963–1969.

CIRANNI, R., BARALE, R., GHELARDINI, G. & LOPRIENO, N. (1988) Benzene and the genotoxicity of its metabolites. II. The effect of the route of administration on the micronuclei and bone marrow depression in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 209: 23–28.

DECAPRIO, A. P. (1999) The toxicology of hydroquinone – Relevance to occupational and environmental exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 29(3): 283-330.

DECORDIER, I. & KIRSCH-VOLDERS, M. (2006) The *in vitro* micronucleus test: From past to future. *Mutation Research*, 607(1): 2-4.

DEISINGER, P. J. & ENGLISH, J. C. (1999) Bioavailability and metabolism of hydroquinone after intratracheal instillation in male rats. *Drug Metab. Dispos.*, 27(4): 442-448.

DERELANKO & AULETTA (2014) *Handbook of Toxicology*, 3ra edition. Boca Raton: CRC Press.

DERTINGER, S. D., TOROUS, D. K. & TOMETSKO, K. R. (1996) Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat. Res.*, 371: 283–292.

DERTINGER, S. D., CAMPHAUSEN, K., MACGREGOR, J. T., BISHOP, M. E., TOROUS, D. K. & COL. (2004) Three-color labeling method for flow cytometric measurement of cytogenetic damage in rodent and human blood. *Environ. Mol. Mutagen.*, 44: 427–435.

DERTINGER, S. D., TOROUS, D. K., HAYASHI, M. & MACGREGOR, J. T. (2011) Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage. *Mutagenesis*, 26(1): 139-145.

- DIVINCENZO, G. D., HAMILTON, M. L., REYNOLDS, R. C. & ZIEGLER, D. A. (1984) Metabolic fate and disposition of [¹⁴C]hydroquinone given orally to Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 33(1): 8-18.
- DOEPKER, C. L., DUMONT, K. W., O'DONOGHUE, J. & ENGLISH, J. C. (2000) Lack of induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with hydroquinone. *Mutagenesis*, 15: 479-487.
- EASTMOND, D. A., RUPA, D. S. & HASEGAWA, L. S. (1994) Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutat. Res.*, 322: 9-20.
- ENGLISH, J. C., DEISINGER, P. J., PERRY, L. G., SCHUM, D. B. & GUEST, D. (1988) Toxicokinetics studies with hydroquinone in male and female Fischer 344 rats. Rochester, NY, Eastman Kodak Co. Report No. TX-88-84.
- ENGLISH, J. C., HILL, T., O'DONOGHUE, J. L. & REDDY, M. V. (1994) Measurement of nuclear DNA modification by ³²P-postlabeling in the kidneys of male and female Fisher 344 rats after multiple gavage doses of hydroquinone. *Fundam Appl. Toxicol.*, 23: 391-396.
- ENGLISH, J. C. & DEISINGER, P. J. (2005) Metabolism and disposition of hydroquinone in Fischer 344 rats after oral or dermal administration. *Food and Chemical Toxicology*, 43(3): 483-493.
- EREXSON, G. L., WILMER, J. L. & KLIGERMAN, A. D. (1985) Sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to benzene and its metabolites *in vitro*. *Cancer Res.*, 45: 2471-2477.
- FAHRIG, R. (1984) Genetic mode of action of cocarcinogens and tumor promoters in yeast and mice. *Mol. Gen. Genet.*, 194: 7-14.
- FDA, USA. (2000) Redbook 2000: IV.C.1.d Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Recuperado de [<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm078338.htm>]
- FENECH, M., & MORLEY, A. A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147(1-2): 29-36.
- FENECH, M., KIRSCH-VOLDERS, M., NATARAJAN, A. T., SURRALLES, J., CROTT, J. W., PARRY, J. & COL. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1): 125-132.
- FOUREMAN, P., MASON, J. M., VALENCIA, R. & ZIMMERING, S. (1994) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. IX. Results of 50 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23: 51-63.
- GALLOWAY, S. M., ARMSTRONG, M. J., REUBEN, C., COLMAN, S., BROWN, B., CANNON, C. & COL. (1987) Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 10 (Suppl. 10): 1-175.
- GALLOWAY, S. M. (2017) International Regulatory Requirements for Genotoxicity Testing for Pharmaceuticals used in Human Medicine, and their Impurities and Metabolites. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 00:00-00.
- GOKDEN, F. & LAZZAROTTO, A. (2012) Hydroquinone production, uses and health effects. USA., New York: Nova Science Publishers, Inc.
- GRAWÉ, J., ZETTERBERG, G. & AMNÈUS, H. (1992) Flow-Cytometric Enumeration of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes in

Mouse Peripheral Blood. Cytometry, 13: 750-758.

GRAWÉ, J., NUSSE, M. & ADLER, I. D. (1997a) Quantitative and qualitative studies of micronucleus induction in mouse erythrocytes using flow cytometry. I. Measurement of micronucleus induction in peripheral blood polychromatic erythrocytes by chemicals with known and suspected genotoxicity, *Mutagenesis* 12: 1-8.

GRAWÉ, J., ADLER, I. D. & NUSSE, M. (1997b) Quantitative and qualitative studies of micronucleus induction in mouse erythrocytes using flow cytometry. II. Analysis of micronuclei of aneugenic and clastogenic origin by dual-colour FISH on populations of bone marrow PCEs flow sorted on the basis of their relative DNA content, *Mutagenesis* 12: 9-16.

HAKURA, A., TSUTSUI, Y., MOCHIDA, H., SUGIHARA, Y., MIKAMI, T. & SAGAMI, F. (1996) Mutagenicity of dihydroxybenzenes and dihydroxynaphthalenes for Ames Salmonella tester strains. *Mutat. Res.*, 371: 293-299.

HAM, A. W. (1984) El bazo. En Cormack, D. H. & Ham, A. W.: *Tratado de Histología*. (pp. 1-37). México: Ed. Interamericana.

HAMADA, S., SUTOU, S., MORITA, T., WAKATA, A., ASANAMI, S., HOSOYA, S., OZAWA, S. & COL. (2001) Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environ. Mol. Mutagen.*, 7: 93-110.

HARVEY, J. W. (2012) *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas*. USA: ELSEVIER.

HAWORTH, S., LAWLOR, T., MORTELMANS, K., SPECK, W. & ZEIGER, E. (1983) Salmonella mutagenicity test results

for 250 chemicals. *Environ. Mutagen.* 5 (Suppl. 1): 3-142.

HAYASHI, M., SOFUNI, T. & ISHIDATE, JR. M. (1983) An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research*, 120: 241-247.

HAYASHI, M., MORITA, T., KODAMA, Y., SOFUNI, T. & ISHIDATE, JR. M. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using Acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, 245: 245-249.

HAYASHI, M., KODAMA, Y., AWOGLI, T., SUZUKI, T., ASITA, A. O. & SOFUNI, T. (1992) The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin-C and cyclophosphamide-treated rats. *Mutation Research*, 278: 209-213.

HAYASHI, M., MACGREGOR, J. T., GATEHOUSE, D. G., ADLER I.-D., BLAKEY, D. H., DERTINGER, S. D., & COL. (2000) *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 234-252.

