



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LAS TINTAS PARA
TATUAJE MEDIANTE PRUEBAS CITOGÉNÉTICAS *IN VIVO* (ENSAYO
DE MICRONÚCLEOS EN RATONES MACHOS CEPAS CD-1) E *IN
VITRO* (PRUEBA DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS
ESTRUCTURALES EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS)**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

NORBERTO ALARCÓN HERRERA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. SAÚL FLORES MAYA, FES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARTÍNEZ GARCÍA MARTHA, FES IZTACALA. UNAM.

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO, C.C.A, UNAM

DRA. DÍAZ BARRIGA ARCEO SANDRA, FES CUAUTITLÁN, UNAM.

CD. MX. ENERO, 2019.



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.

OFICIO CPCB/1141/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de octubre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ALARCON HERRERA NORBERTO** con número de cuenta 308025200, con la tesis titulada "**Determinación del efecto genotóxico de las tintas para tatuaje mediante pruebas citogenéticas *in vivo* (ensayo de micronúcleos en ratones machos cepas CD-1) e *in vitro* (prueba de aberraciones cromosómicas estructurales en cultivo de linfocitos humanos)**", realizada bajo la dirección del **DR. SAUL FLORES MAYA**:

Presidente: DR. ELIAS PIEDRA IBARRA
Vocal: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
Secretario: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
Suplente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
Suplente: M en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de noviembre de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de mi preparación profesional durante mis estudios de maestría.

Al programa de becas del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización del presente trabajo (CVU: 778963).

A los integrantes del Comité tutorial:

Al Dr. Saúl Flores Maya por su apoyo incondicional, MUCHÍSIMAS GRACIAS por permitirme formar parte de su equipo y confiar en mí.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por todo el apoyo brindado, sin usted este proyecto no habría podido llevar acabo. GRACIAS INFINITAS. Es una gran persona.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por todo el tiempo que le brindo al presente trabajo, sus aportaciones y disposición siempre serán agradecidas.

A la Dra. Martha Martínez García por las aportaciones realizadas al presente trabajo las cuales fueron esenciales desde un inicio. Muchas gracias.

Gracias a mis sinodales, por tomarse el tiempo de revisar el presente trabajo.

Dr. Elías Piedra Ibarra, quién desde licenciatura me ha guiado, por sus comentarios que permitieron darle una mejor forma al presente trabajo.

Dra. Ana María García Bores por su paciencia para revisarlo y aportar comentarios que le dieron mucho mayor solidez al trabajo.

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray, con quién he tenido la oportunidad de colaborar en diferentes proyectos, muchas gracias por sus aportaciones al trabajo y a mi persona.

M. en C. Irma Elena Dueñas García por sus comentarios tan acertados que permitieron el enriquecimiento del presente trabajo.

ARADECIMIENTOS

A mi madre María Elena, ancestra, gracias por todo tu apoyo y muestras de amor que a lo largo de mi vida me has brindado. Te amo y siempre estaré orgulloso de la mamá que me ha tocado. No tengo como agradecerte todo el apoyo y soporte que me has dado. Sabes muy bien que fueron dos años nada fáciles y sin tu presencia esto hubiera sido mucho más caótico. Gracias por todas las enseñanzas de vida que día con día mi brindas, por escucharme, hacerme reír. Sin duda alguna me ha tocado la mejor madre del mundo, espero nunca perdamos la confianza que nos tenemos y sin saber que nos deparé la vida en un futuro nunca perdamos ese lazo tan fuerte y honesto. Este logro es de los dos, ¡¡¡GRACIAS POR TODO MAMÁ!!!

A mi hermana Luz, mi negrita consentida, gracias por siempre ser un motivo de alegría en mi vida. Me siento orgulloso de la hermana que tengo y espero que veas que sí yo puedo tú también. Sabes que siempre contarás con todo mi apoyo y amor. Sin duda alguna, estos dos años que no fueron nada fáciles no hubieran sido lo mismo sin tu cariño pues, aunque no lo sepas hubo momentos donde me sacabas la risa que tanto necesitaba.

HERMANA TE AMO Y ESTOY ORGULLOS DE TI.

A una persona que me pidió no escribir sobre ella, pero aun así lo haré, no hay necesidad de nombres. ¡¡¡GRACIAS POR TODO!!! Como me dijiste, no estuviste en todo el proceso, pero si en la parte mas importante. Nunca me arrepentiré de que hayas llegado a mi vida. Apareciste de repente y lo cambiaste todo (me ayudaste a recuperar eso que ya había perdido, ¿cómo se llama?... felicidad), siempre estaré agradecido contigo pues me has hecho vivir una de las etapas más lindas de toda mi existencia. Gracias por permitirme conocerte a ti, a tu familia, a tu estado, ¡¡ufff!!! no sabes la alegría de pensar en cada aventura que hemos vivido.

Me siento orgulloso de ti y sabes que siempre estaré ahí de alguna u otra forma.

No sabemos que nos deparé el futuro, pero lo que sí sé es que ya grabaste tu nombre en mi alma.

No tengo nada más que expresar, todo lo demás he tenido la fortuna de decírtelo viéndote a los ojos, tus grandes ojos.

*MI VIDA SE VOLVIÓ OTRA DESDE QUE LLEGASTE, AHORA TIENE SENTIDO.
TE QUIERO.*

A mi familia: Martita y Nene, por ser mis mamás y siempre brindarme su amor, las quiero mucho. Papá Lupitos gracias por cuidarme desde chiquito, hacer el nacimiento siempre será mi máximo recuerdo. A Paola gracias por siempre apoyarme y ayudarme eres una gran persona, nunca dejes de ser noble. A mi prima Rosita que me cuidaba desde pequeño. A todas las nenas de la casa, son tremendas pero siempre me sacan una sonrisa.

Dr. Saúl, GRACIAS por todo su apoyo. Le guardo un gran afecto y estima. Gracias por siempre aconsejarme y confiar en mí. Su amistad es una de las cosas más valiosas que he obtenido en todo mi andar académico. Siga siendo igual de genial.

Dra. Sandra Gómez Arroyo, GRACIAS por todo su apoyo ya que sin el mi proyecto no hubiera podido ser llevado a cabo. La confianza que usted ha depositado en mí me hace sentir una gran persona. He conocido a muchos doctores, maestros, biólogos, etc, pero pocos con ese amor por la ciencia como usted.

Miss Denisse, GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS. Más que volverte mi Miss te has convertido en una persona muy importante en mi vida. Una de las cosas más geniales que conseguí estudiando la maestría fue tu amistad. No tengo como agradecerte todo tu apoyo, paciencia y enseñanzas. Gracias por todos los consejos, risas, machucones, zapes que me has dado. Eres un ejemplo a seguir, me siento orgulloso de decir que tú eres mi Sensei. Sabes que siempre contarás con mi amistad y espero yo contar con la tuya.

A todos los chicos del lab: Amigo Javs, Paola, Zeltzin, Sandra, Susana, Gabs, amigo Pablo, y muchos, muchos más. Gracias por aceptar a un intruso y brindarle su amistad. Son excelentes personas. En especial a Vicky, la reina del laboratorio, gracias por todo tu apoyo, siempre lo he dicho, sin ti, no somos nada. Eres una gran persona.

A los AVRA: Juanma, Edgar y Juan. Chicos, aunque quizás nunca lean esto, gracias por su amistad. Me siento orgulloso de lo que somos capaces de lograr juntos.

Gracias a todos los que han estado en este viaje...

*DEDICADO A MI MADRE,
MI HERMANA
Y
A LA OJITOS GRANDES.*

*JAMÁS CLAUDIQUES
Y ROMPE TUS MIEDOS...*

Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Marco Teórico.....	5
Tatuajes: Epidemiología.....	5
Las tintas para tatuaje: composición.....	6
Tintas para tatuaje: toxicología y regulación.....	9
Pruebas para detección de genotoxicidad.....	12
Pruebas <i>in vivo</i> : Ensayo de micronúcleos.....	13
Prueba de micronúcleos en ratón.....	16
Eritrocitos policromáticos.....	18
Sistema retículo endotelial: papel del bazo.....	19
Pruebas <i>in vitro</i> : aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos.....	20
Bandeo G.....	21
Aberraciones cromosómicas.....	23
Antecedentes.....	25
Justificación.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivo General.....	27
Objetivos Particulares.....	27
Material y Método.....	28
Extracción de Pigmentos.....	28
Ensayo de micronúcleos.....	28
Prueba de aberraciones cromosómicas.....	30
Resultados.....	33
Ensayo de micronúcleos en ratón CD-1.....	33
Toxicidad (Gráficas en anexo I).....	33
Genotoxicidad (Gráficas en anexo I).....	35

Aberraciones cromosómicas (Gráficas en anexo I)	37
Índice mitótico.....	37
Aberraciones cromosómicas	38
Discusión.....	39
Conclusiones.....	42
Referencias	43
Anexo I. Resultados.	52

“Determinación del efecto genotóxico de las tintas para tatuaje mediante pruebas citogenéticas *in vivo* (ensayo de micronúcleos en ratones machos cepas CD-1) e *in vitro* (prueba de aberraciones cromosómicas estructurales en cultivo de linfocitos humanos)”

Resumen.

Este estudio se considera un precedente que se enfoca en aportar alguna respuesta sobre la relación genotóxica de las tintas usadas en el arte del tatuaje. Este trabajo establece la siguiente hipótesis: si las tintas utilizadas para tatuar contienen componentes químicos como mercurio, cadmio, plomo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc., a los cuales se les ha atribuido cierto grado de citogenotoxicidad para la salud humana, entonces su aplicación en cultivo de linfocitos humanos y en células de sangre periférica de ratón macho cepa CD-1 producirán un efecto genotóxico. El ensayo de micronúcleos se realizó exponiendo a los ratones a dosis de extractos de pigmento negro y blanco de 30, 60 y 90 mg/kg en una sola ocasión vía subcutánea y durante los siguientes cinco días se obtuvieron las muestras de sangre para efectuar los conteos necesarios y obtener el índice de genotoxicidad y toxicidad. Por otro lado, para la prueba de aberraciones cromosómicas se expusieron linfocitos de humano en cultivo celular a concentraciones de extracto de pigmento negro de 70, 100 y 130 mg/mL y de pigmento blanco de 10, 30 y 50 mg/mL. Después de la cosecha de las células en cultivo se procedió a realizar preparaciones para observación. Se analizaron 50 metafases para detectar daño genotóxico. También se efectuó un conteo de 1000 células (entre núcleos y metafases) para obtener el índice mitótico. Los resultados obtenidos señalan que los pigmentos de tintas tienen efectos citogenotóxicos en células sanguíneas de ratón CD1. Por otro lado, con excepción de la concentración de 10 mg/mL de pigmentos de tinta blanca ninguno de los demás tratamientos de ambas tintas produjo efectos genotóxicos en cultivo de linfocitos.

Abstract

This study is considered an antecedent that focuses on providing some answer on the genotoxic effect of the inks used in the art of tattooing. This work establishes the next hypothesis: if the inks used for tattooing contain chemical components such as mercury, cadmium, lead, polycyclic aromatic hydrocarbons, etc., which have been attributed a degree of toxicity to human health, then their application in human lymphocyte cells and peripheral blood cells of male mouse strain CD-1 will produce a genotoxic effect. The micronucleus test was performed exposing the mice to doses of black and white pigment extracts of 30, 60 and 90 mg / kg in a single occasion via subepidermal and during the following five days the blood samples were obtained to make the counts necessary and obtain the index of genotoxicity and toxicity. On the other hand, for the chromosomal aberration test, human lymphocytes in cell culture were exposed at concentrations of black pigment extract of 70, 100 and 130 mg /mL and of white pigment of 10, 30 and 50 mg / mL. After harvesting the cells in culture, preparations were made for observation. Fifty metaphases were analyzed to detect genotoxic damage. A count of 1000 cells (between nuclei and metaphases) was also performed to obtain the mitotic index. The results obtained indicate that the pigments of inks have cytogenotoxic effects in blood cells of mouse CD1. On the other hand, except for the concentration of 10 mg / mL of white ink pigments, none of the other treatments of both inks produced genotoxic effects in lymphocyte culture.

Introducción.

Las tintas para tatuaje son un producto líquido constituidas de varios pigmentos acompañados de otros ingredientes como adyuvantes, aglutinantes o solventes (Jacobsen *et al.*, 2012).

A pesar de que la mayoría de las tintas modernas contienen pigmentos orgánicos, los metales pesados siguen siendo altamente utilizados, ya sea como cromóforos, aditivos de sombreado o contaminantes. Titanio, bario, aluminio y cobre son los principales elementos utilizados en tintas comerciales, mientras que antimonio, arsénico, cadmio, cromo, cobalto, plomo tienden a ser contaminantes. Inclusive algunos óxidos metálicos (óxido de aluminio, óxido de titanio) se añaden como nanopartículas con la intención de crear diversos efectos sobre las tintas. Sin embargo, su destino y sus efectos sobre el cuerpo humano siguen siendo inciertos (Forte *et al.*, 2009 A; Jacobsen *et al.*, 2012). Además, para algunos colores, como el negro, se ha determinado la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos los cuales ya han sido reportados como agentes capaces inducir efectos negativos sobre la salud (Resensburger *et al.*, 2010)

Hasta la fecha, no existe ningún tipo de regulación sobre la composición de las tintas de tatuaje. Inclusive la Food and Drug Administration (FDA) no ha aprobado ningún tipo de tinta para su uso en tatuajes y el Consejo Europeo en el 2003 hizo hincapié sobre la necesidad de regular este mercado (Baumler *et al.*, 2003). Al no existir una regulación sobre este tipo de productos se desconocen los posibles efectos genotóxicos que puede causar sobre la salud humana. El principal problema para establecer un veredicto es la falta de estudios químicos sobre su composición y evaluación de su toxicidad por su exposición tanto *in-vivo* como *in-vitro* (Wenzel *et al.*, 2013). La FDA ha establecido una batería de pruebas que deben realizarse para evaluar la genotoxicidad de cualquier alimento o droga la cual consta de: A) Pruebas de dosis agudas a corto plazo como la prueba de Ames; ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* en mamíferos; ensayo *in vitro* de mutación de genes en

linfoma de ratón por timidina quinasa y el ensayo de inducción de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos; B) las dosis subcrónicas y C) las pruebas de dosis crónicas, que utilizan las mismas pruebas toxicológicas que los estudios a corto plazo pero varían el tiempo de exposición (FDA, 2007).

Considerando las pruebas *in vivo*, el ensayo de micronúcleos (MN) sobre eritrocitos de sangre periférica de ratones ha sido ampliamente utilizado para detectar agentes clastogénicos (rompimiento de cromosomas) y aneuploidógenos (que afectan el huso mitótico alterando el número cromosómico) mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosómicos que se rezagan en la mitosis, los cuales quedan fuera del núcleo y forman dichos MN (Flores *et al.*, 2013). El ensayo de MN tienen gran importancia debido a que se puede realizar simultáneamente con un estudio general toxicológico y permite la obtención de resultados de una forma relativamente rápida (Hayashi *et al.*, 2001). Por otro lado, se han establecido pruebas *in vitro* para detectar aberraciones cromosómicas, así como alteraciones en el índice mitótico (IM) siendo manejado en el modelo de cultivo de linfocitos humanos (Gómez Arroyo *et al.*, 1995; Calderón Segura *et al.*, 1999; Albertini *et al.*, 2000).

A pesar de que el uso de tatuajes se ha vuelto una práctica altamente popular, no están establecidos los posibles efectos genotóxicos de los pigmentos de las tintas para tatuaje. Dentro de la poca información que ha sido recabada por Peta *et al.* (2015) determinaron que específicamente para la tinta negra, los hidrocarburos aromáticos policíclicos son responsables solamente de un 0.06% del estrés oxidativo que se genera, de tal manera que la mayoría del daño generado es debido a compuestos no identificados.

