



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**“OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO *IN VIVO* DE RETICULOCITOS MICRONUCLEADOS EN
HUMANOS Y SU USO EN UN ESTUDIO PILOTO DE UNA POBLACIÓN SANA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BELTRÁN PORTUGAL ROSA ITZEL

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DOCTORA EN CIENCIAS, REGINA DORINDA MONTERO
MONTROYA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DOCTORA EN CIENCIAS, ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD, UAM-I

DOCTOR EN CIENCIAS, ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

**SERVICIO DE ONCOLOGÍA, HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, DR. EDUARDO
LICEAGA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2022.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**“OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO *IN VIVO* DE RETICULOCITOS MICRONUCLEADOS EN
HUMANOS Y SU USO EN UN ESTUDIO PILOTO DE UNA POBLACIÓN SANA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BELTRÁN PORTUGAL ROSA ITZEL

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DOCTORA EN CIENCIAS, REGINA DORINDA MONTERO
MONTROYA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DOCTORA EN CIENCIAS, ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑOZ

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD, UAM-I

DOCTOR EN CIENCIAS, ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

**SERVICIO DE ONCOLOGÍA, HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, DR. EDUARDO
LICEAGA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/1131/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **20 de octubre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de Biomedicina del estudiante **BELTRÁN PORTUGAL ROSA ITZEL** con número de cuenta **311073094** con la tesis titulada **“OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO IN VIVO DE RETICULOCITOS MICRONUCLEADOS EN HUMANOS Y SU USO EN UN ESTUDIO PILOTO DE UNA POBLACIÓN SANA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Vocal: DR. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Secretario: DRA. ALDA ROCÍO ORTÍZ MUÑÍZ

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 24 de noviembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por el apoyo económico recibido para realizar mis estudios e investigación (CVU: 919733).

Al PAEP por el apoyo económico brindado para la asistencia al congreso 50th Annual Meeting, Washington DC: Environmental Mutagenesis and Genomics: The Next Fifty Years.

A mi tutora, la Doctora Regina Dorinda Montero Montoya.

Y a los miembros de mi comité tutorial: el Doctor Enrique Isabel Miranda Peralta y la Doctora Alda Rocío Ortiz Muñiz.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a mis sinodales: Dra. María del Carmen Calderón, Dra. Rocío Ortíz, Dra. Ana María Salazar, Dra. Rosario Rodríguez, Dr. Enrique Miranda y Dr. Luis Felipe Jiménez por sus observaciones, interés y dedicación.

También agradezco al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo de la UNAM por permitirme hacer uso de sus instalaciones para llevar a cabo los experimentos necesarios para este proyecto.

Por otro lado, agradezco a mis compañeros Karen Suárez por colaborar en mi proyecto, ayudando a procesar algunas muestras para determinar los polimorfismos genéticos de *XRCC1 Arg399Gln* y *OGG1 Ser326Cis*, y a Luis Serrano por contribuir enormemente en la obtención de las muestras sanguíneas de los participantes de este estudio.

A su vez, doy gracias a la Lic. en Promoción de la Salud María de los Ángeles Domínguez Mota por haber sido intermediaria entre algunos de los participantes de este estudio y nosotros para poder obtener las muestras requeridas para el desarrollo del mismo.

Finalmente, expreso mi gratitud al laboratorio Xotepingo (Unidad central) por proporcionarnos parte de las muestras para llevar a cabo este estudio.

DEDICATORIA

Quisiera dedicar mi tesis a mi familia, amigos y amigas, y seres queridos que siempre han sido un gran apoyo y motivación para mí. Gracias por confiar en mí y acompañarme en este proceso que, aunque sencillo no ha sido, ha resultado satisfactorio y emocionante.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
<i>I.I GENERALIDADES E IMPORTANCIA DE LOS MICRONÚCLEOS</i>	3
<i>I.II HISTORIA DEL ENSAYO IN VIVO DE MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS EN MODELOS EXPERIMENTALES</i>	5
<i>I.III DESARROLLO DEL ENSAYO IN VIVO DE MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE SERES HUMANOS</i>	8
<i>I.IV LA EDAD Y SU RELACIÓN CON LOS MN</i>	10
<i>I.V EL SEXO Y SU RELACIÓN CON LOS MN</i>	10
<i>I.VI EL TIPO SANGUÍNEO DEL SISTEMA ABO Y SU RELACIÓN CON LOS MN</i>	11
<i>I.VII POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN, OGGI Y XRCCI</i>	12
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
<i>IV.I OBJETIVO GENERAL</i>	17
<i>IV.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	17
V. ANTECEDENTES	18
VI. METODOLOGÍA	19
<i>VI.I FLUJACIÓN</i>	19
<i>VI.II LAVADO DE MUESTRAS</i>	20
<i>VI.III TINCIÓN DE MUESTRAS</i>	20
<i>VI.IV ADQUISICIÓN DE EVENTOS EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO</i>	23
<i>VI.V OBTENCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MN EN EL SISTEMA ERITROIDE DE SP</i>	24
<i>VI.VI TEMPERATURAS</i>	26
<i>VI.VII ESTUDIO DE BIOMONITOREO - FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS</i>	26
<i>VI.VIII CUANTIFICACIÓN DE MN EN EL SISTEMA ERITROIDE DE SP EMPLEANDO CF</i>	27
<i>VI.IX DETERMINACIÓN DE TIPO SANGUÍNEO</i>	28
<i>VI.X DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS FENOTÍPICAS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO RH</i>	28
<i>VI.XI EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN</i>	28