HAYASHI, M., MACGREGOR, J. T., GATEHOUSE, D. G., BLAKEY, D. H., DERTINGER, S. D. & COL. (2007) *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutat Res.*, 627:10-30.

HAYASHI, M. (2016) The micronucleus test – most widely used *in vivo* genotoxicity test-. *Genes Environ.*, 38(18).

HEDDLE, J. A. (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and molecular mechanisms of Mutagenesis*, 18(2): 187-190.

- HEDDLE, J. A. & COUNTRYMAN, P. I. (1976) The production of micronuclei form chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research /Fundamental and molecular mechanisms of Mutagenesis*, 41: 321-332.
- HEDDLE, J. A., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MACGREGOR, J. T., NEWELL, G. W. & SALAMONE, M. F. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 123: 61-118.
- HEDDLE, J. A., FENECH, M., HAYASHI, M. & MACGREGOR, J. T. (2011) Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 26(1): 3-10.
- HIRAKU, Y. & KAWANISHI, S. (1996) Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res.*, 56: 5172–5178.
- HUGHES-JONES, N. C. & WICKRAMASINGHE, S. N. (1996) Lecture notes on Hematology. United Kingdom: Blackwell Science Ltd.
- HUTTER, K. J., & STÖHR M. (1982) Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Histochemistry*, 75(3): 353-362.
- ICH, EXPERT WORKING GROUP (2008) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2 (R1). Draft consensus guideline. Recuperado de [http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step2/S2_R1_Guideline.pdf]
- ICH, EXPERT WORKING GROUP (2011) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2 (R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline. Recuperado de [http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf]
- JACOBSON-KRAM, D. & KELLER, K. A. (2001) *Toxicology Testing Handbook. Principles, applications and data interpretation.* New York, USA: Mercel Dekker, Inc.
- JAIN, N. C. (1993) *Essentials of veterinary hematology.* USA: Williams & Wilkins.
- KAWASAKI, I., SUZUKI, Y. & YANAGISAWA, H. (2013) Zinc deficiency enhances the induction of micronuclei and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine via superoxide radical in bone marrow of Zinc-deficient Rats. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 154: 120-126.
- KHAN, M. A. H., SHAREEF, P. A. A., REHMAN, A., ULLAH, R., REHMAN, L. & ABIDI, S. M. A. (2017) Genotoxic potential of *Fasciola gigantica* infection in experimentally infected rabbits. *J. Parasit. Dis.*, 41(2): 423-428.
- KISSLING, G. E., DERTINGER, S. D., HAYASHI, M. & MACGREGOR, J. T. (2007) Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability. *Mutat. Res.*, 634: 235–240.
- KLAASSEN, C. D. & WATKINS, J. B. (2001) *Casarett & Doull Manual de toxicología. 5ta edición.* México: McGraw-Hill Editores.
- KOHEN, R. & NYSKA, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30: 620–650.
- KRASAVAGE, W. J. (1984) Hydroquinone: A dominant lethal assay in male rats. Health and Environment Laboratories, Eastman Kodak Co., Rochester, NY. Acc. No. 900356. HAEL No. 83-0155.
- KRISHNA, G. & THEISS, J. C. (1995) Concurrent analysis cytogenetic damage *in vivo*: A multiple endpoint-multiple tissue approach. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25: 314-320.

- KRISHNA, G. & HAYASHI, M. (2000) *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455: 155-166.
- LASNE, C., GU, Z. W., VENEGAS, W. & CHOUROULINKOV, I. (1984) The *in vitro* micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the *in vitro* sister-chromatid exchange assay. *Mutation Research*, 130: 273-282.
- LAU, S. S., PETERS, M. M., KLEINER, H. E., CANALES, P. L. & MONKS, T. J. (1996) Linking the metabolism of hydroquinone to its nephrotoxicity and nephrocarcinogenicity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 387: 267-273.
- LEANDERSON, P. & TAGESSON, C. (1990) Cigarette smoke-induced DNA-damage: Role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine. *Chem Biol. Interact.*, 75: 71-81.
- LEARY, J. F. & TOMETSKO A. M. (1986) An automated mouse micronucleus assay for detection of clastogenic chemicals in the environment, 17th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society, Baltimore, MD, 9-13 April, *Environ. Mutagen.*, 8, 5.
- LEOPARDI, P., ZIJNO, A., BASSANI, B. & PACCHIEROTTI, F. (1993) *In vivo* studies on chemically induced aneuploidy in mouse somatic and germinal cells. *Mutat. Res.*, 287: 119-130.
- LOFSNESS, K. (2008) Blood Cell Maturation [Fig.]. Recuperada de [<http://hema.umn.edu/pages/matchart.html>]
- LÓPEZ, R. (2018) Índice de estrés oxidante en la exposición crónica a compuestos orgánicos volátiles, y su relación con polimorfismos genéticos de metabolismo de xenobióticos (tesis de doctorado). UNAM, México.
- LÓPEZ, V. (2012) Anatomía y fisiología del bazo. En Pérez, E. & col.: *Gastroenterología*. (pp. 537-542). México: McGraw Hill.
- MACGREGOR, J. T., WEHR, C. M. & GOULD, D. H. (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen.*, 2: 509-514.
- MACGREGOR, J. T., WEHR, C. M. & LANGLOIS, R. G. (1983). A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y. *Mutation Research*, 120: 269-275.
- MACGREGOR, J. T., O'LOUGHLIN, K. G. & HILL, J. R. (1992) Micronucleated erythrocytes in bone marrow and peripheral blood of the beagle dog. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19: 38.
- MACGREGOR, J. T., BISHOP, M. E., MCNAMEE, J. P., HAYASHI, M., ASANO, N., WAKATA, A., NAKAJIMA, M., & COL. (2006) Flow Cytometric Analysis of Micronuclei in Peripheral Blood Reticulocytes: II. An Efficient Method of Monitoring Chromosomal Damage in the Rat. *Toxicological Science*, 94(1): 92-107.
- MAK VALUE DOCUMENTATION (1998) Hydroquinone. *Occupational Toxicants*, 10: 113-145
- MARRAZZINI, A., CHELOTTI, L., BARRAI, I., LOPRIENO, N. & BARALE, R. (1994a) *In vivo* genotoxic interactions among three phenolic benzene metabolites. *Mutat. Res.*, 341: 29-46.
- MARRAZZINI, A., BETTI, C., BERNACCHI, F., BARRAI, I. & BARALE, R. (1994b) Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons. *Mutagenesis*, 9: 505-515.
- MARSEE, D. K., PINKUS, G. S. & YU, H. (2010) CD71 (Transferrin Receptor): An Effective Marker for Erythroid Precursors in

Bone Marrow Biopsy Specimens. *Am. J. Clin. Pathol.*, 134 (3): 429-435.

MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P. V., DECORDER, I. & KIRSCH-VOLDERS, M. (2006) Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring [Fig.]. *Biochimie.*, 88(11): 1515-1531.

MCGREGOR, D. B., BROWN, A., CATTANACH, P., EDWARDS, I., MCBRIDE, D. & CASPARY, W. J. (1988a) Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay. II: 18 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 11: 91-118.