Marco Teórico

Tatuajes: Epidemiología.

Los tatuajes pueden definirse como la introducción de pigmentos y colorantes exógenos a nivel dermis (capa intermedia de la piel la cual no renueva sus células garantizando que la tinta para tatuaje se mantenga) cuya finalidad es obtener un diseño permanente sobre la piel. Para esto, es necesario la utilización de una máquina creada por el artista/inventor estadounidense Samuel O'Reilly a fines de 1800 la cual mediante una aguja esterilizada penetra la piel aproximadamente de 50 a 3000 veces por minuto (Kluger, 2010; Ballén y Castillo, 2015).

En los últimos 20 años esta práctica ha incrementado de una forma increíble su popularidad tanto en mujeres como hombres de todo el mundo, pasando de ser algo que solía asociarse a presos, pandillas o subculturas específicas, a ser utilizados ahora por celebridades, deportistas, estudiantes, entre otros (Heywood *et al.*, 2012). La prevalencia y rango de edad de los individuos tatuados varía según la región. En Estados Unidos se estima que alrededor del 25 % de la población entre los 18-50 años poseen un tatuaje (Laumann y Derick, 2006) de los cuales el 29.6% son jóvenes universitarios, resaltando que esta práctica es más común en mujeres (King y Vidourek, 2013). Basándose en estudios epidemiológicos, en Europa se estiman 100 millones de adultos tatuados (aproximadamente el 10 % de la población) mientras que en Australia se calcula que el 14.5 % de la población posee un tatuaje siendo hombres quienes suelen tatuarse un poco más, pero ambos sexos dentro del rango de los 20 a los 39 años (Fig. 1) (Laumann, 2009; Klügl *et al.*, 2010; Heywood *et al.*, 2012; Kluger y Bäumlner, 2015) y para el caso de México según el CONAPRED uno de cada 10 habitantes posee un tatuaje, es decir, 12 millones de habitantes de los cuales la gran mayoría está por encima de los 20 años (Fig. 2) (CONAPRED, 2015).

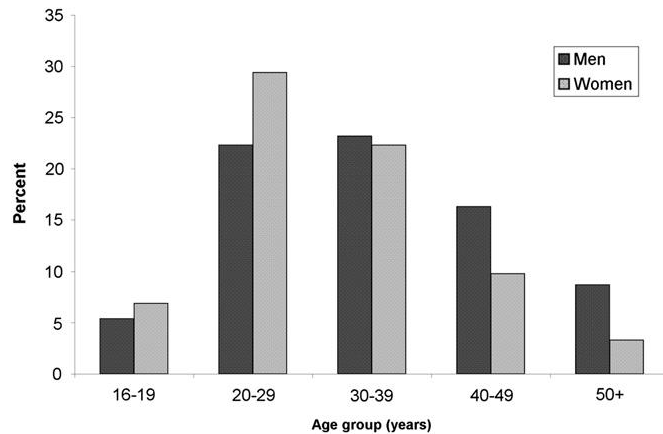


Fig. 1. Prevalencia de tatuajes por edad y sexo en Australia (Heywood *et al.*, 2012).

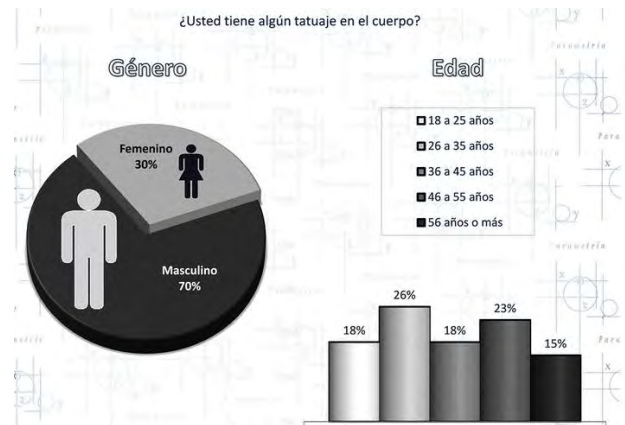


Fig. 2. Prevalencia de tatuajes por edad y sexo en México (Parametría.com.mx).

Las tintas para tatuaje: composición.

Las tintas para tatuaje son un producto líquido que contienen uno o más pigmentos que suelen ir acompañados de otros ingredientes en forma de adyuvantes, aglutinantes aditivos y solventes. Estas al término de su producción pueden llegar a tener tanto impurezas químicas como microbianas, las cuales pueden tener su origen por la materia prima utilizada o durante el proceso de manufactura (Jacobsen *et al.*, 2012).

Las tintas son una suspensión de partículas de pigmento en un medio acuoso con adición de isopropanol, el cual actúa como disolvente puesto que la mayoría de los pigmentos no son solubles en fluidos tisulares, agua o medios lipofílicos comunes. Estas partículas pueden tener un tamaño aproximado mayor a los 800 nm, pero en algunos casos (pigmentos negros) pueden ser de un tamaño menor a 100 nm siendo consideradas como nanopartículas (Hogsberg *et al.*, 2011).

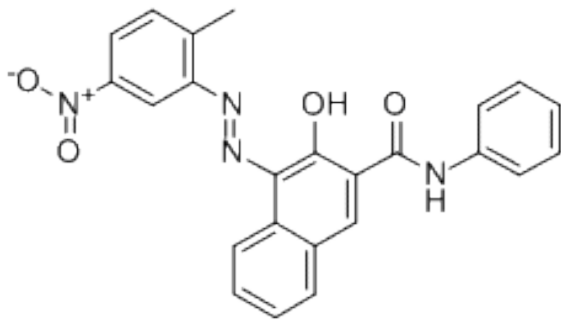
En los últimos 20 años la composición de las tintas ha cambiado, esto como consecuencia en los procesos de manufactura, investigación, legislación, entre otros. Actualmente, es menos probable que las tintas contengan algún tipo de sal inorgánica de metales como mercurio, cadmio y cobalto (Bäumler *et al.*, 2003). El

titanio, aluminio, oxígeno y carbono son ingredientes comunes de las tintas independientemente del color que se trate (Beute *et al.*, 2008; Forte *et al.*, 2009 B).

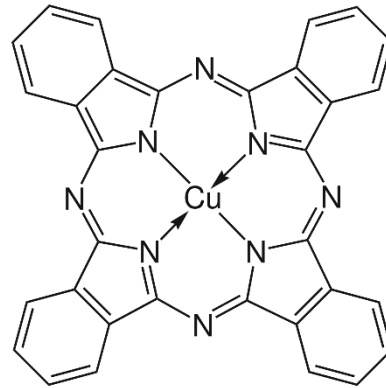
Desde un punto de vista químico, los pigmentos de las tintas para tatuaje pueden dividirse en dos grupos principales: colorantes orgánicos y colorantes inorgánicos sintéticos. Dentro de los pigmentos orgánicos encontramos el negro carbón, sustancias azo (tintas rojas, amarillas y verdes) y ftalocianinas (tintas azules, verdes y moradas).

Los colorantes azo son un término genérico para un grupo de colorantes, sintéticos u orgánicos, que tienen como característica principal la presencia del “grupo azo” el cual consiste en dos átomos de nitrógeno en el centro de una estructura molecular (ejemplo es el colorante rojo 22. Fig. 3 A). Además, del uso de colorantes azoicos en tatuajes, estos se encuentran presentes en una gran gama de productos como pinturas esmaltadas, colorantes de cuero o textiles y alimentos procesados. Las ftalocianinas es un término otorgado a un grupo, ya sea orgánico o sintético, de colorantes que pueden formar complejos con casi todos los elementos de la tabla periódica. Consisten en la unión de cuatro grupos isoindol mediante cuatro átomos de nitrógeno, donde el centro de la molécula puede coordinarse con algún átomo metálico dando lugar a diferentes derivados (un ejemplo es la ftalocianina de cobre Fig. 3 B) (Bäumler *et al.*, 2000).

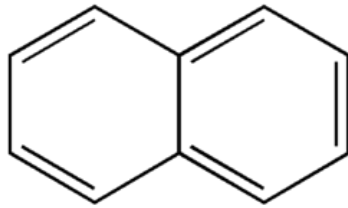
Aunque la mayoría de las tintas para tatuaje modernas contienen pigmentos orgánicos, los metales pesados siguen estando presentes de forma predominante. El color del pigmento suele estar condicionado por el estado de cristalización de la sal metálica. Los pigmentos inorgánicos más usados suelen ser negro carbón (negro), óxido de hierro (rojo, negro y café), dióxido de titanio (blanco), sulfuro de cadmio (amarillo), sulfuro de mercurio (cinabrio y marrón rojizo), óxido de mercurio (amarillo, naranja y rojo) y óxido crómico (verde) (Forte *et al.*, 2009 B).



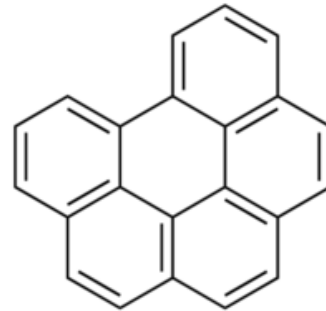
A. Rojo 22



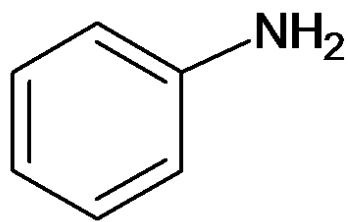
B. Ftalocianina de cobre



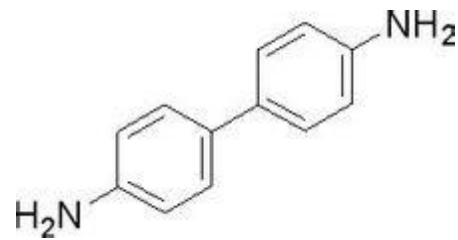
C. Naftaleno



D. Benzo [g, h, i] perileno



E. Anilina



F. Bencidina

Fig. 3. Estructura de algunos compuestos presentes en las tintas para tatuaje.

Las tintas suelen contener otros adyuvantes como agentes aglutinantes como el sulfato de bario; aditivos que se unen débilmente al pigmento para modificar un poco sus propiedades; y conservadores. También suele agregarse glicerina con la finalidad de lograr condiciones de manejo adecuadas (Jacobsen *et al.*, 2012).

El producto final de las tintas puede contener impurezas químicas las cuales pueden provenir de la materia prima o del proceso de manufactura, siendo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y las aminas aromáticas primarias (AAP) las impurezas más frecuentemente. Mediante estudios de cromatografía líquida de alto rendimiento y análisis de espectrometría de masas en 19 tintas para tatuaje negras se detectó la presencia de HAP a concentraciones de 0.14-201 μ g/g de tinta (Regensburger *et al.*, 2010).

Los HAP conforman una familia de compuestos químicos que se caracterizan por contener dos o más anillos de benceno unidos entre sí. Son producto de combustiones incompletas de combustibles fósiles, madera, carbón y tabaco (Vázquez *et al.*, 2016). Algunos estudios químicos han detectado como mínimo la presencia de seis HAP en tintas negras dentro los que se destacan el naftaleno (carcinógeno humano) (Fig.3 C), pireno, fluoranteno, benzo [g, h, i] perileno (Fig.3 D), acenaftileno, y fenantreno. La cantidad de HAP presentes en la tinta para tatuaje puede variar según las diferentes marcas (Peta *et al.*, 2015).

Por otro lado, las AAP es un término otorgado a un tipo de compuestos donde el grupo amino primario (NH₂) está unido a un anillo de benceno. Algunos ejemplos pueden ser la anilina (Fig. 3 E) u otras AAP más complejas como la bencidina (Fig. 3 F). Los colorantes azoicos pueden liberar AAP a través de descomposición química (Laux *et al.*, 2016).

Tintas para tatuaje: toxicología y regulación.

Hasta la fecha, la composición química precisa que deben tener las tintas para tatuaje no está regulada. Organizaciones internacionales como la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos, no ha autorizado ninguna tinta para su uso en tatuajes. Fue hasta el 2003 cuando el Consejo Europeo mostró interés por

regularizar este mercado. Algunos países como Francia han legislado que como mínimo cada manufacturera brinde la composición precisa de la tinta que están produciendo, mientras que en Alemania la utilización de pigmentos azoicos los cuales pueden llegar a ser considerados peligroso es ilegal (Kluger y Koljonen, 2012). Para el caso de México, únicamente, mediante un comunicado del Diario Oficial de la Federación sobre el reglamento de control sanitario de productos y servicios, se señala que para el caso de tatuajes las tintas deberán ser biocompatibles con el cuerpo (DOF, 2018).

Estudios sobre tintas en el mercado europeo han mostrado que la mayoría de sus componentes son pigmentos azoicos o compuestos policíclicos. Sobre los colorantes orgánicos identificados el 60 % son compuestos azoicos, de los cuales algunos de ellos están clasificados como carcinogénicos, entre estos: anisidina, 3,3' diclorobenzidina, nitro-o-toludina (Bäumler *et al.*, 2003).

Las tintas para tatuaje no han sido evaluadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, sin embargo, algunos de sus componentes ya han sido clasificados. Mercurio, sulfato de cobalto, otras sales de cobalto y negro carbón se clasifican dentro del Grupo 2B (posibles carcinógenos para los humanos), mientras que el cadmio y otros derivados de este se clasifican en el Grupo 1 (carcinógenos humanos). Subproductos, no presentes de forma inicial en la tinta, pueden generarse por exposiciones a luz ultravioleta y algunos de ellos se sabe son carcinógenos en modelos animales: 4-clorotoluidina, 5-nitrotoluidina, 2-metil-5-nitroanilina, 4-nitrotolueno, 2,5-dicloroanilina y 1,4-diclorobenceno (Vasold *et al.*, 2004).

Estudios sobre la composición química de tintas negras han detectado la presencia de HAP los cuales algunos pueden ser posiblemente clasificados como carcinógenos, mutagénicos o generadores de especies reactivas de oxígeno bajo irradiación ultravioleta, sin embargo, se desconoce si estos HAP presentes en la tinta negra contribuyen al riesgo carcinogénico de individuos tatuados

(Resensburger *et al.*, 2010). Además, en la tinta negra se han encontrado otros compuestos como dibutilftalato, hexacloro-1,3-butadieno, dibenzofurano, benzofenona, 9-fluorenona y metenamina, siendo algunos de estos genotóxicos, citotóxicos o generadores de especies reactivas de oxígeno bajo exposición a luz (Hogsberg *et al.*, 2011).

Para el caso de algunos metales estos han sido encontrados en las tintas para tatuaje en concentraciones por encima de las recomendadas por el Consejo Europeo: níquel, cromo, cobre, bario, plomo, cadmio y zinc. Cabe considerar que las tintas al ser mezclas complejas pueden contener no solo un compuesto si no conformarse por varios de ellos (Forte *et al.*, 2009 A; Jacobsen *et al.*, 2012). Algunos de estos metales como el cadmio, cromo y níquel han sido clasificados según la IARC dentro del Grupo 1 (carcinógenos humanos), pero no se ha demostrado una relación directa con el desarrollo de cáncer en personas tatuadas. De igual forma, el plomo ha sido clasificado según la IARC dentro del grupo 2A (probables carcinógenos humanos).

Se deben tomar medidas internacionales de forma urgente para asegurar que las tintas para tatuaje no representan un producto de riesgo para la salud humana. Es necesario conocer de forma exacta la composición de las tintas para tatuaje y diseñar experimentos con los cuales se pueda evaluar el riesgo que pueden llegar a presentar (Laux *et al.*, 2016).