<i>VI.XII AMPLIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN OGG1 SER326CIS</i>	28
<i>VI.XIII AMPLIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO DE XRCC1 ARG399GLN</i>	29
<i>VI.XIV OBTENCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS, ALÉLICAS Y DETERMINACIÓN DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG DE LOS POLIMORFISMOS</i>	30
<i>VI.XV ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	31
VII. RESULTADOS	33
<i>VII.I SELECCIÓN DE LA FIJACIÓN</i>	33
<i>VII.II ELECCIÓN DEL COLORANTE DE TINCIÓN DEL ADN</i>	34
<i>VII.III ESTABLECIMIENTO DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE TRASLADO</i>	34
<i>VII.IV FRECUENCIA DE MICRÓNÚCLEOS EN EL SISTEMA ERITROIDE DE SANGRE PERIFÉRICA DE SUJETOS SANOS</i>	36
<i>VII.V FRECUENCIAS DE TIPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO RH</i>	37
<i>VII.VI DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO DE OGG1 SER326CIS</i>	37
<i>VII.VII FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO DE OGG1 SER326CIS</i>	38
<i>VII.VIII DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO DE XRCC1 ARG399GLN</i>	39
<i>VII.IX FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO DE XRCC1 ARG399GLN</i>	40
<i>VII.X INDUCCIÓN DE MN Y LA EDAD</i>	40
<i>VII.XI INDUCCIÓN DE MN Y EL SEXO</i>	41
<i>VII. XII INDUCCIÓN DE MN Y EL TIPO SANGUÍNEO DEL SISTEMA ABO RH</i>	42
<i>VII.XIII INDUCCIÓN DE MN Y EL POLIMORFISMO DE OGG1 SER326CIS</i>	43
<i>VII.XIV INDUCCIÓN DE MN Y EL POLIMORFISMO DE XRCC1 ARG399GLN</i>	44
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. CONCLUSIONES	52
X. PERSPECTIVAS	53
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
XII. ANEXO	64

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Anti-CD61	Anticuerpo contra la cadena de la integrina beta 3
Anti-CD71	Anticuerpo contra el receptor de la transferrina
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
BBS	Solución amortiguadora salina de bicarbonato
BER	Reparación por escisión de bases
CF	Citometría de flujo
Cis	Cisteína
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
ERIT	Eritrocitos
Gln	Glutamina
HO	Hoechst 33342
K-W	Prueba de Kruskal Wallis
LINF	Linfocitos
MET	Metanol
MLG	Modelo lineal generalizado
MN	Micronúcleos
MN-ERIT	Eritrocitos micronucleados
MN-RET	Reticulocitos micronucleados
MN-RETC71	Reticulocitos micronucleados con receptor de transferrina
MO	Médula ósea
NA	Naranja de acridina
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NT	Naranja de tiazol
OGG1	8-Oxoguanina glicosilasa 1
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PEB	Proeritroblasto
PFA	Paraformaldehido
PM	Paraformaldehido y metanol
RET	Reticulocitos con ARN en su citoplasma
RETC71	Reticulocitos portadores del receptor de transferrina
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SP	Sangre periférica
U de M-W	Prueba estadística U de Mann-Whitney
XRCC1	Complemento reparador 1 de entrecruzamientos inducidos por rayos X

RESUMEN

Los micronúcleos (MN) son un indicador de daño genético. Se utilizan para determinar el daño genotóxico que ejercen los agentes físicos, biológicos y químicos sobre los organismos, incluidos los seres humanos. Debido a que aún no se ha establecido un método para cuantificar MN con citometría de flujo para el ensayo *in vivo* de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de seres humanos, hemos intentado mejorar una metodología. Nos enfocamos en optimizar el ensayo y determinar los niveles basales en una población urbana de sujetos sanos. Usamos el citómetro de flujo Attune® de dos láseres, el azul y el violeta, para realizar nuestros experimentos. Utilizamos metanol como fijador y Hoechst 33342 para identificar MN. También empleamos naranja de tiazol para cuantificar los reticulocitos (RET) y diferenciarlos de los eritrocitos maduros (ERIT), y el anticuerpo anti-CD71-PE-Cy7 para identificar a los reticulocitos más jóvenes (RETCD71). Obtuvimos muestras de sangre periférica de 90 donantes sanos. Contamos los niveles de MN y establecimos si había una inducción diferencial atribuible a varios factores esperados. Encontramos niveles de referencia similares a los ya informados. No se observaron diferencias por el sexo y ni por el tipo de sangre. Con respecto a la edad, observamos un aumento en el daño genotóxico posiblemente debido a la pérdida de eficiencia en los mecanismos de reparación. Además, encontramos un mayor nivel de MN-ERIT en los portadores de polimorfismo *Ser326Cis OGG1* que pueden ser causados por el mal funcionamiento de la enzima 8-oxoguanina ADN glicosilasa 1 (OGG1). En adición, hubo una tendencia a un mayor recuento de células micronucleadas en los portadores de genotipos homocigotos del gen de reparación *XRCCI Arg399Gln*, tal vez explicado por la presión del medio ambiente sobre los mecanismos de reparación, incluso portando genotipos nativos que tienden a dar lugar a fenotipos funcionales y, por otro lado, puede ser que el daño no se repare porque la enzima no es funcional en los portadores del genotipo mutante (*Gln/Gln*). En conclusión, pudimos confirmar el uso del método descrito previamente por Montero y cols. (2016), que puede ser utilizado para el estudio de daño genotóxico en el sistema eritroide y determinar la influencia de diversas variables en él.