MCGREGOR, D. B., RIACH, C. G., BROWN, A., EDWARDS, I., REYNOLDS, D., WEST, K. & WILLINGTON, S. (1988b) Reactivity of catecholamines and related substances in the mouse lymphoma L5178Y cell assay for mutagens. *Environ. Mol. Mutag.*, 11: 523-544.

MCGREGOR, D. (2007) Hydroquinone: An Evaluation of the Human Risks from its Carcinogenic and Mutagenic Properties. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(10): 887-914.

MEMORANG, INC. (2018) Lymphoid System [Fig.]. Recuperada de [<https://www.memorangapp.com/flashcards/70696/016++Lymphoid+System/>]

MILLER, B. M., ZITZELSBERGER, H. F., WEIER, H-U. & ADLER, I.-D. (1991) Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, 6: 297-302.

MONKS, T. J. & LAU, S.S. (1997) Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 1296-1313.

MONTERO, R., ARAUJO, A., SERRANO, L. & CASTELLANOS, C. (2016) Use of RNA content to identify reticulocytes in the *in vivo*

micronucleus test in humans. *Current Topics in Toxicology*, 12:111-123.

MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, W. J., BATTIPS, D. M. & HUNGERFORD, D. A. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, 20: 613-616.

MORENO, M. D. (2001) *Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. México: McGraw Hill.

MORIMOTO, K. & WOLFF, S. (1980) Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res.*, 40: 1189-1193.

MOTULSKY, A. G., CASSERD, F. & GIBLETT, E. (1956) *In vivo* measurement of splenic circulation: Rapid method for demonstration of splenic red cell sequestration. *J. Clin. Invest.*, 35: 725.

NAKAMURA, S-I., ODA, Y., SHIMADA, T., OKI, I. & SUGIMOTO, K. (1987) SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: Examination with 151 chemicals. *Mutat. Res.*, 192: 239-246.

O'DONOGHUE, J., BARBER, E. D., HILL, T., AEBI, J. & FIORICA, L. (1999) Hydroquinone: Genotoxicity and prevention of genotoxicity following ingestion. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 931-936.

PACCHIEROTTI, F., BASSANI, B., LEOPARDI, P. & ZIJNO, A. (1991) Origin of aneuploidy in relation to disturbances of cell-cycle progression. II: Cytogenetic analysis of various parameters in mouse bone marrow cells after colchicine or hydroquinone treatment. *Mutagenesis*, 6: 307-311.

PARASURAMAN, S. (2011) Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(2): 74-79.

- REDDY, M. V., HILL, T., O'DONOGHUE, J. L. & ENGLISH, J. C. (1997) Lack of oxidative DNA damage by hydroquinone in the kidneys of rats after oral administration. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 38, April.
- REY, C. A. (2016) Rotura do baço [Fig.]. Recuperada de [<https://drcarlosrey.blogspot.mx/2016/04/rotura-do-baco.html>]
- ROMAGNA, F. & STANIFORTH, C.D. (1989) The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*, 213(1): 91-104.
- SAKAI, M., YOSHIDA, D. & MIZUSAKI, S. (1985) Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutat. Res.*, 156: 61–67.
- SALGADO, M. (2002) Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). UNAM, Instituto de Biotecnología. México. Recuperado de [<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/FACS.pdf>]
- SCHLEGEL, R. & MACGREGOR, J. T. (1984) The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fisher 344 rats: Implications for cytogenetic screening. *Mutat. Res.*, 127: 169–174.
- SCHLEGEL, R., MACGREGOR, J. T., & EVERSON, R. B. (1986) Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res.*, 46: 3717–3721.
- SCHLOSSER, M. J., SHURINA, R. D., & KALF, G. F. (1990) Prostaglandin H synthase catalysed oxidation of hydroquinone to a sulfhydrylbinding and DNA-damaging metabolite *Chem. Res. Toxicol.*, 3: 333–339.
- SCHMID, W. & MATTER, B. (1971) Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutation Research /Fundamental and molecular mechanisms of Mutagenesis*, 12(4): 417-425.
- SEELBACH, A., FISSLER, B. & MADLE, S. (1993) Further evaluation of a modified micronucleus assay with V79 cells for detection of aneugenic effects. *Mutat. Res.*, 303: 163–169.
- SEKI, A. & ABE, M. (1985) Scanning electron microscopic studies on the microvascular system of the spleen in the rat, cat, dog, pig, horse and cow. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47: 237-249.
- SHI, Y-H., WANG, B-W., TOUKAN, T., LI, Q-Z. & ZHANG, Y-J. (2015) Association between micronucleus frequency and cervical intraepithelial neoplasia grade in Thinprep cytological test and its significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 8(7): 8426-8432.
- SILBERGELD, E. (1998) Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Toxicología. INSHT.
- SUÁREZ, K. (2008) Efecto de los polimorfismos de CYP1A1 y CYP2E1 en la frecuencia de micronúcleos en una población mestiza de Tlaxcala (tesis de pregrado). UNAM, México.
- THEURL, I., HILGENDORF, I., NAIRZ, M., TYMOSZUK, P., HASCHKA, D., ASSHOFF, M., HE, S. & COL. (2016) On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat Med.*, 22(8): 945-951.
- THRALL, M. A. (2006) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. USA: Blackwell Publishing.
- TOROUS, D. K., HALL, N. E., DERTINGER, S. D., DIEHL, M. S., ILLI-LOVE, H. A. & COL. (2001) Flow cytometric enumeration of micronucleated reticulocytes: high transferability among 14 laboratories. *Environ. Mol. Mutagen.*, 38: 59–68.
- TOROUS, D. K., HALL, N.E., ILLI-LOVE, A. H., DIEHL, M. S., CEDERBRANT, K., SANDELIN, K., PONTÉN, I., & COL. (2005) Interlaboratory validation of a CD71-based flow cytometric method (MicroFlow®) for the scoring of micronucleated reticulocytes

in mouse peripheral blood. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45: 44–55.

TOXNET- TOXICOLOGY DATA NETWORK (2015) HSDB: Hydroquinone, CASRN: 123-31-9. Recuperado de [<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~EOPpH6:3>]

TSUTSUI, T., HAYASHI, N., MAIZUMI, H., HUFF, J. & BARRETT, J. C. (1997) Benzene-, catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat. Res.*, 373: 113–123.

TUNEK, A., HÖGSTEDT, B. & OLOFSSON T. (1982) Mechanism of benzene toxicity. Effects of benzene and benzene metabolites on bone marrow cellularity, number of granulopoietic stem cells and frequency of micronuclei in mice. *Chem. Biol. Interact.*, 39: 129–138.

VAN DELFT, J. H. M. & DE VOGEL, N. (1997) Antimutagenicity study with hydroquinone in a chromosomal aberration test with cultured human lymphocytes. TNO, Nutrition and Food Research Institute Zeist, The Netherlands. Report No. V97.476.

VANNIER, E. & KRAUSE, P. J. (2012) Human Babesiosis [Fig.]. Recuperada de [<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1202018>]

VIAN, L., VAN HUMMELEN, P., BICHET, N., GOUY, D. & KIRSCH-VOLDERS, M. (1995) Evaluation of hydroquinone and chloral hydrate on the *in vitro* micronucleus test on isolated lymphocytes. *Mutat. Res.*, 334: 1–7.