La mayoría de la investigación realizada sobre las tintas para tatuaje esta dirigida a determinar la composición química de las mismas, con la finalidad de recabar información sobre las sustancias potencialmente peligrosas para el ser humano. Aunque dicha información varía según la marca y colores comúnmente los componentes suelen rebasar los límites establecidos (Jacobsen *et al.*, 2012).

Muchos de los componentes de las tintas para tatuaje representan un riesgo para la salud, siendo considerados como genotóxicos. Sin embargo, sin la realización de estudios tanto *in-vitro* como *in-vivo* no se puede determinar con exactitud el peligro que estos representan (Laux *et al.*, 2016).

Pruebas para detección de genotoxicidad

El potencial genotóxico de cualquier compuesto puede evaluarse mediante diferentes pruebas tanto citogenéticas, moleculares o toxicológicas (Plant, 2003). Dentro del área de la toxicología genética existen muchas pruebas de genotoxicidad, como lo son (FDA, 2007):

- Prueba de Ames, la cual permite detectar daño por sustituciones, adiciones y deleciones de algunos pares de bases del ADN utilizando como modelo biológico bacterias como *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*
- Ensayo *in vitro* de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos humanos
- Prueba SMART en *Drosophila melanogaster*, que permite detectar mutaciones y recombinaciones somáticas.
- Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de ratón, para evaluar efectos clastogénicos y aneuploidogénicos

Pruebas *in vivo*: Ensayo de micronúcleos.

La presencia de micronúcleos (MN) en cualquier tipo celular es un indicativo de pérdida de material genético, ya que los MN son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal los cuales se formaron por clastogénesis o por aneugénesis, es decir, cromosomas que sufren un rezago anafásico (Fig. 4). Lo anterior conduce a la aparición de un pequeño núcleo en algunas células que puede ser anucleadas (como los eritrocitos) o bien en el citoplasma de células nucleadas como linfocitos o espermatogonias (Mavournin *et al.*, 1990)

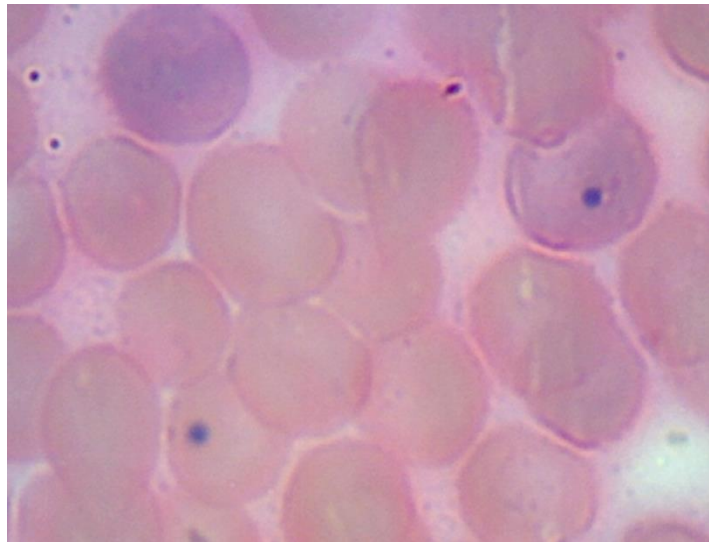


Fig. 4. Micronúcleos inducidos por cicloheximida en sangre periférica de ratón. Tinción Hematoxilina-eosina (Foto tomada por Norberto Alarcón Herrera, 2013)

El fundamento de la técnica se basa en el siguiente principio: en células en anafase, fragmentos de cromosomas que no poseen centrómero o este se haya inactivado, no podrán integrarse al núcleo principal puesto que carecen del carácter primario de orientación en el huso mitótico. Esto mismo ocurre cuando el huso mitótico esta dañado o hay algún rezago anafásico (Fig. 5). Terminada la telofase, los

cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómero darán origen al núcleo de las células hijas, mientras que los elementos rezagados quedan inmersos en el citoplasma de las células hijas y un considerable número de estos fragmentos se convierten en núcleos secundarios, que por regla serán de una talla menor al núcleo principal, de ahí el nombre de MN (Schmid, 1975).

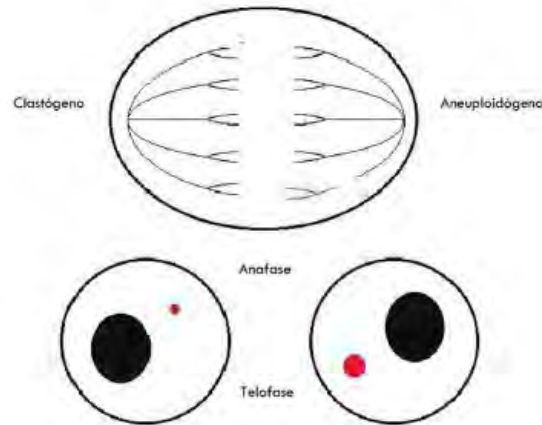


Fig. 5. Esquema sobre la formación de micronúcleos.

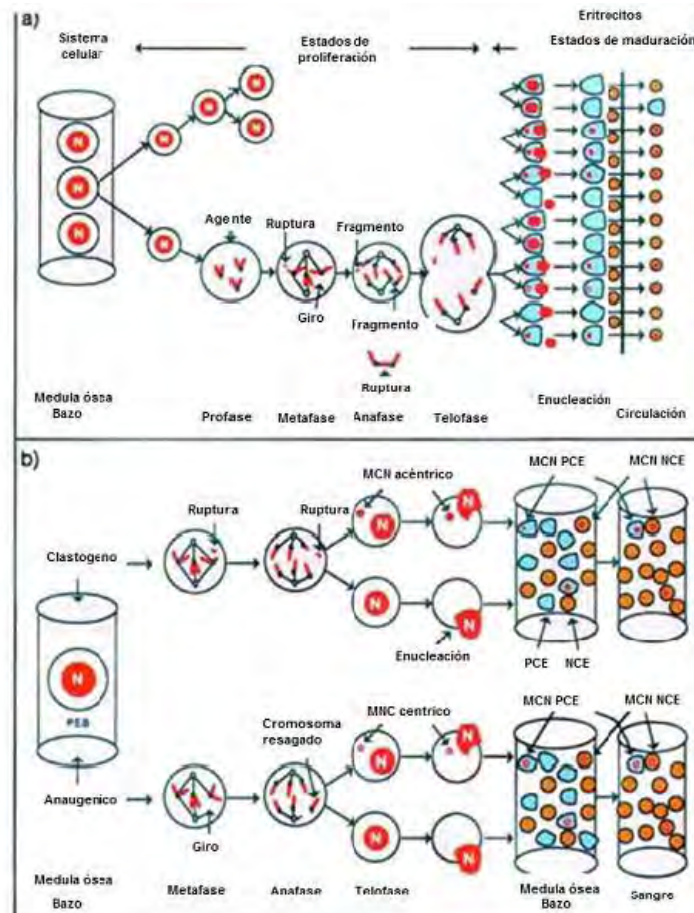
La presencia de MN se ha reconocido desde hace muchos años y ha estado asociada con un daño cromosómico desde los primeros trabajos con radiación. Evans *et al.*, (1959), utilizaron por primera vez a los MN como marcadores de daño genético. Ellos utilizaron en ensayo de inducción de MN para cuantificar el daño genotóxico inducido por neutrones y rayos gama en presencia y ausencia de oxígeno (*cit in MacGregor et al.*, 1990).

Hacia la década de los 60 Schmid y colaboradores; así como Heddle en los 70 realizaron estudios para determinar qué parámetros considerar en la evaluación de la genotoxicidad en médula ósea *in vivo*. Concluyeron que la presencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) es un buen indicador de daño y logaron que se estableciera como una prueba para evaluar el daño citogenético (Fig. 6) (Schmid, 1975).

Algunas ventajas del ensayo de MN son: no es necesario conocer el cariotipo del modelo biológico, así como ser de rápido y fácil manejo. Además, esta prueba citogenética se puede realizar tanto de forma *in vivo* como *in vitro* en una gran variedad de especies (humano, ratón, rata, entre otros), así como tejidos (eritrocitos, células germinales, cultivo de linfocitos, células de mucosa bucal). La condición esencial para poder llevar a cabo este ensayo es que el tejido que se utilice este en constante proliferación (Hayashi, *et al.*, 2001).

Hayashi *et al.*, propusieron la sangre periférica como un tejido apto para realizar el ensayo de micronúcleos puesto que aporta ciertas ventajas al estudio: permite la obtención de una curva de tiempo-repuesta, evaluar los sistemas de reparación del organismo de forma indirecta y permite realizar estudios crónicos e inclusive llevarlos a siguientes generaciones (Hayashi *et al.*, 2000).

Fig. 6. Mecanismos de formación de micronúcleos inducidos por agentes clastogénicos (Krishna y Hayashi, 2000).



Prueba de micronúcleos en ratón.

Para el ensayo de micronúcleos, independientemente cual sea el modelo biológico que se ocupe, es necesario conocer ciertos aspectos esenciales como lo son: su ciclo eritropoyético y condiciones de su sistema retículo endotelial. Para ratón, MacGregor *et al.*, (1990), establecieron que el tiempo de vida de un eritrocito es de aproximadamente 30 días, que su ciclo celular dura alrededor de 12 a 20 h, el tiempo que ocurre desde la división hasta la enucleación es alrededor de seis horas y el tiempo en que los eritrocitos policromáticos (EP) son liberados en la médula ósea es de 24h. Todo lo anterior cobra relevancia al momento de realizar el diseño experimental, ya sea si son tratamientos agudos, crónicos o semicrónicos. Para el caso de estudios crónicos es recomendable incluir el análisis de los eritrocitos normocromáticos (MacGregor *et al.*, 1990).

Eritropoyesis

El eritrocito, hematíe o glóbulo rojo es una célula anucleada (no tiene núcleo) transportadora de hemoglobina (Hb), que es necesaria para incrementar la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. Se considera que ciertas influencias micro ambientales inducen a la célula madre hematopoyética pluripotencial para convertirse en la progenie eritroide diferenciada. Diferentes sistemas de cultivo han demostrado que los progenitores eritroides tienen diferente potencial proliferativo. Los progenitores eritroides más primitivos son denominados unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E), las cuales mantienen una alta tasa de proliferación en respuesta a citocinas (IL-3) y a la eritropoyetina. Estas células darán origen a los progenitores eritroides maduros, denominados Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU), dichas células tienen un potencial proliferativo limitado, aunque para su división no es indispensable la eritropoyetina (Mayani *et al.*, 2007).

Las CFU darán origen a los pronormoblastos o proeritoblastos, que son las primeras células morfológicamente diferenciables. Aumentan dos veces su tamaño (20-25µm), contienen un gran núcleo de cromatina laxa, con uno o dos nucléolos evidentes. Tienen citoplasma basófilo ya que presentan polirribosomas, además de vesículas de clatrina. El proeritoblasto tiene 4-8 divisiones mitóticas y da lugar a dos normoblastos basófilos o eritoblastos basófilos. Estas células presentan un tamaño menor (18-20 µm). Tienen un núcleo redondo de tamaño menor, con cromatina laxa y condensada. Siguen mostrando dos nucléolos, además del citoplasma basófilo, pero menos intensificado, frecuentemente tiene un halo pálido alrededor del núcleo. Después de la mitosis del normoblasto basófilo se da lugar a una policromasia en la célula debido a la producción de Hb, por lo que a las células hijas se les denomina normoblastos policromáticos o eritoblastos policromatófilos. Son células más pequeñas (15-18 µm) con un núcleo de cromatina condensada donde no se pueden observar los nucléolos. Presentan un citoplasma con mezcla de colores basófilos y eosinófilos. Son las primeras células que ya han sintetizado hemoglobina y que aún presentan polirribosomas. Por medio de dos divisiones mitóticas dan lugar al eritoblasto normocromático el cual mide entre 12-15 µm, con el núcleo más pequeño, redondo y excéntrico. El citoplasma es eosinófilo debido a la hemoglobina.

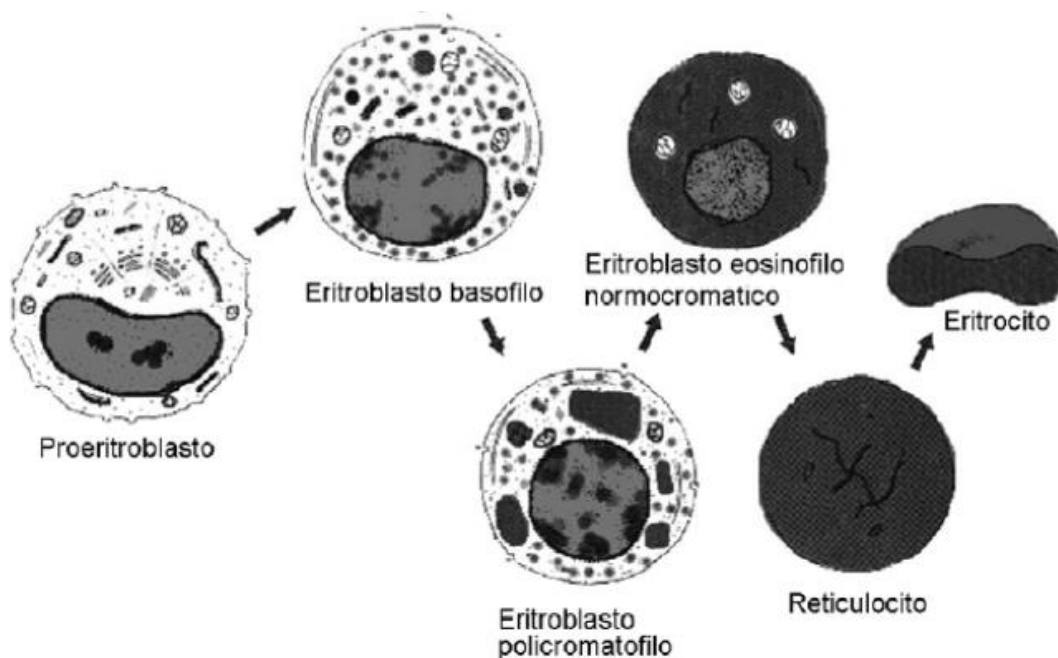


Fig. 7. Esquemas sobre las diferentes etapas de maduración celular en la eritropoyesis (Mayani *et al.*, 2007).

El eritroblasto normocromático se desglosa: mediante movimientos ondulantes el núcleo es expulsado y es fagocitado por el siderocito, mientras que el resto de la célula recibe el nombre de reticulocito (Fig. 7) (Henry, 1993).

El reticulocito mide entre 9 y 10 micras y es anucleado. En ellos aún se sintetiza Hb por lo que presentan una coloración policromática, ya que además contienen ribosomas residuales, mitocondrias y otros orgánulos que son eliminados hasta la maduración eritrocitaria. Pueden salir a la circulación (1%) a terminar su proceso de diferenciación en un periodo de 24 a 48 h. Si se quedan en la médula ósea terminarán allí su maduración y originarán el eritrocito de unas 7.5 micras de diámetro (Mayani *et al.* 2007).

En roedores adultos, los órganos hematopoyéticos son la médula ósea y el bazo, los cuales contienen las células principales de la eritropoyesis en estado de proliferación y maduración. Durante la proliferación las células continuarán dividiéndose, si en este momento se administra algún xenobiótico éste puede actuar y causar daño cromosómico, generando clastogénesis, translocaciones, o puede interactuar con macromoléculas relacionadas con la función de disyunción de la cromátida. Durante la maduración del eritroblasto pueden llegar a generarse eritrocitos policromáticos donde el núcleo principal ha sido expulsado y cualquier micronúcleo formado puede llegar a permanecer en alguna parte del citoplasma. Con la maduración del reticulocito perderá RNA y contendrá primordialmente Hb, convirtiéndose en un eritrocito normocromático (Krishna y Hayashi, 2000).