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: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. *Environ. Mol. Mutagen.*, 32: 84–100.

WALLES, S. A. S. (1992) Mechanisms of DNA damage induced in rat hepatocytes by quinones. *Cancer Lett.*, 63: 47–52.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1994) Hydroquinone (Environmental Health Criteria 157). Geneva: International Programme on Chemical Safety.

WHYSNER, J., VERNA, L., ENGLISH, J. C. & WILLIAMS, G. M. (1995) Analysis of studies related to tumorigenicity induced by hydroquinone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 21: 158-176.

WINN, L. M. (2003) Homologous recombination initiated by benzene metabolites: A potential role of oxidative stress. *Toxicol. Sci.*, 72: 143–149.

WINSLOW, T. (2014) ¿Qué es la médula ósea? [Fig.]. Recuperada de [<http://biologia415.blogspot.mx/2016/09/que-es-la-medula-osea.html>]

WU, R. X., XUE, M., LI, X. L., WANG, Y., WANG, J., HAN, Q. L. & YI, Z. C. (2011) Phenolic metabolites of benzene inhibited the erythroid differentiation of K562 cells. *Toxicol. Lett.*, 203: 190-199.

XU, W. & ADLER, I-D. (1990) Clastogenic effects of known and suspect spindle poisons studied by chromosome analysis in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 5: 371–374.

YAGER, J. W., EASTMOND, D. A., ROBERTSON, M. L., PARADISIN, W. M. & SMITH, M. T. (1990) Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res.*, 50: 393–399.

ZALACAÍN, M., SIERRASESÚMAGA, L., PATIÑO, A. (2005) El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2): 227-236.

ANEXO A

▪ Conceptos importantes

Biomarcador [Suárez, K., 2008].

Cualquier respuesta biológica medible indicadora de la desviación del estado normal.

- *Biomarcador de susceptibilidad*: criterios de valoración que indican la presencia de una alteración bioquímica o fisiológica, relacionada con incremento en la vulnerabilidad de los organismos.
- *Biomarcador de exposición*: consiste en la medición de la dosis interna de un xenobiótico, sus metabolitos, una diana molecular o celular, o un efecto directamente atribuible a tal sustancia en el organismo.
- *Biomarcador de efecto*: alteración fisiológica, bioquímica o conductual, que es directamente atribuible a la exposición a un agente químico, físico o biológico.

Características de un biomarcador:

- *Repetitividad*: un biomarcador debe proveer concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas.
- *Reproducibilidad*: resultados idénticos en el biomarcador evaluado deben de ser obtenidos en diferentes laboratorios utilizando diferentes equipos.
- *Sensibilidad*: un biomarcador tiene una buena sensibilidad al demostrar un efecto aún en bajas dosis de exposición al compuesto evaluado.
- *Especificidad*: un biomarcador es específico al indicar un efecto solo cuando éste sucede.

Características del ensayo de MN *in vivo* en sangre periférica, como está validado actualmente

[Hayashi & col., 2000; FDA, 2000].

- *Número de animales y género*: en general, utilizar un solo género es adecuado para la evaluación del compuesto, sin embargo, cuando existe la evidencia de diferencias en la toxicidad y el metabolismo entre machos y hembras, ambos deben de ser usados, considerando 5 animales por grupo, tanto en controles y como en grupos tratados.
- *Tiempo de muestreo*: la sangre debe de ser colectada en no más de 48 h después del último tratamiento, preferentemente 24 h después. Sin embargo, debido a que la presencia o ausencia de eritrocitos micronucleados en sangre periférica está en función de la cinética de la eritropoyesis, la vida útil de los eritrocitos de cada especie y la eliminación selectiva del bazo, los tiempos de muestreo pueden ser modificados.
- *Dosis administradas*: al menos tres dosis deben de ser usadas, cubriendo un rango claro de toxicidad, toxicidad leve y no toxicidad.
- *Vía de administración*: la sustancia a prueba debe de ser administrada vía oral al menos que otra ruta de exposición sea lo suficientemente justificada.
- *Tipo celular evaluado*: el ensayo de MN puede ser evaluado en eritrocitos maduros e inmaduros en ratones, sin embargo, en especies donde se ha reportado selección esplénica es preferible restringir el análisis a la fracción más joven de eritrocitos inmaduros.

Cepa Wistar [Derelanko & Auletta, 2014].

Modelo biológico de ratas albinas perteneciente a la especie *Rattus norvegicus*, originado en el instituto Wistar EE. UU. en 1906, para uso en investigación biológica y médica. Es la primera cepa de ratas desarrollada para servir como modelo biológico y es utilizada preferentemente para estudios de carcinogenicidad debido a su pequeño tamaño, incidencia de tumores espontáneos baja y mayor supervivencia.

Ensayo o prueba de toxicidad [Moreno, M. D., 2001].

Estudio experimental de los efectos adversos de un agente (químico, físico o biológico) sobre un organismo o tipo celular, durante un periodo de tiempo determinado y en condiciones definidas.

Estudio *in vitro* [Moreno, M. D., 2001].

Estudio de laboratorio realizado en células, tejidos u órganos aislados o con sistemas subcelulares o bioquímicos.

Estudio *in vivo* [Moreno, M. D., 2001].

Estudio realizado en individuos vivos.

Exposición [Moreno, M. D., 2001].

Contacto de un organismo receptor con un agente en un periodo de tiempo determinado.

- *Exposición aguda*: en ensayos de laboratorio, tipo de exposición con duración inferior a 24 h, que consiste por lo general en una única administración del compuesto, dependiendo de la ruta de administración. En vía oral, la exposición aguda consiste en la administración de 1, 2 o hasta 3 dosis consecutivas del compuesto por administración forzada en los animales de ensayo. En exposición humana, la exposición aguda corresponde a un hecho aislado.
- *Exposición subaguda*: en ensayos de laboratorio, tipo de exposición en la cual el compuesto a evaluar se administra de forma repetida durante un periodo de tiempo relativamente breve, con duración de 1 a 4 semanas.
- *Exposición crónica*: en ensayos de laboratorio, tipo de exposición en la cual el compuesto a evaluar se administra de forma repetida durante un periodo de tiempo superior a 3 meses. En exposición humana, se refiere al tipo de exposición con duración superior a 7 años.

Genotoxicidad [Moreno, M. D., 2001].

Es la alteración causada por algún agente (físico, químico o biológico) en la estructura del ADN. En la mayoría de los casos, esta alteración del ADN se corrige de manera natural mediante la actividad de los mecanismos celulares de reparación. Sin embargo, cuando no se consigue reparar el ADN alterado, el proceso de replicación celular produce nuevas células alteradas, generando así una alteración heredable conocida como mutación.

Mutagenicidad [Moreno, M. D., 2001].