Eritrocitos policromáticos

El evaluar la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos se debe a que son células jóvenes (reticulocitos) que han sido recientemente liberados a la circulación que aún contienen RNA, así como parte del aparato ribosómico lo cual nos permite identificarlos claramente por medio de tinción y a que se puede detectar de forma muy fácil la presencia de micronúcleos debido a que son células

anucleadas. Los eritrocitos policromáticos presentan una coloración mezclada entre basófila y eosinófila que cambiará dependiendo el estado de madurez de la célula. Generalmente son de un tamaño mayor que los eritrocitos normocromáticos y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de la hemoglobinización total del protoplasma (Hayashi *et al.*, 2000). El aumento en su proporción con respecto a los valores estándar indica una eritropoyesis aumentada, y de forma contraria si hay un descenso en su valor es indicativo de una inhibición en la proliferación celular (MacGreror *et al.*, 1990).

El número de eritrocitos policromáticos en circulación generalmente suele ser muy bajo, en humanos representa del 2-4%, sin embargo, cuando existe un aumento considerable se pueden llegar a tener alteraciones como casos de anemia graves, eritropoyesis aumentada por pérdida celular causada por hemorragias. En el ensayo de micronúcleos el aumento o descenso en los valores estándar puede deberse al efecto citotóxico del xenobiótico (Velasco, 2011).

La eritropoyetina (EPO) actúa como una de las principales citocinas reguladoras de la eritropoyesis. La principal función de la EPO es controlar la producción de las células eritroides a través de la promoción de la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en la médula ósea. Es importante destacar que además de EPO, citocinas como Interleucina 3 (IL-3), la tromboyetina (TPO), el ligando de tirosina fetal 3 (FLT-3L) y el factor de células seminales (SCF) participan también en la eritropoyesis; estas citocinas son capaces de sinergizar la diferenciación celular con la EPO (Mayani *et al.*, 2007).

Sistema retículo endotelial: papel del bazo.

El sistema retículo endotelial tiene la función de eliminar a los eritrocitos viejos y los que presenten alteraciones (incluidos los micronúcleos), ya que filtra la sangre y los elimina mediante células fagocíticas (Bañales, 2009).

Existen especies que tienen sistema retículo endotelial con alta eficiencia para eliminar a los eritrocitos anormales. Esto dificulta la posibilidad de observar eritrocitos policromáticos micronucleados en sangre periférica. El sistema retículo endotelial puede ver afectada su actividad en relación con la madurez que tenga el organismo (Zúñiga *et al.*, 2001).

Pruebas *in vitro*: aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos.

La finalidad de la prueba de aberraciones cromosómicas *in vitro* es identificar todo tipo de agentes que pueden provocarlas, ya sean estructurales o numéricas en células cultivadas de mamífero (Evans, 1976; Galloway *et al.*, 1987). Las aberraciones cromosómicas y sus implicaciones suelen ser la causa de muchas enfermedades genéticas humanas. Además, hay evidencia sustancial que estas pueden provocar alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumor lo cual podría conducir al desarrollo de cáncer en el humano y animales de experimentación (OECD, 2013).

El principio de la técnica es el siguiente: En cultivos celulares ya sea de origen humano y otro mamífero, los cuales han sido activados para su proliferación en presencia de un mitógeno, están expuestos a la sustancia a evaluar con y sin una fuente exógena de activación metabólica (a menos que se utilicen células con una capacidad metabolizadora adecuada). A intervalos predeterminados según el diseño experimental, los cultivos se exponen a una sustancia capaz de detener las metafases (colchicina o colcemida), se cosecha, y realiza tinción (varía según lo que se pretende evaluar) finalmente las células en metafase se analizan al microscopio para detectar la presencia de aberraciones cromosómicas ((OECD, 2013).

En la prueba de aberraciones cromosómicas *in vitro* se pueden emplear cultivos de líneas celulares o cultivos de células primarias ya sean de origen humano o de roedor. Sin embargo, por razones bioéticas es preferible el uso de células primarias de origen humano (células sanguíneas). Las células a utilizar se seleccionan

considerando la capacidad de su crecimiento en cultivo, la estabilidad del cariotipo, la diversidad cromosómica y la frecuencia espontánea de aberraciones cromosómicas (Lorge *et al.*, 2016).

Algunas consideraciones para tomar en cuenta es que en pruebas realizadas de forma *in vitro* comúnmente se requiere el uso de alguna fuente exógena de activación metabólica como la fracción microsomal S9 (aunque esto puede variar según el diseño experimental). Cabe considerar que este sistema de activación no imita por completo las condiciones *in vivo*. También debe de tenerse cuidado en evitar factores que pueden genera3 un falso positivo (daño cromosómico que no es causado por la sustancia en evaluación). Dichos factores pueden ser cambios de pH, interacción con componentes del medio o una citotoxicidad excesiva (Long *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 1991).

En la prueba de aberraciones cromosómicas también es necesario determinar la citotoxicidad para poder evaluar de forma adecuada la muerte y crecimiento celular. La evaluación de la citotoxicidad puede ser una prueba inicial muy útil para determinar de mejor manera las concentraciones que se utilizarán en el ensayo principal. Para linfocitos en cultivos primarios suele utilizarse el índice mitótico (IM) a pesar de ser una medida indirecta de efecto citotóxico/citostático es aceptable puesto que otras medidas de citotoxicidad pueden llegar a ser engorrosas e imprácticas (Galloway *et al.*, 1994).

Bandeo G

Los 23 pares de cromosomas que conforman el genoma humano pueden ser identificados a nivel citológico con ayuda de diversas técnicas de tinción (Fig. 8). El descubrimiento de las técnicas de bandeo cromosómico ha permitido un progreso en el área de la citogenética ya que, al poder obtener imágenes reproducibles de la existencia de estructura cromosómicas transversales (bandas) a lo largo de los cromosomas, ha sido posible contar con una herramienta de identificación de cada

cromosoma humano. Además, la utilización de esta metodología ha permitido identificar con total certeza los puntos de fractura observados en la mayoría de los reordenamientos estructurales y así determinar que cromosomas están involucrados en dichas aberraciones. La gran estabilidad estructural de las bandas en los cromosomas es tan alta que, cualquier cambio inducido o espontáneo ocurrido, se expresa como una mutación no deseada la cual, en el humano, o se elimina por muerte del individuo, o impide su reproducción o da origen a una enfermedad hereditaria (Drets, 2002).

La técnica de bandeo G se emplea de forma rutinaria para el análisis de aberraciones cromosómicas. La técnica consiste en exponer a los cultivos de linfocitos a una digestión enzimática con tripsina y posteriormente a una tinción con Giemsa, lo cual permite la obtención de bandas claras y oscuras. Las bandas positivas (más oscuras) son regiones del cromosoma más ricas en A-T puesto que son bases más resistentes a la digestión de la tripsina. El patrón de bandeo es diferente para cada cromosoma y el grado de resolución dependerá del procedimiento empleado (Gallego, 2011).

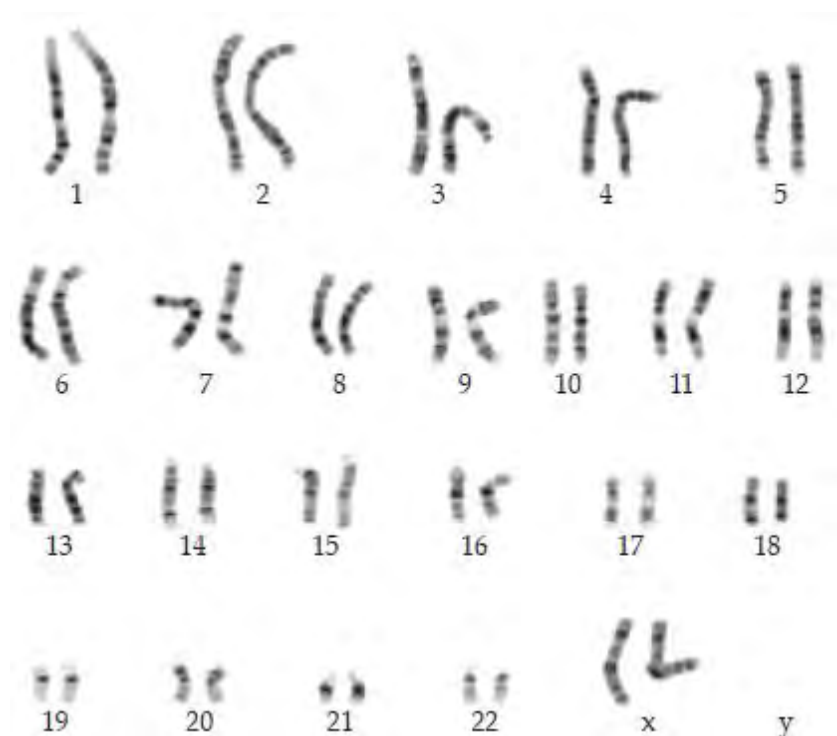


Fig. 8. Cariotipo femenino normal mediante bandeo G por técnica estándar Gallego, 2011

Aberraciones cromosómicas

Las mutaciones se clasifican en dos tipos: 1) mutaciones puntuales, que se basan en la alteración de un par de nucleótidos, y 2) las aberraciones cromosómicas: modificaciones que generan cambios cromosomales que involucran miles de millones de nucleótidos. Estas últimas variaciones pueden ser de dos tipos: alteraciones numéricas y estructurales. Las numéricas pueden originarse por el resultado de un fenómeno denominado no disyunción o no separación cromosómica (se presenta cuando uno de los cromosomas, junto con su homólogo, pasan al mismo polo o se incorporan a la misma célula), por un rezago anafásico en la migración de los cromosomas hacia los polos celulares (estos dos fenómenos pueden originarse en alguna de las dos divisiones meióticas, o presentarse en la división mitótica) y por el cambio en el número de cromosomas, lo que implica la repetición de varios sets o conjuntos haploides de cromosomas (Maloy y Hughes, 2013).

Si los cambios generados en los cromosomas llevan a la presencia de un número que es múltiplo exacto del número haploide, se denomina euploidia, pero cuando sólo uno o algunos cromosomas se ven involucrados, a la alteración se le llama aneuploidía. Las aneuploidías en gametos o embriones son más conocidas por su relación con el origen de malformaciones congénitas en el nacimiento, como las trisomías en recién nacidos, cuando hay un cromosoma adicional como el caso del Síndrome de Down (21, 47, XY o XX,+21), las monosomías que se dan por la falta de un cromosoma como en el Síndrome de Turner (45X), las dobles trisomías, que es cuando se encuentran dos cromosomas adicionales de distinto par como en personas con tres cromosomas X y Síndrome de Down (48XXX,+21) y las Tetrasomías o presencia de dos cromosomas adicionales del mismo par como en el Síndrome de Klinefelter (48XXXY). Si la no separación cromosómica se genera en una etapa temprana de la mitosis, después de la formación del cigoto (falla postcigótica), durante la formación de las primeras blastómeras, se originan los mosaicos o mixoploidías, donde el organismo tendrá dos o más líneas celulares

siendo una normal y la otra u otras se encontrarán afectadas en su número cromosómico. Es importante señalar que no todas las líneas celulares que se forman son viables, ya que algunas pueden llegar a quedar sin la información genética necesaria para seguir multiplicándose y desaparecen (Salamanca, 1988).

Las alteraciones estructurales son provocadas por agentes clastogénicos (tanto de naturaleza física, química o biológica), los cuales provocan la fractura o rompimiento del cromosoma. Existen mecanismos de reparación celular que tratan de reparar el daño, pero puede que llegue a ser tan grave o que los mecanismos no son tan eficientes y se produzcan dichas alteraciones (Velasco, 2011).

Dentro de las alteraciones intracromosómicas se encuentran las deleciones, inversiones, anillos, etc. Las deleciones se dan cuando un segmento del cromosoma se pierde, éstas pueden ser terminales o intercalares, si la deleción ocurre en los dos extremos del cromosoma, la porción que porta el centrómero une sus extremos rotos y forma una estructura circular o cromosoma en anillo. Las inversiones se generan cuando un segmento cromosómico rota 180° sobre sí mismo y se coloca nuevamente en el cromosoma, y por ende la secuencia de genes queda alterada. La inversión puede ser paracéntrica, si el segmento que se invirtió no incluye el centrómero, o pericéntrica si el centrómero queda incluido. Por otro lado, dentro de las aberraciones intracromosómicas se tienen las translocaciones simples, recíprocas y robertsoniana (Luca y Seoane, 2008).

Antecedentes

- Peta *et al.*, en el 2015, mediante estudios enfocados a evaluar la citotoxicidad, genotoxicidad y vías de respuestas al estrés oxidante de las tintas para tatuaje determinaron que todas las tintas estudiadas, extraídas con hexano, causaron efectos en todos los bioensayos, siendo la tinta roja y amarilla las que indujeron mayor genotoxicidad y estrés oxidante.

Por otro lado, el análisis químico de la tinta negra reveló la presencia de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos: naftaleno (carcinógeno humano), pireno, fluoranteno, benzo [g, h, i] perileno, acenaftileno, y fenantreno. Todos ellos presentes en concentraciones dos veces superiores a los niveles recomendados. Los HAP detectados solo explicaron el 0.06% de la respuesta al estrés oxidativo de la tinta negra para tatuar, por lo que la mayoría del efecto tuvo que ser causado por componentes no identificados.

- Hogsberg *et al.*, 2013, determinaron si las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por las tintas de tatuaje tenían una relación con la composición química del pigmento, propiedades físico-químicas de las partículas de la tinta y el contenido de aditivos químicos.

Determinaron que dos tintas negras (de diferente marca) produjeron grandes cantidades de ROS (mediante ensayo de diclorofluoresceína). Donde los radicales peroxilo conformaban el 72% de los radicales libres generados, mientras que los hidroxilo y el H₂O₂ representaban menos del 14% y 16% respectivamente.

Diez de las 11 tintas negras evaluadas tenían concentraciones de HAP que excedían los niveles recomendados por el Consejo Europeo y las 11 excedieron el nivel recomendado para benzo (a) pireno.

Justificación

En años recientes, tatuarse se ha vuelto una actividad altamente popular en muchos países tanto para hombres como mujeres. Un estudio realizado en Australia señala como la cantidad de adultos que han tenido tatuajes alguna vez en su vida incrementó del 10.1% al 14.5% en un periodo aproximado de 7 años (Heywood *et al.*, 2012; Braithwaite *et al.*, 2001; Deschesnes *et al.*, 2006). Para el caso específico de México una de cada 10 personas posee un tatuaje, es decir 12 millones, de las cuales la gran mayoría no sobrepasan los 20 años (CONAPRED, 2015). De igual forma que en México, en Estados Unidos los jóvenes tienen una mayor incidencia de tatuajes como lo señala un estudio con estudiantes universitarios de los cuales el 29.9% poseían algún tatuaje (King y Vidourek, 2013).

Además de las preocupaciones sobre la transmisión de enfermedades bacterianas y víricas que se generan en torno a la práctica de tatuajes, actualmente existe una creciente preocupación sobre la composición química de las tintas empleadas y sus posibles efectos adversos (Peta *et al.*, 2015). La mayoría de las tintas consisten prácticamente en pigmentos insolubles mezclados en agua, además de contener dispersantes, adyuvantes y conservadores (Beute *et al.*, 2008). Mientras que las tintas tradicionales contienen algún tipo de metal, los avances en química han generado un incremento en el uso de colorantes orgánicos como una alternativa en la producción de tintas (Laux *et al.*, 2016).

El proyecto tiene el siguiente planteamiento del problema: Si exponiendo ratones machos a las tintas para tatuaje con tratamientos agudos ¿Cuál de los colores de las tintas tendrá un mayor efecto genotóxico? De esta forma, los resultados publicados de esta investigación tendrán un impacto sobre la regulación en la fabricación química de las tintas y en la extrapolación de los efectos de estos pigmentos en la salud humana. Este antecedente quedará para futuros trabajos de investigación, que deberán ser atendidos inmediatamente, por ejemplo, en el análisis de los efectos genotóxicos en personas tatuadas en un 25 a un 100% de su superficie corporal.

Hipótesis

Si las tintas utilizadas para tatuar tienen una base química de compuestos como mercurio, cadmio, plomo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc., a los cuales se les ha atribuido cierto grado de citogenotoxicidad para la salud humana, entonces su aplicación en células de linfocitos humanos y en ratones macho cepa CD-1 producirán un efecto en el incremento de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica, respectivamente.

Objetivo General

- Determinar el efecto genotóxico de los pigmentos negro y blanco que son de uso común para tatuar la piel humana mediante en ensayo de micronúcleos en células de eritrocitos de ratón macho cepa CD-1 y la prueba de aberraciones cromosómicas estructurales en cultivos de linfocitos humanos.

Objetivos Particulares

- Obtener el índice de genotoxicidad y toxicidad según Hayashi *et al.* 2000, en ratones machos de la cepa CD-1.
- Analizar el efecto de los pigmentos negro y blanco sobre el índice mitótico de linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo.
- Evaluar la inducción de genotoxicidad de los pigmentos negro y blanco mediante la prueba de aberraciones cromosómicas estructurales con bandedo G en cultivo de linfocitos humanos.

Material y Método

Extracción de Pigmentos.

Frascos de tinta profesional negra y blanca marca Dragonhawk de 2 oz.

Ambos lotes obtenidos en Mercado libre México.

Los pigmentos se separaron de cada una de las tintas para tatuaje utilizando como solvente hexano de la manera siguiente: se mezclaron 2 mL de tinta en 2 mL de hexano y 1 mL de agua destilada, después se sonicaron en baño durante una hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm a 14°C durante 10 min. Terminada la centrifugación se recuperaron las tres fases y mediante evaporación se eliminaron los restos de solvente. Para ambos colorantes se prepararon soluciones stock con base a la cantidad de pigmento obtenido.

Ensayo de micronúcleos.

Material Biológico.

Se usaron ratones machos de la cepa CD-1 de 8 semanas de edad con un peso aproximado entre 25-30 g (siguiendo los criterios establecidos por Hayashi *et al.*, 2000). Los ratones fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM. Desde la aclimatación hasta el final del experimento los organismos se mantuvieron en condiciones de laboratorio a 21 ± 2 °C con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h, con acceso a alimento especial para ratones y agua *ad libitum*.

Diseño experimental.

Para determinar las dosis a utilizar se forman tres grupos con 6 ratones cada uno y así obtener la DL50. Al primero se le administró una dosis de 90 mg/kg, al segundo una dosis de 240 mg/kg y al último una de 500 mg/kg. Una vez obtenida la DL50

para los ensayos de genotoxicidad y toxicidad se procedió a administrar 1/8, 1/4 y 3/8 de la dosis seleccionada.

Se establecieron 9 lotes (marcando a los animales previamente) con cinco organismos machos. Los primeros lotes correspondieron a cada uno de los pigmentos negro y blanco extraídos de las tintas marca Dragonhawk con las siguientes dosis: tres lotes por pigmento, uno con dosis de 30 mg/kg, el segundo con dosis de 60 mg /kg y el último con dosis de 90 mg/kg. A dichos lotes se les administraron los pigmentos en una sola ocasión vía subcutánea. Los tres lotes restantes se distribuyeron de la siguiente manera: un testigo negativo al cual sólo se le proporcionó agua y el alimento especial para roedores; un testigo positivo al cual se le aplicó una sola ocasión 0.3 ml de Ifosfamida vía intraperitoneal con una dosis de 60 mg/Kg y finalmente otro testigo negativo con 0.3 mL con el vector (agua/etanol 3:1).

Posterior a la administración, se procedió a extraer sangre realizando una punción en la zona caudal de los ratones a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. La gota de sangre se colocó sobre una laminilla y se realizó un frotis (se elaboraron tres laminillas por ratón). Inmediatamente se fijaron las muestras con metanol. Las laminillas se sometieron a un tren de tinción de hematoxilina y eosina por 10 min.

Las células policromáticas y normocromáticas de la sangre periférica de los ratones se contabilizaron auxiliándose de un microscopio óptico Leica (100x) y posteriormente se fotografiaron utilizando una cámara digital Moticam acoplada a una computadora. Se contabilizaron un total de 2000 células entre policromáticas (CP) y normocromáticas (CN) y la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNCP) por ratón y por día.

Análisis estadístico.

Los índices de genotoxicidad (%) y toxicidad (%) se calcularon mediante el método propuesto por Hayashi *et al.* (2000). Para ambos índices se consideró un total de 1000 eritrocitos. Las fórmulas para calcular ambos índices son las siguientes:

% Toxicidad: $[\text{No de CP}/2000] \times 100$

% Genotoxicidad: $\% \text{ MN} = \text{No. de MN en CP} / 2000 \text{ células totales} \times 100.$

Los datos se organizaron en tablas. Por cada día de muestro se realizó una prueba paramétrica (ANOVA de un factor) con los datos individuales de cada lote experimental. Para los resultados globales se calculó ANOVA de un factor utilizando como datos individuales el promedio de cada lote experimental por día de muestreo. Además, en ambos casos se aplicó la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) si es que la prueba de ANOVA mostraba diferencias significativas.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa Minitab 16

Prueba de aberraciones cromosómicas

Obtención de sangre y preparación de soluciones.

Las muestras de sangre se obtuvieron de dos donadores hombres de 25 y 22 años. Los criterios de inclusión fueron: sin ningún tipo de enfermedad, bajo ningún tratamiento médico y ausencia de tatuajes.

Se prepararon soluciones stock para ambos extractos de los pigmentos a una concentración de 10mg/10mL, las cuales se disolvieron en agua/etanol con proporción 9:1.

Cultivo de linfocitos y tratamientos directos.

Para determinar las concentraciones por usar se realizaron ensayos preliminares de citotoxicidad a diferentes concentraciones calculando el índice mitótico, considerando para el resultado final aquellas donde hubiera una toxicidad menor al

20% y así evitar posibles sesgos. Para la tinta negra se realizaron cultivos con concentraciones desde los 50 hasta los 200 mg/mL y para la tinta blanca desde 1 hasta 100 mg/mL. En ambos casos las concentraciones aumentaban en 10 mg/mL por cada experimento.

A los frascos de cultivo se les agregó 5 mL de medio Biowest (RPMI 1640) con 0.1 µl de fitohematoglutina al 4% (Microlab) más 0.5 mL de sangre heparinizada de 2 donadores sanos. 48h después se adicionó por cultivo 100 µl con las siguientes concentraciones de pigmentos de tinta: negra 70, 100 y 130 mg/mL y blanca 10, 30 y 50 mg/mL, además, se designaron cultivos para un testigo negativo al cual únicamente se le adicionó la fitohematoglutina, un testigo negativo sometido a 100 µL de agua/etanol (9:1) y un testigo positivo tratado con 200 µL de bleomicina a una concentración de 13 µg/ml. 24 horas después se les aplicó 0.2 mL de colchicina al 0.05% (Sigma). Durante todo este proceso se incubaron a 37 °C y finalmente a las 72 horas realizó la cosecha.

Cosecha

Los tubos de cultivo se centrifugaron a 1500rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante e inmediatamente el botón se resuspendió con solución hipotónica a 37°C, dejándolo reposar durante 20 minutos en la incubadora. Transcurrido este tiempo se sacaron los tubos y se les agregó 1 mL de fijador Carnoy 3:1 frío (prefijación), se agitó por inversión y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Después se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió nuevamente con 10 mL de fijador Carnoy y agitó rápidamente por inversión (para no perder el botón por aglutinación). El paso anterior se repitió hasta completar tres lavados para después elaborar las laminillas las cuales fueron hechas por goteo a 1.0-1.5 metros de altura, realizando como mínimo tres, dejándolas secar al aire. Finalmente, las laminillas se procesaron para bandeado G (tren: tripsina/amortiguador libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺/ amortiguador libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺/Giemsa/Agua).

Evaluación de la genotoxicidad e índice mitótico.

Para el análisis de aberraciones cromosómicas, se utilizó la técnica de doble ciego para eliminar la tendencia subjetiva de correlacionar los resultados entre los grupos experimentales y los testigos. Una vez realizadas las tinciones se observaron por cultivo 50 metafases con un rango entre 44 a 47 cromosomas contabilizando las aberraciones cromosómicas detectadas.

El índice mitótico (IM) se determinó por medio del análisis de 1000 células estimuladas, células en interfase con grandes núcleos que se teñirán claramente ya que en las no estimuladas los núcleos son muy pequeños y presentan coloración azul muy intensa al ser observadas al microscopio consecutivas considerando la cantidad que se encontraron en mitosis (Husgafvel-Pursiainen, 1987). La fórmula para obtener el porcentaje del IM que se utilizó en el estudio fue $IM = \text{No. de metafases}/1000$ y $\%IM = IM \times 100$.

Análisis estadístico.

El mismo procedimiento estadístico se realizó para el ensayo de micronúcleos que consistió en ANOVA de un factor y una prueba a posteriori si es que era requerida.

Resultados

Extracción de pigmento

Considerando las tres fases: agua, hexano y disolventes de las tintas, se obtuvieron por cada 2 mL 100 mg de pigmento de tinta blanca y 45 mg de negro

Ensayo de micronúcleos en ratón CD-1

Se uso agua/etanol en una proporción de 3:1 como disolvente para ambos casos de los pigmentos. La concentración de la solución Stock del pigmento negro fue de 43 mg/mL y de 80 mg/mL para el pigmento blanco.

Toxicidad (Gráficas en anexo I)

El análisis estadístico se realizó por cada día de muestro (24, 48, 72, 96 y 120h) para evaluar el comportamiento tóxico de ambos pigmentos a dosis de 30, 60 y 90 mg/kg. Además, se evaluó si el medio agua-etanol donde se disolvieron los pigmentos también provocaba toxicidad (Fig. 9).

Para las 24 h se obtuvo un valor de $F_{obs}=3.66 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$, es decir, existen diferencias significativas con relación a la proporción de células policromáticas y normocromáticas. Mientras que la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que solamente el tratamiento con pigmento blanco de 60 mg/kg mostró dicha diferencia.

A las 48 h el valor de $F_{obs}=12.69 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$ también mostró diferencias significativas y mediante la prueba de Dunnett ($p < 0.05$) se observa que ambos extractos de pigmentos en sus tres dosis indujeron toxicidad con excepción del tratamiento de agua-etanol.

Para las 72 h el valor calculado fue de $F_{obs}=9.42 > F_{7,328}^{\alpha 0.05} = 2.313$, lo cual denotó que existen diferencias significativas entre las medias. Sin embargo, la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) demostró que las tres dosis de pigmentos blanco y los de pigmento negro con dosis de 60 y 90 mg/kg mostraban dichas diferencias.

A las 96 h el valor calculado fue de $F_{obs}=12.58 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$, demostrando que hubo diferencias significativas y mediante la comparación múltiple de Dunnett nuevamente todos los grupos expuestos a los pigmentos mostraban diferencia con respecto al testigo negativo (el grupo agua-etanol no mostró).

El último muestreo a las 120 h arrojó un valor de $F_{obs}=7.50 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$, indicando que existen diferencias significativas. Utilizando la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) se observó que otra vez todos los grupos expuestos a ambos pigmentos presentaron dicha diferencia en comparación con el testigo negativo.

Por último, se realizó un análisis estadístico contemplando los cinco días de muestreo para poder observar un resultado global (Fig. 10). De este modo los valores promedio del efecto toxicológico (Tabla 1) evaluados de manera global mostraron un valor calculado de $F_{obs} 6.46 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$, es decir, los valores promedio de los tratamientos presentaron diferencias significativas con relación a la proporción de células policromáticas y normocromáticas. La comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que todos los tratamientos empleado los pigmentos, excepto el grupo de agua-etanol, fueron los que mostraron diferencias significativas.

TABLA.1 Medias del porcentaje de toxicidad para cada tratamiento, evaluando con un conteo de 2000 células la proporción de eritrocitos policromáticos y normocromáticos en sangre periférica de ratón macho (*Mus musculus*) cepa CD-1. Diferencias significativa $p < 0.05$ en prueba de ANOVA de un factor y *comparación múltiple de Dunnett con respecto al testigo negativo.

Tratamiento	Toxicidad (Media)	Desv. Est.
Control Negativo	0.164	0.0502
Ifosfamida	0.92	0.5272
Agua-etanol	0.142	0.035
Pigmento negro 30 mg/kg	*0.544	0.132
Pigmento negro 60 mg/kg	*0.684	0.121
Pigmento negro 90 mg/kg	*0.808	0.178
Pigmento blanco 30 mg/kg	*0.564	0.235
Pigmento blanco 60 mg/kg	*0.616	0.168
Pigmento blanco 90 mg/kg	*0.622	0.230

Genotoxicidad (Gráficas en anexo I)

Se efectuó el mismo análisis estadístico que en la toxicidad, pero en este caso se evaluó el potencial genotóxico (inducción de micronúcleos) para ambos extractos de pigmento, de tal forma que los valores promedio por cada día de muestro mostraron lo siguiente:

A las 24h (Fig. 11) se obtuvo un valor de $F_{obs}=18.13 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$. Es decir, existen diferencias significativas en la presencia de células policromáticas micronucleadas con respecto al control negativo. La comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que solo los tratamientos de pigmento negro de 60 y 90 mg/kg son los que presentaron dicha diferencia significativa.

Para las 48h el valor fue de $F_{obs} 22.24 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$, indicando que existen diferencias estadísticamente significativas. Mediante Dunnett ($p < 0.05$) se puntualizó que todos los tratamientos con pigmentos, con excepción del grupo tratado solamente con agua-etanol, generaron una inducción de micronúcleos estadísticamente significativa con respecto al control negativo.

El análisis estadístico a las 72h arrojó un valor de $F_{obs}=19.88 > F_{7,32}^{\alpha 0.05}=2.313$, demostrando que existen diferencias significativas y mediante la comparación múltiple de Dunnett nuevamente todos los grupos expuestos a los pigmentos poseen diferencia significativa.

Para las 96h el valor obtenido fue $F_{obs}16.62 > F_{3,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$ lo cual indicó que existen diferencias estadísticamente significativas en las medias con respecto a la inducción de micronúcleos y por medio de la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) se obtuvo que al igual que las 48 y 72 h todos los tratamientos con los pigmentos generaron diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, a las 120h el análisis estadístico mostró un valor de $F_{obs} = 35.98 > F_{3,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$. Es decir, nuevamente se presentaron diferencias significativas. Por medio de la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) se observó que de igual forma a los días anteriores todos los tratamientos expuestos a los pigmentos provocaron un aumento estadísticamente significativo en la inducción de micronúcleos.

Como último análisis de la genotoxicidad se calculó ANOVA de un factor contemplando los primeros cinco días de muestreo para poder observar un resultado global (Fig.12). De este modo los valores promedio del efecto genotóxico (Tabla 2) evaluados de manera global mostraron un valor calculado de $F_{obs} = 11.19 > F_{7,32}^{\alpha 0.05} = 2.313$, confirmando diferencias estadísticas en la inducción micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratón. Mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) se observó que todos los tratamientos, exceptuando el grupo tratado con agua-etanol, produjeron dichas diferencias estadísticamente significativas.

TABLA.2 Medias del índice de genotoxicidad para cada tratamiento, evaluando la inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón (*Mus musculus*) cepa CD-1. Diferencias significativa $p < 0.05$ en prueba de ANOVA de un factor y *comparación múltiple de Dunnett.