Se conoce como mutagenicidad o mutagénesis a los cambios heredables producidos en la secuencia del ADN. Un compuesto mutagénico o con actividad mutagénica es aquel que tienen la capacidad de producir cambios heredables en el ADN, o mutaciones. Las mutaciones tienen lugar en células germinales o en células somáticas. En células germinales, las mutaciones pueden transmitirse a las siguientes generaciones y tener efectos nulos o causar efectos tóxicos, como la muerte del embrión o lesiones congénitas. En células somáticas, las mutaciones no se transmiten a otros individuos pero al proliferar las células alteradas, estas mutaciones pueden provocar modificaciones en la función celular que conlleven a la inviabilidad y muerte de la célula, o en el peor de los casos, a una multiplicación descontrolada de las células que desemboque en una neoplasia.

Reproducibilidad interna [Derelanko & Auletta, 2014].

Concordancia de resultados cuando el análisis se lleva a cabo en el mismo laboratorio.

Resultados falso-positivos y falso-negativos [Derelanko & Auletta, 2014].

Los resultados falso-positivos son un error que ocurre cuando una prueba da resultados positivos y en realidad no lo son, estos resultados pueden ser controlados a través de la sensibilidad y especificidad del ensayo. Sin embargo, los resultados falso-negativos que ocurren cuando una prueba da resultado negativo pero en realidad es positivo, son difíciles de controlar.

Validez de un ensayo [Derelanko & Auletta, 2014].

Un ensayo debe ser validado para establecer las especificaciones concretas del ensayo. Las medidas de validez indican con qué frecuencia el resultado de un ensayo es confirmado con procedimientos más complejos y rigurosos. La sensibilidad y especificidad son medidas de validez.

ANEXO B

▪ Genotoxicidad del compuesto hidroquinona

La hidroquinona ($C_6H_6O_2$, No. CAS: 123-31-9) es una sustancia blanca cristalina, regularmente encontrada durante su producción en forma sólida o en solución debido a su alto punto de fusión (170-174°C) y ebullición (285°C), tiene una densidad de 1.332 g/cm³ a 15°C y su presión de vapor es de 2.4×10^{-3} Pa a 25°C, este compuesto es altamente soluble en agua (70 g/L a 25°C) y tiene un potencial de bioconcentración de 0.59, medido como el logaritmo del coeficiente de partición n-octanol/agua. Además, la hidroquinona (HQ) es un fuerte agente reductor con un potencial electroquímico de +286 mV para el par redox hidroquinona/benzoquinona, contemplando un pH constante igual a 7.0 y una temperatura de 25°C [MAK Value Documentation, 1998; McGregor, D., 2007].

La HQ puede encontrarse de manera sintética, ya que se produce para una amplia gama de aplicaciones comerciales, como por ejemplo: revelador fotográfico, estabilizador en pinturas, barnices, cosméticos, cremas para la piel, combustibles para aceites y motores, y como antioxidante en la industria del caucho [McGregor, D., 2007; ToxNet, 2015]. Sin embargo, ha sido ampliamente estudiado debido a que es un importante *metabolito del Benceno* que junto con otros metabolitos, se piensa que son los responsables de los cambios y el daño causado por el benceno en el linaje hematopoyético de médula ósea y sangre [MAK Value Documentation, 1998; Gokden & Lazzarotto, 2012].

La exposición a HQ en la población en general, se puede producir a través de contacto con la piel, al respirar productos como barnices, pinturas, pegamentos y humo de tabaco, o incluso al ser ingerida, ya que la HQ se encuentra en algunos insectos y plantas. Además, se ha detectado HQ en verduras, frutas, granos, café, té, cerveza y vino [ToxNet, 2015]. No obstante, la principal exposición al compuesto ha sido observada en trabajadores dedicados a la fabricación del polvo de HQ, ya que éste se oxida a benzoquinona y provoca una serie de síntomas adversos para la salud, que pueden llevar a la muerte si la dosis de exposición al compuesto es alta [McGregor, D., 2007; ToxNet, 2015]. Actualmente, la mayoría de los límites reglamentarios de exposición ocupacional a HQ sin sufrir efectos perjudiciales, como el valor promedio ponderado por tiempo de exposición, es de 2 mg/m³ al día en una jornada de 8 h [WHO, 1994; ACGIH, 1997; ToxNet, 2015].

Estudios enfocados en la cinética y el metabolismo de la HQ una vez que ha ingresado al organismo, se centran en su mayoría en el momento posterior a que la HQ se incorpora a la sangre, ya sea por administración intratraqueal o intraperitoneal, en donde se ha reportado que la HQ se metaboliza rápidamente a compuestos glucurónidos, eliminando así al compuesto original [McGregor, D., 2007]. Un estudio realizado por Deisinger & English [1999] en ratas macho Sprague-Dawley, reportó que la *vida media de eliminación de la HQ* es de 194 segundos en administración vía intratraqueal de 0.1 mg/kg peso del compuesto. Mientras que estudios por administración vía oral, han reportado que una dosificación única de 50 mg/kg peso de HQ en ratas macho Fischer 344, alcanza su máxima concentración en sangre dentro de los primeros 20 minutos, con un intenso metabolismo que provoca que la mayor parte del compuesto original se excrete a través de metabolitos conjugados en las primeras 8 h posteriores a la dosificación [English & col., 1988; 2005]. Divincenzo & col. [1984] y English & col. [1988] reportaron que la mayor proporción de metabolitos de HQ administrada vía oral, son

conjugados de los ácidos glucurónico (45-53%) y sulfúrico (19-33%), y que los metabolitos urinarios restantes consisten en compuestos mercaptúricos (0-5%), hidroquinona no conjugada (0-3%) y 1,4-benzoquinona no conjugada (<1%).

Efectos genotóxicos de la HQ han sido investigados ampliamente debido a su relación con la toxicidad del benceno. Revisiones extensas de las pruebas de genotoxicidad realizadas con este compuesto pueden ser consultadas en Whysner & col. [1995], MAK Value Documentation [1998], DeCaprio A. P. [1999] y McGregor D. [2007], quienes resumieron los estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, en bacterias, animales no mamíferos y mamíferos, por diferentes vías y dosis de administración. A continuación, se presentan los resultados más relevantes y los estudios de genotoxicidad que se han incorporado a la fecha.

La reactividad de la HQ con el ADN es una propiedad importante de su toxicidad, estudios realizados al respecto han demostrado la capacidad de la HQ para catalizar la formación *in vitro* de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) y rupturas de ADN de cadena sencilla en hepatocitos aislados [Leanderson & Tagesson, 1990; Walles, A. A.S., 1992]. Además, se ha reportado que los metabolitos oxidados de HQ como 1,4-benzoquinona y 1,4-benzosemiquinona pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo y ADN de timo de ternera, lo que contribuye a la toxicidad de la HQ en este tejido [Schlosser & col., 1990], incluso conjugados derivados de HQ con glutatión han mostrado ser mutagénicos en ciertas células transfectadas [Monks & Lau, 1997] y para catalizar la formación de 8-OHdG en el timo de ternera *in vitro* [Lau & col., 1996]. No obstante, también se han reportado estudios en donde el aumento de aductos de ADN (8-OHdG) en hepatocitos fue insignificante [English & col., 1994; Reddy & col., 1997].