Tratamiento	Genotoxicidad (Media)	Desv. Est.
Control Negativo	0.16	0.05
Ifosfamida	0.92	0.52
Agua-etanol	0.14	0.03
Pigmento negro 30 mg/kg	*0.54	0.13
Pigmento negro 60 mg/kg	*0.68	0.12
Pigmento negro 90 mg/kg	*0.80	0.17
Pigmento blanco 30 mg/kg	*0.56	0.23
Pigmento blanco 60 mg/kg	*0.61	0.16
Pigmento blanco 90 mg/kg	*0.62	0.23

Aberraciones cromosómicas (Gráficas en anexo I)

Índice mitótico

El índice mitótico se obtuvo para cada uno de los tratamientos, contemplado las muestras de ambos donadores (Tabla 3).

El análisis de ANOVA mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos donde la $F_{obs}=94.14 > F_{7,8}^{\alpha 0.05} = 3.50$. Mediante la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) indicó que los tratamientos que presentaron diferencias con respecto al testigo negativo fueron: los tres tratamientos de pigmentos de tinta negra y los tratamientos con pigmentos de tinta blanca con concentraciones de 30 y 50 mg/ml. Por lo anterior, podemos deducir que estos tratamientos están siendo citotóxicos (Fig. 15).

TABLA.3 Medias del índice mitótico para cada tratamiento, contabilizando la cantidad de células encontradas en mitosis. Diferencias significativa $p < 0.05$ en prueba de ANOVA de un factor y *comparación múltiple de Dunnett.

Tratamiento	Índice mitótico	Desv. Est.
Testigo negativo	17.35	0.35
Testigo positivo (bleomicina)	10.1	0.42
Agua/metanol	16.95	0.07
Pigmento negro 70 mg/mL	*15.95	0.49
Pigmento negro 100 mg/mL	*14.60	0.28
Pigmento negro 130 mg/mL	* 8.25	0.49
Pigmento blanco 10 mg/mL	16.60	0.42
Pigmento blanco 30 mg/mL	*15.80	0.56
Pigmento blanco 50 mg/mL	*15.75	0.49

Aberraciones cromosómicas

De igual forma que para el índice mitótico, se obtuvo el valor promedio del número de aberraciones cromosómicas estructurales para cada tratamiento tomando en cuenta las muestras de ambos donadores (Tabla 4) (Fig. 17).

El análisis de ANOVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos, donde la $F_{obs}=8.33 > F_{7,8}^{\alpha 0.05} = 3.50$. Mediante la comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$) se determinó que el único tratamiento que mostró una diferencia estadísticamente significativa en la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales fue el de pigmentos de tinta blanca de 10 mg /ml (Fig. 16).

TABLA. 4. Medias de la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales para cada tratamiento, contabilizando la cantidad de aberraciones detectadas en 50 metafases analizadas. Diferencias significativa $p < 0.05$ en prueba de ANOVA de un factor y *comparación múltiple de Dunnett.

Tratamiento	No. De aberraciones	Desv. Est.
Testigo negativo	1	0
Testigo positivo (bleomicina)	5	1.41
Agua/metanol	0.5	0.70
Pigmento negro 70 mg/mL	1.5	0.70
Pigmento negro 100 mg/mL	1	0
Pigmento negro 130 mg/mL	0	0
Pigmento blanco 10 mg/mL	*2.5	0.70
Pigmento blanco 30 mg/mL	0	0
Pigmento blanco 50 mg/mL	0	0

Discusión

El análisis estadístico sobre los valores promedio de la proporción de células policromáticas y normocromáticas (toxicidad) y del mismo modo los valores promedio de la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados de ratones expuestos a las diferentes dosis de los dos pigmentos utilizados en este experimento, deja en clara evidencia que ambos pigmentos causan efecto citogenotóxico. Esto estaría asociado principalmente a los componentes químicos integrados a los pigmentos. Peta *et al.*, 2015, determinaron seis hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) especialmente en tintas de color negro: naftaleno, acenaftileno, fenantreno, fluoranteno, pireno y benzo (g,h,i) perileno. Siendo el pireno y fluoranteno detectados en concentraciones mayores a las que están permitidas por el Consejo Europeo. También se ha demostrado que el fluoranteno es un inductor de intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos.

De acuerdo con la literatura el efecto genotóxico de cualquier agente químico comúnmente suele observarse a las 48 h posteriores a su administración, hecho ocurrido en este estudio (Hayashi *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2013). Sin embargo, el efecto mayor se detectó a las 72 h y 96 h postratamiento, esto pudiendo deberse a dos causas: la primera que la vía de administración fue subcutánea y la segunda los HAP anteriormente mencionados actúan como promutágenos, es decir, deben pasar por un proceso de metabolización. Cabe considerar que específicamente el fluoranteno ha demostrado *in vitro* tener la cualidad de aumentar la expresión de CYP450 enzimas necesarias para la biotransformación de los promutágenos (Huang *et al.*, 2011) con lo cual, este hidrocarburo contenido en la tinta negra podría estar implicado en su capacidad genotóxica.

La tinta blanca primordialmente está elaborada a base de dióxido de titanio (inclusive en forma de nanopartículas) o a base de óxido de zinc, plomo y cadmio (Eghbali *et al.*, 2014). Estudios previos sobre la genotoxicidad de nanopartículas de dióxido de titanio no han mostrado que este sea un inductor de micronúcleos. Sin

embargo, otros estudios *in vitro* (ensayo de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas) han demostrado que el dióxido de titanio puede inducir genotoxicidad (Chen *et al.*, 2014). Los resultados del presente trabajo podrían estar asociados a la presencia de dióxido de titanio, plomo y cadmio en la tinta blanca que podrían ser los causantes del efecto citogenotóxico sobre los eritrocitos de la sangre periférica del ratón.

En el caso de las aberraciones cromosómicas encontramos que ambos pigmentos de las tintas en la mayoría de sus concentraciones tienen un efecto citotóxico pues se observa una disminución en el índice mitótico, pero en contraste, casi ninguno de los tratamientos produce un aumento en la generación de aberraciones cromosómicas.

Para el caso específico de la tinta negra su composición se basa en compuestos derivados de carbón e HAP, los cuales, como señala Hogsberg *et al.*, en el 2013 tienen la capacidad de provocar un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, lo cual desembocaría en un aumento en la producción de estrés oxidante y a su vez esto se podría ver reflejado como generación de mutaciones puntuales y de aberraciones cromosómicas. Se sabe que la mayoría de los HAP actúan como promutagenos, es decir, deben pasar por un proceso de metabolismo para ser capaces de inducir daño genético. En este caso los cultivos de linfocitos, al no contar con una fuente externa para la metabolización, no tienen la capacidad de activar a los HAP y estos a su vez al no ser metabolizados no son capaces de inducir daño genético detectable en los cultivos celulares. Por lo cual, a pesar de que la tinta negra contiene muchos compuestos no determinados se deduce que el daño que pudiesen provocar estaría completamente relacionado a los HAP, como ejemplo de esto, en el ensayo llevado a cabo en ratones machos los cuales poseen una fuente de metabolización como lo es el hígado fue posible la detección de micronúcleos. Por otro lado, las tres concentraciones de tinta negra produjeron una baja en el índice mitótico lo cual es clara muestra de un efecto citotóxico. Como señala Peta *et al.*, en el 2015, los HAP presentes en la tinta negra solo pudieron

explicar un porcentaje muy bajo del estrés oxidante generado, por lo cual dicha toxicidad podría ser derivada de algunos de los compuestos no identificados que forman parte de la composición química de la tinta.

Para la tinta blanca, como ya se estableció, esta conformada principalmente por dióxido de titanio u óxido de zinc y en algunos casos plomo y cadmio, Chen *et al.*, en el 2014 señalaron que las nanopartículas de dióxido de titanio tienen la capacidad de provocar daño genético mediante la generación de estrés oxidante aunque en este estudio no se indujeron aberraciones cromosómicas en el cultivo de linfocitos, lo cual como los indican podría estar relacionado con el tamaño, forma de la nanopartícula y a la concentración expuesta. Sin embargo, se infiere que también dentro de la tinta blanca hay compuestos no detectados que podrían jugar un papel en la inducción de daño genético pero que tuvieran que pasar por un proceso de activación metabólica. Además, Jugan *et al.*, 2012 reporta que la capacidad que tienen las nanopartículas de dióxido de titanio es vía fotocatalítica, por ende, para que haya una producción de especies reactivas de oxígeno es necesario la exposición a luz.

Conclusiones

- Los pigmentos de las tintas empleadas en el arte del tatuaje de color blanco y negro tienen efectos citogenotóxicos en células sanguíneas de ratón CD1.
- En una concentración de 10 mg/ml de pigmento blanco se produce genotoxicidad en cultivo de linfocitos.
- El pigmento negro produce una disminución en el índice de toxicidad en ratones machos cepa CD-1 e índice mitótico en el cultivo de linfocitos.
- El pigmento blanco produce efectos genotóxicos y tóxicos en modelos *in vivo*, pero no así en modelos *in vitro*.

Referencias

- Albertini R.J., D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E. Shuker, R.R. Tice, M.D. Waters, A. Aitio, 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International programme on chemical safety. Mutation Research. 463: 111–172.
- Ballén Valderrama J., Castillo López J. 2015. La práctica del tatuaje y la imagen corporal. Revista Iberoamericana de Psicología: Ciencia y Tecnología. 8. 103-109.
- Bañales, M. L. R. 2009. “Modelo experimental para evaluar la genotoxicidad transferida por la leche materna durante la lactancia”. Tesis. M. en C. Universidad de Colima. México.
- Bäumlér W., Vasold R., Lundsgaard J., Talberg H., 2003. Chemical used in tattooing and permanent make up products. En: Papameletiou D. Schwela D. Zenie A. Bäumlér W (eds). Workshop on the technical/scientific and regulatory issues on the safety of tattoos, body piercing and related practices. European Commission. Ispra. 21-37.
- Bäumlér W., Eibler E., Hoehnleutner U., Sens B., Sauer J., Landthaler M. 2000. Q-switch laser and tattoo pigments: first results of the chemical and photophysical analysis of 41 compounds. Lasers in Surgery and Medicine. 26: 13-21.
- Beute T., Miller C., Timko A., Ross E. 2008. *In vitro* spectral analysis of tattoo pigments. Dermatologic Surgery. 34: 508-515.

- Braithwaite R., Robillard A., Woodring T., Stephens T., Arriola KJ. 2001 Tattooing and body piercing among adolescent detainees: Relationship to alcohol and other drug use. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 13:5–16.
- Calderón Segura M.E., Gómez Arroyo S., Villalobos Pietrini R. y Espinosa Ramírez M.1999. In vivo and in vitro promutagen activation by Vicia faba of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutation. Research*. 2: 81-88.
- Chen T., Yan J., Li Y. 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22. 95-104.
- CONAPRED. 2015. El uso de tatuajes no debe ser motivo de discriminación. Boletín de prensa. Consultado el 12 de mayo del 2017
http://www.conapred.org.mx/index.php?contenido=boletin&id=759&id_opcion=&op=213
- Deschesnes M., Demers S., Fines P. 2006. Prevalence and characteristics of body piercing and tattooing among high school students. *Canadian Journal of Public Health*. 97:325–329.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). Decreto por el que se reforma y adicionan diversas disposiciones del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. Consultado el 12 de mayo del 2016
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5244887&fecha=24/04/2012
- Drets M. 2002. Una saga citogenética: el descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico. Significado y proyección bio-médica. *Revista Médica de Uruguay*. 18: 107-121.

- Eghbali K., Mousavi Z., Ziarati P. 2014. Determination of Heavy Metals in Tattoo ink. Biosciences Biotechnology Research Asia. 11 (2). 941-946.
- Evans H.J. 1976. Cytological methods for detecting chemical mutagens. In. Chemical mutagens, principles and methods for their detection. 4: 1-29.
- FDA. 2007. "Redbook". U.S. Department of Health & Human Services.
- Flores S., Barrera H., Frausto A., Chávez D., Hernández A., Herrera V., Nájera L. 2013. "Efectos citogenéticos de la fórmula comercial de una tableta antigripal en los eritrocitos de sangre periférica de ratón árabe (*Mus musculus linnaeus*, 1758)" Biología, Ciencia y Tecnología. 6(20):. 388-397.
- A.-Forte G., Petrucci F., Cristaudo A., Bocca B. 2009. Market survey on toxic metals contained in tattoo inks. Science of the Total Environment. 407: 5997-6002.
- B.-Forte G., Petrucci F., Cristaudo A., Bocca B. 2009. Quantification of sensitizing metals in tattooing pigments by SCI-ICP-MS technique. The Open Chemical and Biomedical Methods Journal. 2: 42-47.
- Gallego M. 2011. Rol de la citogenética en pediatría. Archivos Argentinos de Pediatría. 109: 339-346.
- Galloway S., Armstrong M., Reuben C., Colman S., Brown B., Cannon C., Bloom A., Nakamura F., Ahmed M., Duk S., Rimpo J., Margolin G., Resnick M., Anderson G., Zeiger E. 1987. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environmental and Molecular Mutagenesis. 10: 1-175.

- Galloway S., Aardema M., Ishidate M., Ivett J., Kirkland D., Morita T., Mosesso P., Sofuni T. 1994. Report from working Group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations. *Mutation Research*. 312: 241-261.
- Gómez Arroyo S., Calderón Segura M. E. y Villalobos Pietrini R. 1995. Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 26: 324-330.
- Hayashi M., Hamada S., Morita T., Wakata A., Asanami S., Hosoya S., Ozawa S., Kondo K., Nakajima M., Shimada H., Osawa K., Kondo Y., Asano N., Sato S., Tamura H., Yamija N., Marshall R., Moore C., Blakey DH., Schechtman LM., Weaver JL., Torous DK., Proudlock R., Ito S., Namiki C., 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)" *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 37: 93-110.
- Hayashi M., MacGregor JT., Gatehous DG., Adler ID., Blakey DH., Dertinger SD., Krishna G., Morita T., Russo A., Sutou S. 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.
- Henry J. 1993. Diagnóstico y Tratamientos clínicos por el Laboratorio. Masson Salvat Medicina. 9ª. España.
- Heywood W., Patrick K., Smith., Simpson J., Pitts M., Richters J., Shelley J. 2012. Who Gets Tattoos? Demographic and Behavioral Correlates of Ever

Being Tattooed in a Representative Sample of Men and Women. *Annals of Epidemiology*. 22: 51-56.

- Hogsberg T., Jacobsen N., Clausen P., Serup J. 2013. Black tattoo inks induce reactive oxygen species production correlating with aggregation of pigment nanoparticles and product Brand but not with the polycyclic aromatic hydrocarbon content. *Experimental Dermatology*. 22: 464-469.
- Hogsberg T., Loeschner K., Löff D., Serup J. 2011. Tattoo inks of general usage contain nanoparticles. *British Journal of Dermatology*. 165: 1210-8.
- Huang M., Chen F., Chou M., Su J. 2011. Fluoranthene enhances p53 expression and decreases mutagenesis induced by benzo[a]pyrene. *Toxicology Letters*. 208. 214-224.
- Husgafvel Pursiainen K. 1987. Sister chromatid exchange and proliferation in cultured lymphocytes of passively and actively smoking restaurant personnel. *Mutation Research*. 190, 211-215.
- Jacobsen E., Tønning K., Pedersen E., Serup S., Hogsberg T., Nielsen E. 2012. Chemical substances in Tattoo Ink: Survey of chemical substances in consumer products. No. 116.
<https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2012/03/978-87-92779-87-8.pdf>
Consultado el 4 de mayo del 2018.
- Jugan M., Barillet S., Simon-Deckers A., Herlin N., Sauvagio S., Douki T., Carriere M. 2012. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*. 6: 501-513.

- King KA., Vidourek R. A. 2013. Getting inked. Tattoo and risky behavioral involvement among university students. *The Social Science Journal*. 50. 540-546.
- Kluger N., Bäumlner W. 2015. Epidemiology of Tattoos in industrialized countries. *Currents Problems in Dermatology*. 48. 6-20.
- Kluger N., Koljonen V. 2012. Tattoos, inks, and cancer. *The Lancet*. 13: 161-168.
- Kluger N. 2010. Cutaneous complications related to permanent decorative tattooing. *Expert Review of Clinical Immunology*. 6: 363-371.
- Klügl I., Hiller K., Landthaler M., Bäumlner W. 2010. Incidence of health problems associated with tattooed skin: a nation-wide survey in German-speaking countries. *Dermatology*. 221: 43-50.
- Krishna G., Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. 455: 155-166.
- Laumann A. 2009. History and epidemiology of tattoos and piercings. Legislation in the United States. *Dermatologic Complications with Body Art*. 1-11.
- Laumann A., Derick A. 2006. Tattoos and body piercings in the United States: a national data set. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 55: 413-421.
- Laux P., Tralau T., Tentschert J., Blume A., Al Dahouk S., Bäumlner W., Bernstein E., Bocca B., Alimont A., Colebrook H., de Cuyper C., Dähne L., Hauri U., Howars P., Janssen P., Katz L., Klitsman B., Kluger N., Krutak L.,

Platzek T., Scott-Lang V., Serup J., Teubner W., Schreiver I., Willknif E., Luch A. 2016. A medical-toxicological view of tattooing. *The Lancet*. 387: 395-402.

- Long L., Kirkland D., Whitwell J., Halliwell B. 2007. Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various Cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*. 634: 177-183.
- Lorge E., Moore M., Clements J., O'Donovan M., Fellows M., Honma M., Kohara A., Galloway S., Armstrong M., Thybaud V., Gollapude B., Aardema M., Tanir J. 2016. Standardized cells sources and recommendations for Good Cell culture practices in genotoxicity testing. *Mutation Research*. 809: 1-15.
- Luca C., Seoane, A. 2008. Cátedra de genética general. Mutaciones y Aberraciones cromosómicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. 1-14.
- MacGregor, JT., Werh CM., Henika PR., Shelby Md. 1990. The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, 14: 513- 522.
- Maloy S., Hughes K. 2013. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Academic Press. 2 Ed. 534-539.
- Mayani H., Flores E., Pelayo R., Montesinos J., Flores P., Chavez A. 2007. Hematopoyesis. *Cancerologia*. 2: 95-107.
- Mavournin, K., Blakey, D., Cimino, M., Salamone M., J. Heddle. 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood.

A report of the U.S. Environmental Agency Gene-Tox Program. Mutation Research. 239: 29-80.

- OECD. 2013. Draft Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays.
- Parametría. Encuesta Nacional en vivienda.
http://www.parametria.com.mx/carta_parametrica.php?cp=4437
Consultado el 8 de mayo del 2016.
- Peta N., Stalter D., Tang J., Escher B. 2015. Bioanalytical evidence that chemicals in tattoo ink can induce adaptative stress responses. Journal of Hazardous Materials. 296: 192-200.
- Plant J. 2003. Molecular Toxicology. BIOS Scientific Publisher. London.
- Regensburger J., Lehner K., Maisch T., Vasold R., Santarelli F., Engel E., Gollmer A., König B., Landthaler M., Bäuml W. 2010. Tattoo inks contain polycyclic aromatic hydrocarbons that additionally generate deleterious singlet oxygen. Experimental Dermatology. 19: 275-281.
- Salamanca F. 1988. "Citogenética humana: fundamentos y aplicaciones clínicas". Médica Panamericana. México.
- Schmid W. 1975. The micronucleus Test. Mutation Research. 31: 9-15.
- Scott D., Galloway S., Marshall R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J., Myhr B. 1991. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC task group 9. Mutation Research. 257: 297-305.

- Vasold R., Naarmann N., Ulrich H., Fischer D., Köning B., Landthaler M., Bäuml W. 2004. Tattoo pigments are cleaved by laser light-the chemical analysis in vitro provide evidence for hazardous components. *Photochemistry and Photobiology*. 80: 185-190.
- Vázquez G., Rubio J., Espinosa J. 2016. Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo [A] pireno y el desarrollo de tumores. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 19: 54- 67.
- Velasco P. 2011. “Determinación del posible efecto clastogénico de *Psittacanthuscalyculatus* en sangre periférica de ratón CD1”. Tesis. Licenciado en Biología. Fes Iztacala. UNAM. México.
- Wenzel SM., Rittmann I., Landthaler M., Baumler W. 2013. Adverse reactions after tattooing: review of the literature and comparison to results of a survey. *Dermatology* 226: 138–47.
- Zuñiga. G., Torres, O., Zamora, A., Gómez, B. Ramos, M., Martínez, S., González, A. Luna, J. Ramos, A., Ontiveros, A. y Gallegos, M. 2001. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Reserch*. 494: 161-167.

Anexo I. Resultados.

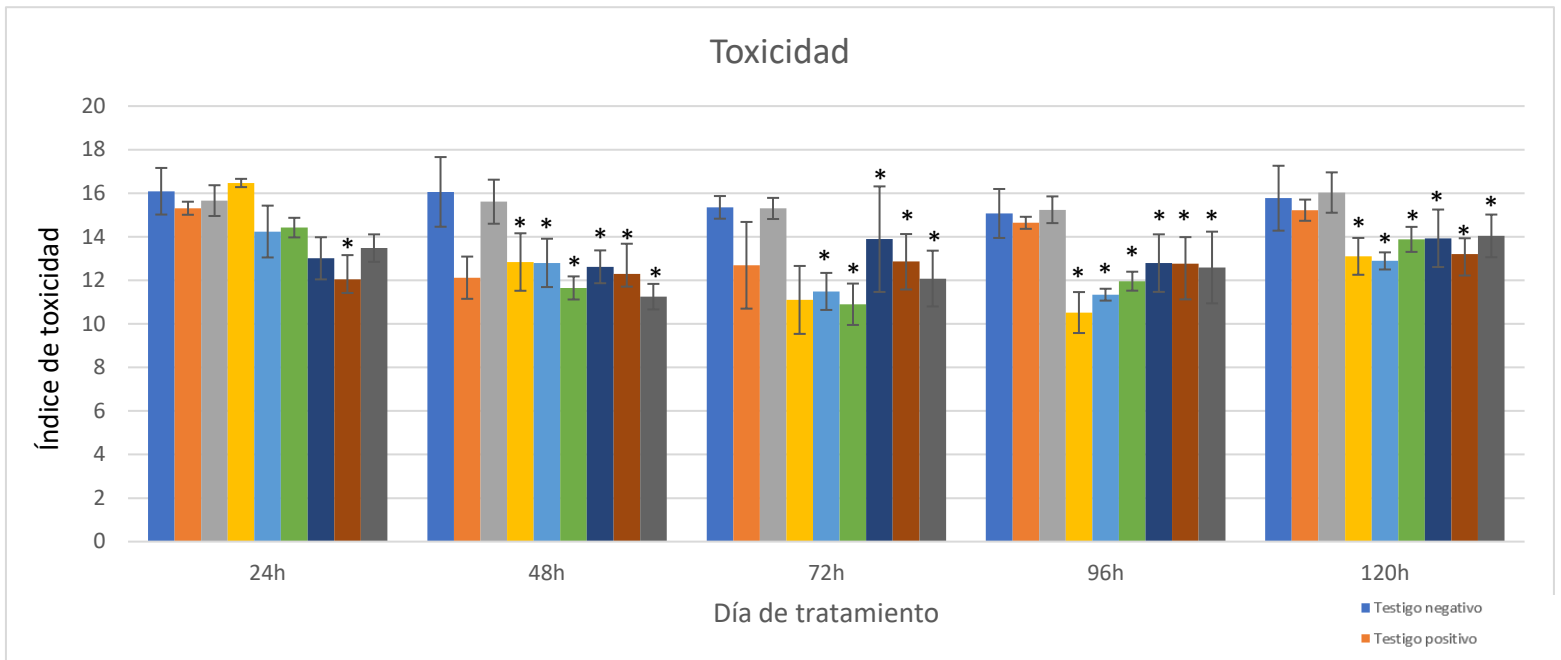


Fig.9. Se observan los valores de toxicidad a las por cada tratamiento durante los cinco días de muestreo. A las 24h únicamente el pigmento blanco a 60 mg/kg indujo daño. De las 48 h en adelante todos los tratamientos con pigmentos indujeron toxicidad disminuyendo la proporción de eritrocitos policromáticos, que a pesar de decrecer conforme pasan los días sigue siendo estadísticamente significativa. *Tratamientos con diferencias estadísticamente significativas mediante comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

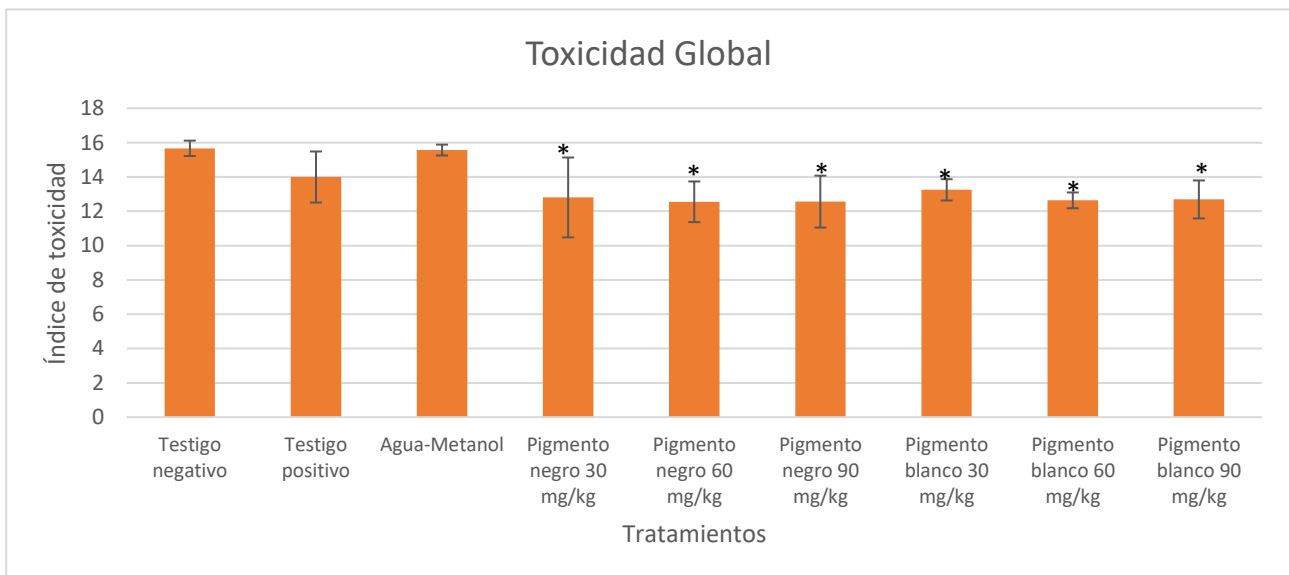


Fig.10. Porcentaje de toxicidad global calculado a utilizando las medias de cada día de muestreo para todos los tratamientos. Se observa que todos los tratamientos con pigmentos indujeron toxicidad con respecto al testigo negativo y que él grupo tratado únicamente con agua-etanol no fue factor en la disminución de la proporción de eritrocitos policromáticos y normocromáticos. *Tratamientos con diferencias estadísticamente significativas mediante comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

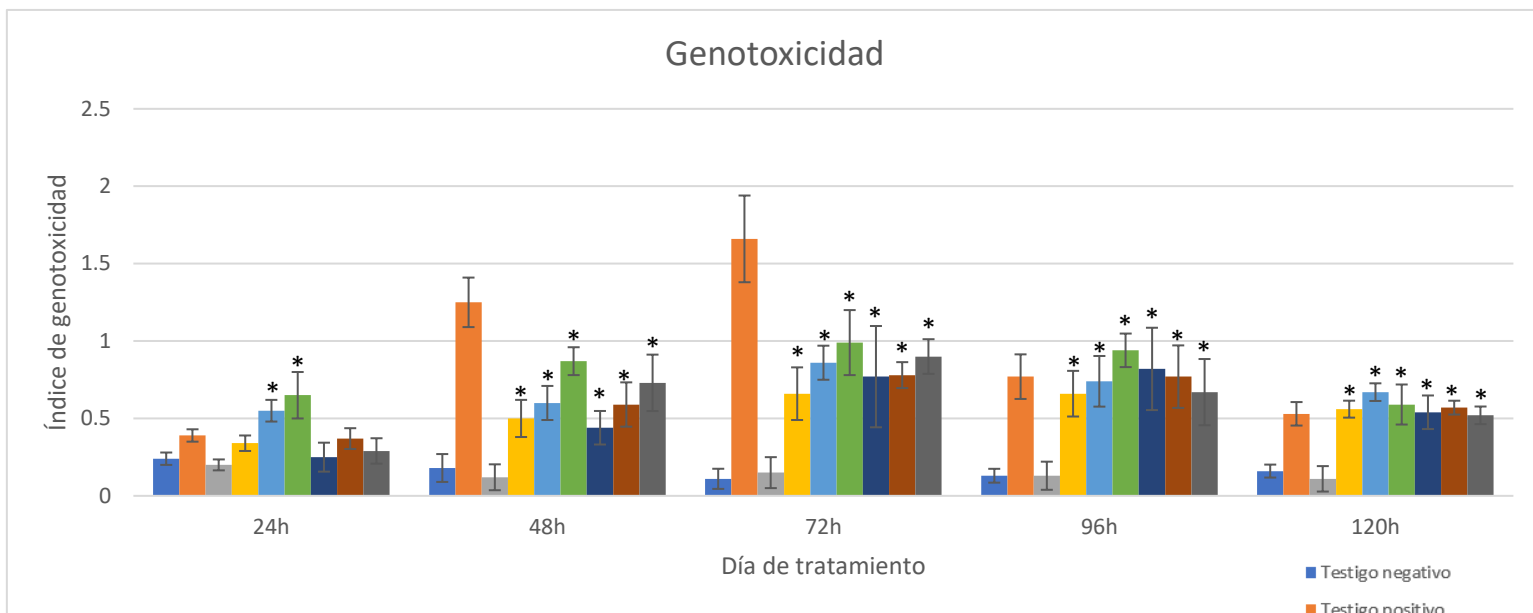


Fig.11. Se observa el valor del índice de Genotoxicidad por cada tratamiento durante los cinco días de muestreo. A las 24h solo el pigmento negro a dosis de 60 y 90 mg/kg indujo un aumento en la producción de micronúcleos, pero de las 48 h en adelante todos los grupos mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo. *Tratamientos con diferencias estadísticamente significativas mediante comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