En cuanto a la capacidad de la HQ de ocasionar cambios heredables en el material genético (mutagenicidad), los resultados obtenidos en la prueba de mutación con bacterias generalmente han sido negativos [Haworth & col., 1983; Sakai & col. 1985; Nakamura & col., 1987], sin embargo, cepas de *Salmonella typhimurium* sensibles a oxidantes han mostrado cambios en algunas pares de bases, atribuidos principalmente a la mutagenicidad observada con 1,4-benzoquinona en varias cepas de la misma especie [Hakura & col., 1996]. En otros estudios con *Saccharomyces cerevisiae* la HQ indujo mutación hacia adelante pero no recombinación mitótica [Fahrig, R., 1984], mientras que en *Drosophila melanogaster* resultados negativos fueron reportados por Foureman & col. [1994] en la prueba de mutación letal recesiva ligada al sexo.

Por otro lado, pruebas de mutación *in vitro* en mamíferos realizadas en diferentes líneas celulares han reportado hiper-recombinación de ADN causada tanto por HQ como por 1,4-benzoquinona [Winn, L. M., 2003], además de mutación génica, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, y aumento en la frecuencia de células micronucleadas con variabilidad en el porcentaje de MN con cinetocoro positivo [McGregor & col., 1988a; 1988b; Galloway & col., 1987; Antoccia & col., 1991; Seelbach & col., 1993; Tsutsui & col., 1997]. Particularmente en cultivos de células humanas *in vitro*, se ha reportado que la HQ induce rupturas en la cadena del ADN [Anderson & col., 1995; Hiraku and Kawanishi, 1996] e intercambio de cromátidas hermanas [Morimoto & Wolff, 1980; Erexson & col., 1985]. No obstante, resultados variables se han obtenido en linfocitos humanos al evaluar aberraciones cromosómicas [van Delft and de Vogel, 1997; Eastmond & col., 1994] y MN [Yager & col., 1990; Vian & col., 1995; Doepker & col., 2000].

En cuanto a estudios de mutagenicidad *in vivo* en mamíferos, se ha reportado que la HQ no induce intercambio de cromátidas hermanas [Pacchierotti & col., 1991], sin embargo, si promueve aberraciones cromosómicas [Xu & Adler, 1990; Marrazinni & col., 1994b] y MN en células de médula ósea de ratones tratados *in vivo* (Tabla 8). Además, en estos estudios se reportó que la HQ puede producir MN a través de dos mecanismos, por pérdida de cromosomas enteros o a través de fragmentos cromosómicos, observados como MN con cinetocoro positivo y negativo, respectivamente. La pérdida de cromosomas enteros está relacionada con inhibición de la polimerización de la proteína tubulina, mientras que los fragmentos cromosómicos están relacionados directamente con daño al ADN causado por especies reactivas de oxígeno (ROS), formación de aductos de ADN vía benzoquinona o semiquinona, o por inhibición de enzimas envueltas en el metabolismo del ácido nucleico [DeCaprio A. P., 1999].

Incluso, estudios de mutagenicidad *in vivo* reportaron aberraciones cromosómicas como rupturas cromosómicas, cromosomas dicéntricos y completa fragmentación cromosómica en espermatozoides y células de médula ósea de ratón [Leopardi & col., 1993, DeCaprio A. P., 1999]. No obstante, la mayoría de lo reportado con HQ fue realizado por administración vía intraperitoneal. En administración vía oral, existen pocos estudios publicados, una de ellos reportó que la HQ no produce una respuesta significativa en el ensayo de mutación letal dominante en ratas Sprague-Dawley [Krasavage, W. J., 1984], mientras que los otros estudios que evaluaron MN, reportaron que la HQ administrada al 0.8% en la dieta de ratones Swiss CD-1 durante 6 días consecutivos, no provoca ningún efecto en la frecuencia de células micronucleadas de médula ósea [O'Donogue & col., 1999], en tanto que una sola dosis de 80 mg/kg peso de HQ en la misma cepa de ratones, da una respuesta significativa pero débil en el ensayo de MN en médula ósea [Ciranni & col., 1988]. Sin embargo, un ensayo realizado recientemente en ratas Wistar, reportó que dos administraciones consecutivas de 50 mg/kg peso de HQ aumentan significativamente la frecuencia de MN en eritrocitos inmaduros de sangre periférica [Montero & col., 2016]. Cabe destacar que la mayoría de los ensayos de MN *in vitro* en donde se evaluó al compuesto HQ reportaron resultados positivos, mientras que se ha observado que la respuesta *in vivo* dependen altamente de la vía de administración, a pesar de ello, un gran número de estudios han reportado resultados positivos por administración vía oral, subcutánea e intraperitoneal en el ensayo de MN en médula ósea de ratón [DeCaprio A. P., 1999].

En resumen, los estudios de genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* reportados hasta la fecha con el compuesto HQ, han proporcionado resultados positivos en diferentes líneas celulares y modelos animales para efectos clastogénicos, aneugénicos y mitóticos, que se vieron reflejados a través de aberraciones cromosómicas, mitosis anormal, formación de MN, aneuploidía, rompimiento de la cadena del ADN e intercambio de cromátidas hermanas. Estos efectos se relacionan principalmente a la oxidación de la HQ a benzoquinona y semiquinona, metabolitos altamente reactivos que promueven la producción de ROS [DeCaprio A. P., 1999]. Particularmente en médula ósea, la oxidación de HQ a benzoquinona es mediada por la alta actividad enzimática de mieloperoxidasas presentes en macrófagos ubicados en este tejido, lo cual promueve una alta tasa de formación de metabolitos reactivos y por ende una mayor toxicidad [MAK Value Documentation, 1998; Gokden & Lazzarotto, 2012].

Tabla 8. Ensayo de micronúcleos *in vivo* en mamíferos: estudios reportados con el compuesto HQ.

Tipo celular y modelo animal	Resultado ¹	Tiempo de Muestreo ²	Dosis y vía de administración ³	Referencia
PCE de médula ósea de ratón NMRI	+	24 h	50 sc x 6	Tunek & col., 1982
PCE de médula ósea de ratón Swiss CD-1	+	18 h	80 ip x 1	Ciranni & col., 1988
	+	24 h		
	-	42 h		
	-	48 h		
PCE de médula ósea de ratón Swiss CD-1	(+)	18 h	80 po x 1	Ciranni & col., 1988
	-	24 h		
	(+)	42 h		
PCE de médula ósea de ratón (101/E1 x C3H/E1)F ₁	(+)	48 h	75 ip x 1	Adler & Kliesch, 1990
	-	24 h		
	-	6 h		
	+	24 h		
	+	18 h		
	+	24 h		
	+	30 h		
PCE de médula ósea de ratón Swiss CD-1	-	24 h	30 ip x 1	Barale & col., 1990
	(+)	18 h	50 ip x 1	
	+	24 h	80 ip x 1	
PCE de médula ósea de ratón (102/E1 x C3H/E1)F ₁	+	24 h	50 ip x 1	Adler & col., 1991
	-	48 h		
	-	6 h	80 ip x 1	
	+	24 h		
PCE de médula ósea de ratón (102/E1 x C3H/E1)F ₁	+	24 h	100 ip x 1	Miller & col., 1991
PCE de médula ósea de ratón (C57BL/Cnc x C3H/C)F ₁	-	18 h	40 ip x 1	Pacchierotti & col., 1991
	+	24 h		
	+	18 h	80 ip x 1	
	+	24 h		
	-	18 h	120 ip x 1	
+	24 h			
PCE de médula ósea de ratón Swiss CD-1	+	18 h	20 ip x 1 40 ip x 1 60 ip x 1	Marrazzini & col., 1994a
PCE de médula ósea de ratón Swiss CD-1	+	18 h	80 ip x 1	Marrazzini & col., 1994b
	-	24 h		
	-	42 h		
	-	48 h		