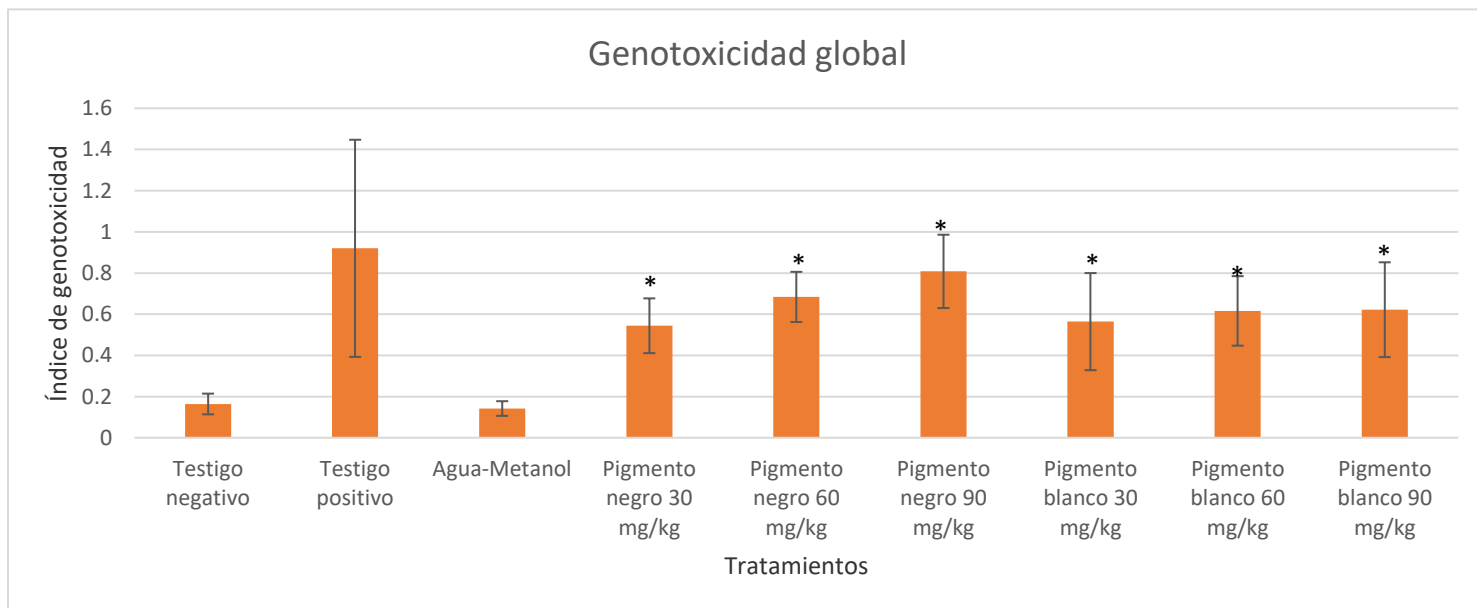


Fig.14. Índice de genotoxicidad global obtenido para cada tratamiento. Se observa que todos los tratamientos expuestos a pigmentos negro y blanco produjeron un aumento en la inducción de micronúcleos. *Tratamientos con diferencias estadísticamente significativas mediante comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

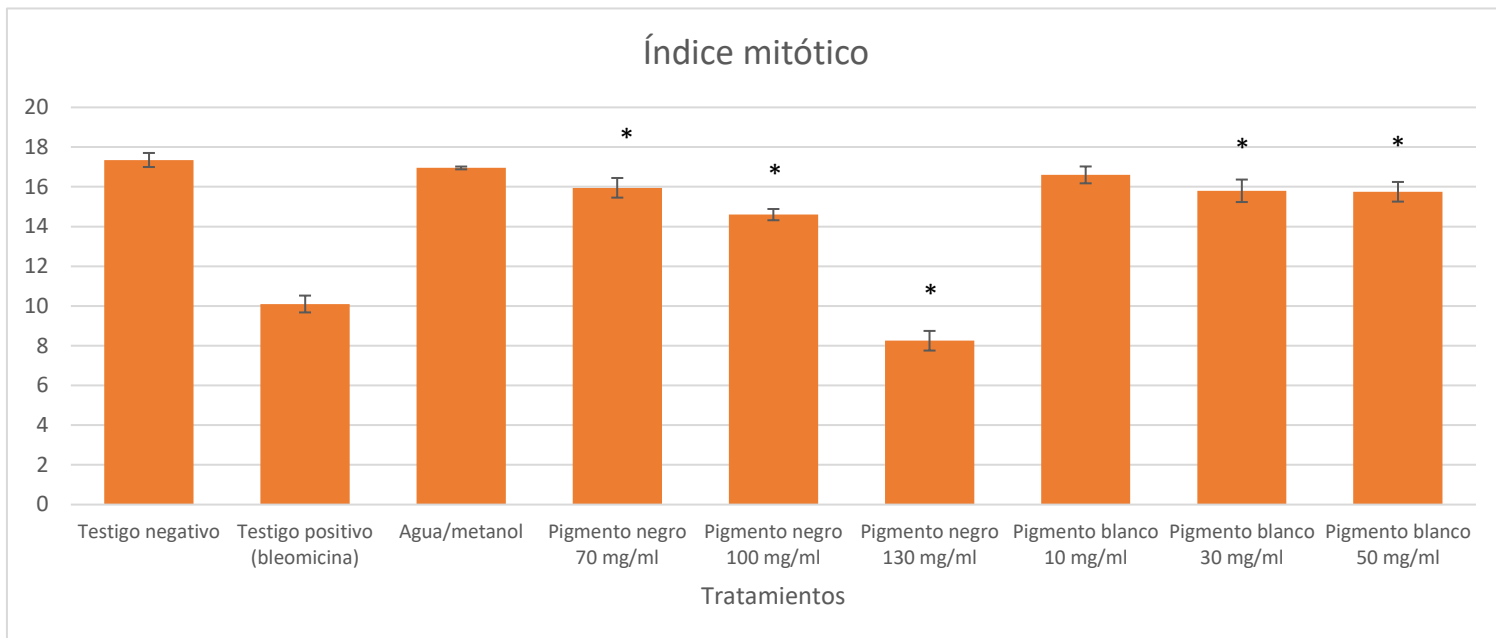


Fig.15. Índice de mitótico para cada tratamiento. Se observa que todos los tratamientos expuestos pigmento negro y los expuestos a 30 y 50 mg/ml de pigmento blanco produjeron una disminución la división celular con respecto al testigo negativo. *Tratamientos con diferencias estadísticamente significativas mediante comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

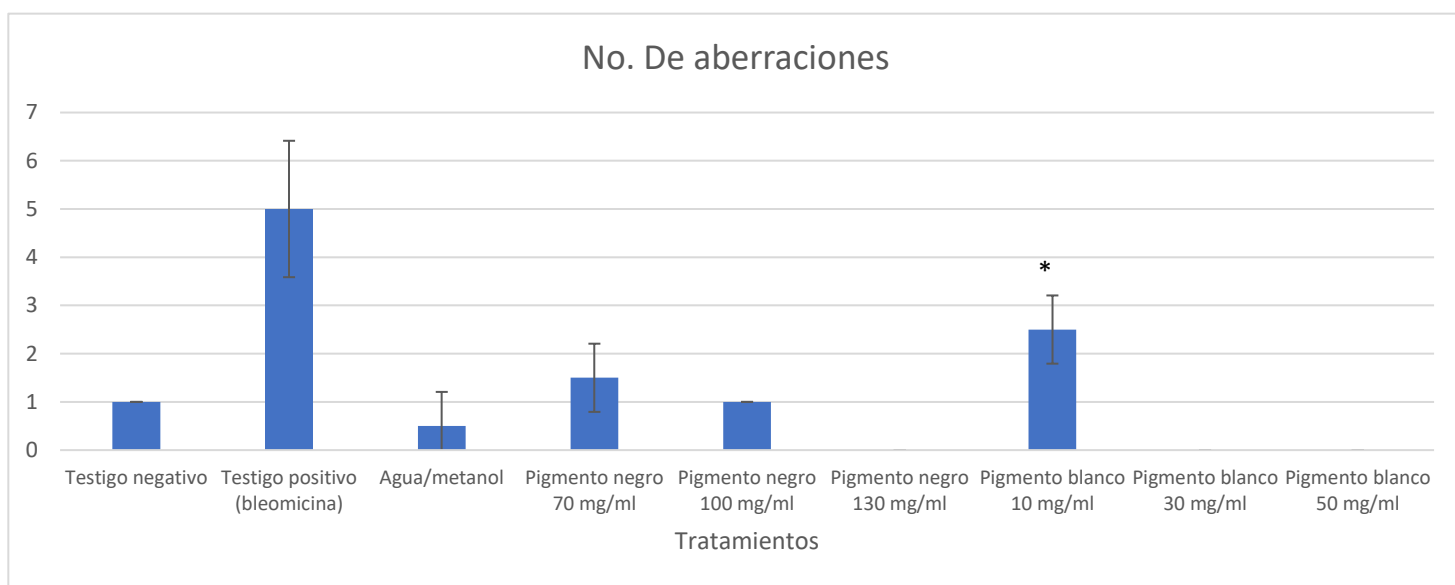


Fig.16. Promedio de aberraciones cromosómicas para cada tratamiento. Se observa que únicamente el tratamiento con pigmento blanco a una concentración de 10 mg/ml produjo aberraciones cromosómicas estructurales con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo. *Tratamientos con diferencias estadísticamente significativas mediante comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).

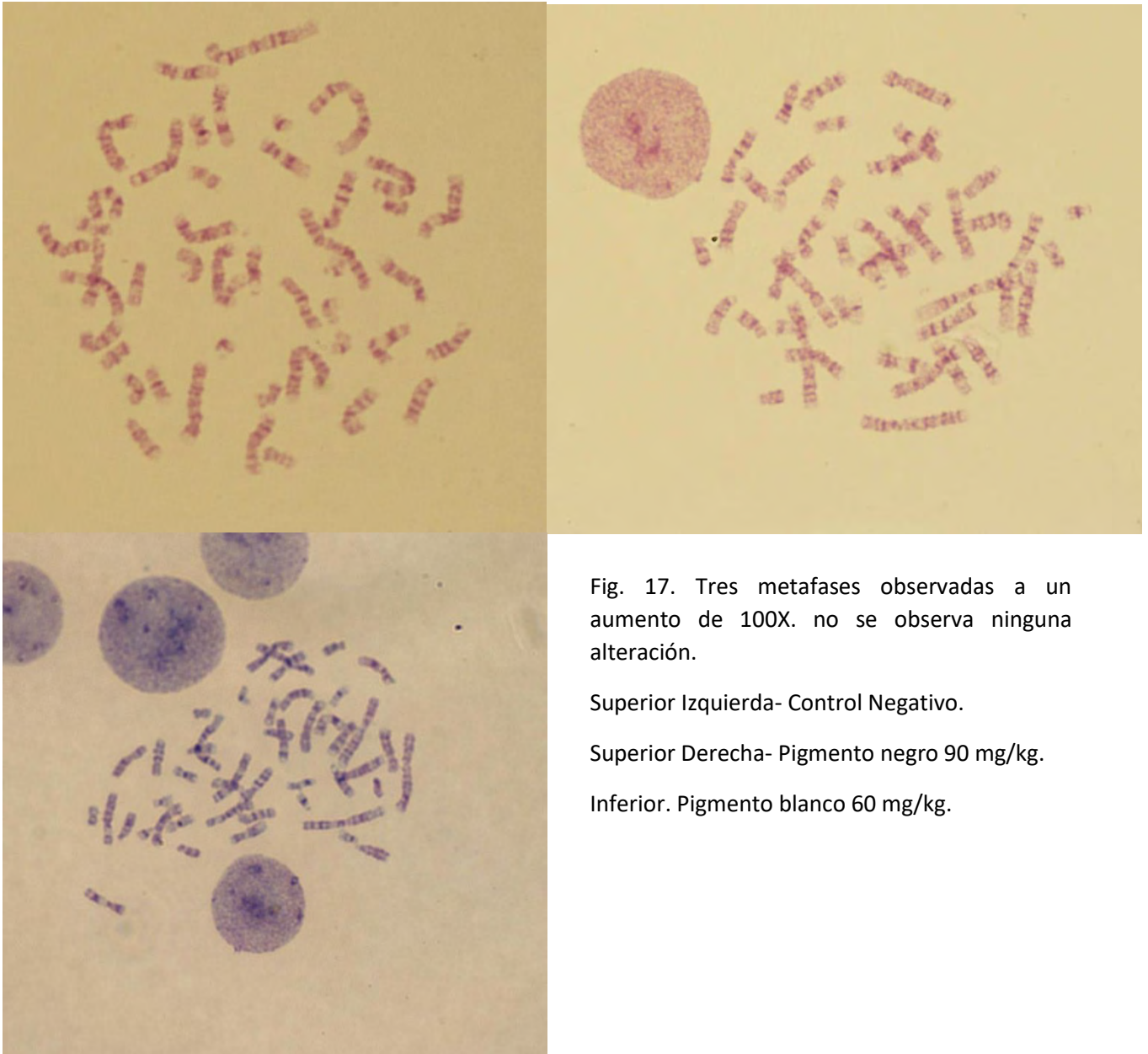


Fig. 17. Tres metafases observadas a un aumento de 100X. no se observa ninguna alteración.

Superior Izquierda- Control Negativo.

Superior Derecha- Pigmento negro 90 mg/kg.

Inferior. Pigmento blanco 60 mg/kg.

Anexo II. Preparación de reactivos para el cultivo de linfocitos.

Medio de cultivo para linfocitos.

500 ml de medio RPMI1640 (biowest).

10 ml de fitohematoglutinina PHA (microlab).

Bajo condiciones de esterilidad se agrega la fitohematoglutinina (PHA) al medio y se procede a mezclar bien. Si el medio de cultivo no será usado al momento este deberá guardarse en congelación hasta su uso con su respectiva etiqueta la cual debe contener los siguientes datos: sustancia de la que se trata, nombre de quien la preparó y fecha de elaboración.

Solución hipotónica de KCl (0.075M).

2.796 g de KCL

500 ml de H₂O desionizada

Colocar el agua en un matraz aforado y añadir el KCl, mantener bajo agitación hasta que se disuelvan en tu totalidad los cristales. Cada que se vaya a utilizar solo se debe tomar lo necesario y poner a 37 °C, la solución restante debe mantenerse a temperatura ambiente. Antes de su utilización se debe revisar la ausencia de cristales. La solución deberá ser desechada a los seis meses. Debe estar debidamente etiquetada señalando a que sustancia se refiere, quien la preparó y la fecha.

Colchicina (solución de trabajo).

0.005 g de colchicina en polvo (Sigma).

25 ml de solución salina inyectable.

Mezclar la colchicina con la solución salina hasta que se disuelva por completo. La solución debe mantenerse bajo congelación en dos o tres recipientes separados. Descongelar 30 min antes que se vaya a utilizar para que alcance temperatura ambiente. Debe agregarse a los tubos de cultivo bajo condiciones de esterilidad. Cada tubo de solución debe estar debidamente etiquetado con el nombre de la sustancia, nombre de quien preparó y fecha de elaboración.

Fijador Carnoy fresco.

75 ml de metanol absoluto.

25 ml de ácido acético glacial.

En un frasco de cristal verter el ácido acético y el metanol. Mantenerlo en refrigeración antes y durante su uso. El fijador esta preparado en proporciones de 3:1 pero puede ser preparado en proporción 5:2 o 1:1 según sea la situación.

Amortiguador Sorensen.

6.63 g de KH_2PO_4

2.56 g de Na_2HPO_4

1000 ml de H_2O desionizada

En un recipiente de cristal, mezclar todos los reactivos y mantener bajo agitación hasta que se disuelvan por completo. Se debe ajustar el pH a 7 y se debe mantener a temperatura ambiente. Debe etiquetarse adecuadamente con el nombre de la sustancia, quien lo preparó y cuando elaboró. Debe ser desechado aproximadamente a los 6 meses o cuando se detecte la formación de cristales.

Colorante Giemsa (solución de trabajo).

10 ml de colorante Giemsa

40 ml de amortiguador Sorensen.

Mezclar el amortiguador con el colorante filtrado y una vez hecha la mezcla se debe quitar la primera capa de colorante cada 30 min con ayuda de un papel filtro. Debe prepararse cada vez a usarse y mantenerse cubierto de la luz.