(Continúa en la siguiente página)

Tipo celular y modelo animal	Resultado ¹	Tiempo de Muestreo ²	Dosis y vía de administración ³	Referencia
PCE de médula ósea de ratón Swiss CD-1	+	24 h	60 ip x 3	Chen & Eastmond, 1995
PCE de sangre periférica ⁴ de ratón (102/E1 x C3H/E1)F ₁	-	24 h	12.5 ip x 1	Grawe & col. 1997a; 1997b
		40 h		
		48 h		
		72 h		
	+	24 h	25 ip x 1	
		40 h		
		48 h		
		72 h		
	+	24 h	50 ip x 1	
		40 h		
		48 h		
		72 h		
-	24 h	75 ip x 1		
	40 h			
	48 h			
	72 h			
PCE de médula ósea de ratón Swiss CD-1	-	24 h	0.8% en la dieta x 6 (1152 mg/kg/día)	O'Donoghue & col., 1999
RET de sangre periférica ⁴ de ratas Wistar	+	24 h	50 po x 2	Montero & col., 2016

¹ Signo + positivo, signo (+) ligeramente positivo, signo - negativo.

² Tiempo en el que se realizó la toma de muestra posterior a la última administración del compuesto.

³ Dosis de HQ administrada en mg/kg peso; vía de administración intraperitoneal (ip), oral (po) o subcutánea (sc); número de administraciones (x1, x2, x3, x6) en días consecutivos.

⁴ Evaluación realizada a través de citometría de flujo.

ANEXO C

▪ Reactivos y preparación de soluciones

Reactivos

- Anticuerpo anti-rat- CD61 acoplado al fluorocromo PE obtenido de BioLegend® B197459
- Anticuerpo anti-rat-CD71 acoplado al fluorocromo PE-CY7 obtenido de BioLegend® B198700
- Colorante Hoechst 33342 obtenido de Sigma, Lot. #074M4008V
- Colorante Naranja de tiazol obtenido de Sigma, Lot. #MKBL5381V
- EDTA obtenido de Invitrogen, Lot. 1137951
- Heparina (5000U/ml) obtenida de Laboratorios PiSA, Lot. C15N419
- Hidroquinona obtenida de Sigma, Lot. #BCBG9149V
- Metanol obtenido de Burdick & Jackson®, Lot. DR943
- NaCl obtenido de J.T. Baker, Lot. M47C56
- NaHCO₃ obtenido de Gibco BRL, Lot.1068434
- NaN₃ obtenido de Sigma, Lot. 107F-0568
- Suero Fetal Bovino (SFB) obtenido de Byproducts, Lot. FBS15001

Soluciones

- Buffer de Bicarbonato Salino (BBS):
1 litro de agua destilada { + 9 g de NaCl
+ 444 mg de NaHCO₃
+ 584 mg EDTA
+ 200 mg NaN₃

- Mezcla de anticuerpos:
(Para 1 muestra) { + 2µl de anti-rat-CD71-PE-CY7
+ 1µl de anti-rat- CD61-PE
+ 72µl de BBS al 1% de SFB

- Mezcla de colorantes:
(Para 12 muestra) { + 25 ml BBS
+ 5 µl Naranja de tiazol
+ 19 µl de Hoechst 33342

ANEXO D

▪ Compensación previa de detectores del citómetro Attune Acoustic Focusing Azul-Violeta para el ensayo de micronúcleos en RET de sangre periférica

Previo a cada adquisición, se realizó la compensación adecuada para cada detector debido a la cercanía de las longitudes de onda de los fluorocromos que se emplearon para identificar MN-RET. La compensación se realizó con 5 controles, los cuales correspondieron a un control sin teñir (Fig. 14) y un control teñido para cada fluorocromo empleado: Naranja de tiazol, Hoechst 33342, CD61-PE y CD71-PE-Cy7 (Fig. 15). Cada control de tinción (incluyendo el control sin teñir) pasó por el mismo proceso que el resto de las muestras, con la excepción que solo se agregaba el fluorocromo correspondiente al control de tinción establecido, mientras que el volumen del resto de los fluorocromos era compensado con BBS o BBS al 1% de SFB dependiendo el caso.

La compensación del control sin teñir permitió fijar las regiones a partir de las cuales las células se consideraron negativas a cada fluorocromo, ajustando los voltajes y umbrales de detección para delimitar el área de la gráfica en donde se ubicaron estas células (alrededor del valor logarítmico 10^3).

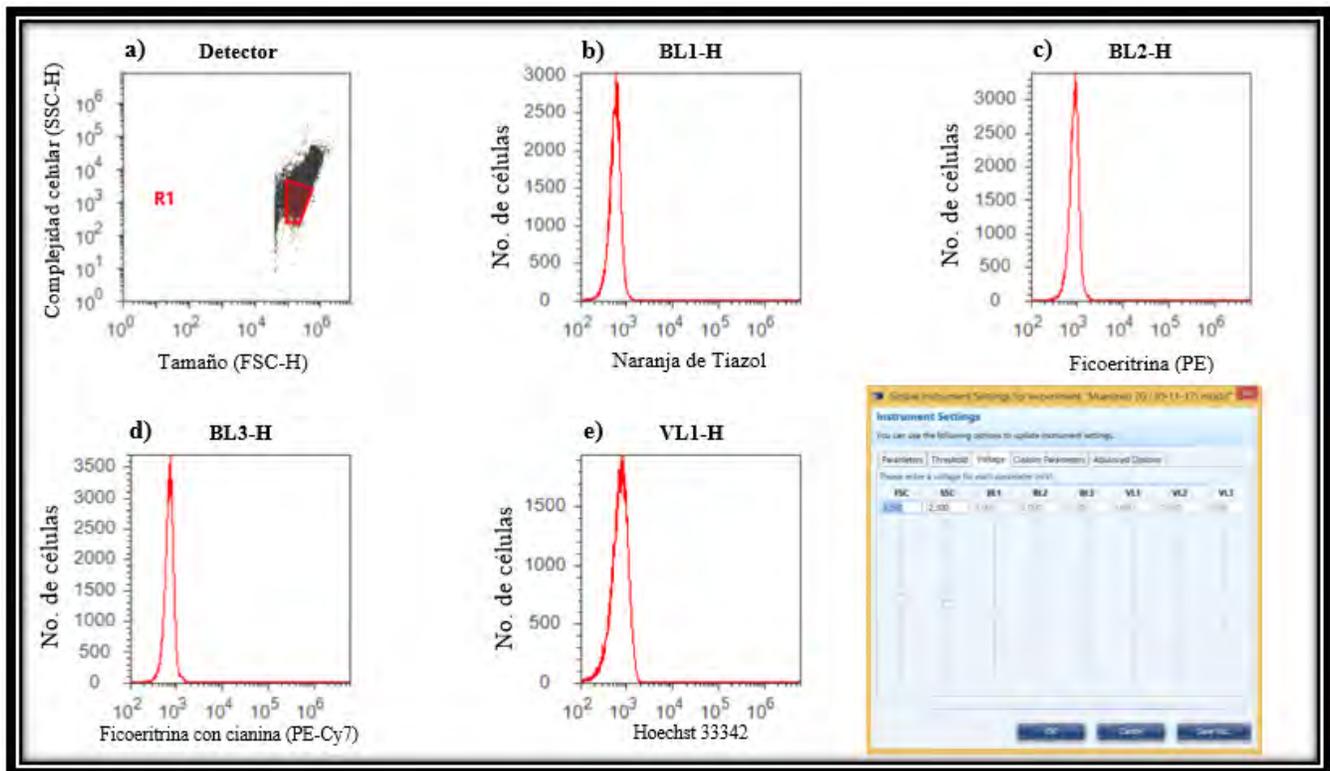


Fig. 14. Compensación: control sin teñir

Se representan gráficas de un control sin teñir en donde se contrasta, el tamaño con respecto a la complejidad celular (a), lo cual permitió seleccionar a la subpoblación de eritrocitos (compuerta R1) que fue evaluada para delimitar las regiones negativas a cada fluorocromo empleado en el ensayo de MN. El resto de las gráficas representan estos fluorocromos empleados y su delimitación negativa: naranja de tiazol (b), CD61-PE (c), CD71-PE-Cy7 (d), y Hoechst 33342 (e). Cada gráfica se ajustó a través de voltaje para ubicar a las células sin teñir (negativas al fluorocromo utilizado) en la región logarítmica 10^3 .

Las regiones consideradas positivas (R2) a cada fluorocromo se establecieron de acuerdo a diferentes criterios, para naranja de tiazol (BL1-H) y CD71-PE-Cy7 (BL3-H) el límite de cada región positiva o compuerta (R2) se consideró siempre en el valor logarítmico 10^6 , mientras que su inicio se basó en la delimitación clara entre los dos grupos de datos observados. Por su parte, las regiones consideradas positivas para CD61-PE (BL2-H) y Hoechst 33342 (VL1-H) se establecieron a partir del final del primer grupo de datos observados y hasta el valor logarítmico 10^7 . Finalmente, la compensación determinada a través de estas compuertas se utilizó en cada muestra evaluada para evitar el traslape entre las longitudes de onda de los fluorocromo empleados en este estudio.

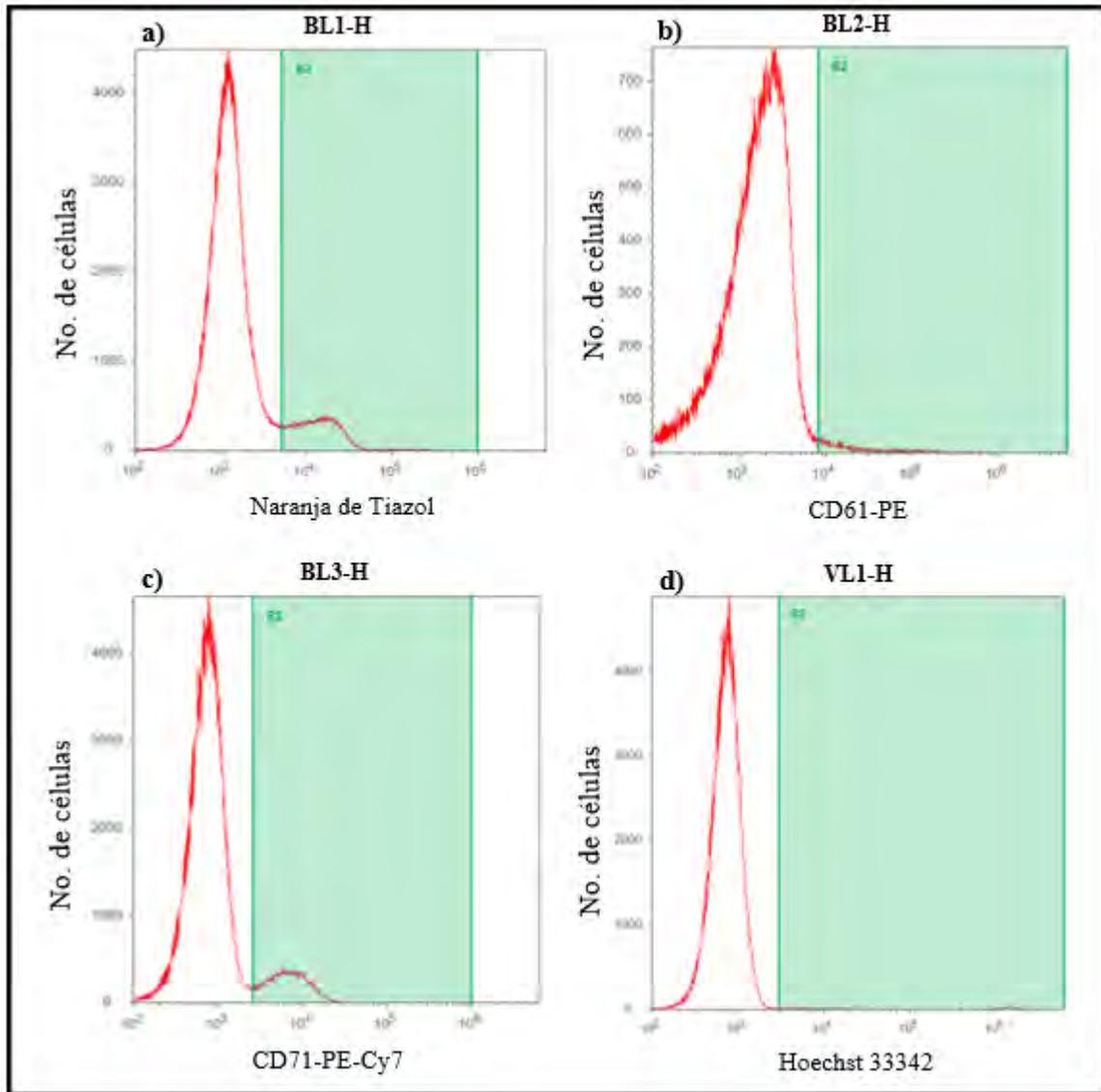


Fig. 15. Compensación: controles positivos para cada fluorocromo empleado

Se muestran las gráficas correspondientes a los controles positivos (R2) para cada fluorocromo empleado en la identificación de reticulocitos micronucleados. **a)** R2 corresponde a células positivas a naranja de tiazol cuantificadas a partir del detector BL1-H, **b)** R2 corresponde a células positivas a CD61-PE cuantificadas a partir del detector BL2-H, **c)** R2 corresponde a células positivas a CD71-PE-Cy7 cuantificadas a partir del detector BL3-H, **d)** R2 corresponde a células positivas a Hoechst 33342 cuantificadas a partir del detector VL1-H.