Palabras claves: Ensayo *in vivo* de micronúcleos, reticulocitos de sangre periférica de seres humanos, donadores sanos, citometría de flujo.

ABSTRACT

The micronuclei (MN) are a biomarker of genetic damage. They are used to determine the genotoxic damage of physical, biological and chemical agents in organisms, including humans. Because flow cytometric enumeration of MN in the *in vivo* micronucleus test in human peripheral blood reticulocytes has not yet been established, we have attempted to improve a methodology. We focused on optimizing the test and determining the basal levels in an urban population of healthy donors. We used a flow cytometer of two lasers, blue and violet, to perform our experiments. We utilized methanol as fixative and Hoechst 33342 to identify micronuclei. Also, thiazole orange was employed to quantify reticulocytes (RET) and make difference with erythrocytes (ERYT), and anti-CD71-PE-Cy7 antibody was used to identify the youngest reticulocytes (RETCD71). Blood from healthy donors ($N=90$) was obtained. We counted MN levels and established whether there was a MN differential induction attributable to several expected factors. We found similar baseline levels to those already reported. No differences due to sex and blood type were observed. Concerning age, we observed an increase in genotoxic damage possibly due to the loss of efficiency in repair mechanisms. In addition, we found an increased level of MN-ERYT in *OGG1 Ser326Cys* polymorphism carriers maybe caused by the poor function of this enzyme. Also, there were a trend of higher micronucleated cell counts in carriers of homozygous genotypes of the repair gen *XRCC1 Arg399Gln* perhaps explained by the pressure of the environment on the repair mechanisms, even carrying wild genotypes that tend to give rise to functional phenotypes and, on the other hand, it may also be that the damage is not repaired because the enzyme is non-functional in carriers of the mutant genotype. In conclusion, we were able to confirm the use of the methodology previously described by Montero *et al.* (2016) to be used for the study of genotoxic damage in the erythroid system and the influence of various variables on it.

Key words: *In vivo* micronucleus test, human peripheral blood reticulocytes, healthy donors, flow cytometry.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES E IMPORTANCIA DE LOS MICRONÚCLEOS

La toxicología genética estudia los efectos adversos que generan los diversos agentes químicos, físicos y biológicos sobre los organismos, incluidos los seres humanos (Krishna y Hayashi, 2000). Para ello se emplean biomarcadores, que son parámetros biológicos que permiten la observación y la cuantificación de las alteraciones en componentes, estructuras, procesos y conductas de los organismos debido a la exposición a un determinado agente (Manahan, 2003). En biomonitoreos generalmente se usan biomarcadores de exposición, de efecto temprano y de susceptibilidad; entre los de efecto temprano, los de genotoxicidad son muy usados para determinar el daño provocado en el material genético (Seukep y cols., 2014), como los micronúcleos (MN).

Los MN fueron identificados y descritos en eritrocitos de médula ósea (MO) por los hematólogos William Howell y Justin Jolly, quienes encontraron que dichas estructuras estaban asociadas con la deficiencia vitamínica de ácido fólico y vitamina B12 (Dawson, 1961; Hayashi, 2016). A partir de entonces, se ha buscado su presencia y su relación con diversos factores en distintos tipos celulares de diversos organismos, y los mecanismos por los cuales se forman.

Actualmente se sabe que los MN son restos lisos y redondos de naturaleza nuclear no incorporados en los núcleos de las células hijas (Fenech y cols., 2011), observables en células que proliferan (Abramsson-Zetterberg, 2018), originados por mecanismos clastogénicos (ruptura cromosómica), dando lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, o por mecanismos aneugénicos (rezago cromosómico), quedando constituidos por cromosomas completos rezagados (Fenech y cols., 2016). Los MN que contienen fragmentos cromosómicos pueden generarse por varios mecanismos: 1) por rupturas de la cadena del ADN no reparadas, fenómeno que ocurre cuando el daño excede a la capacidad de reparación de las células dentro de un periodo de tiempo determinado o cuando las enzimas implicadas en la reparación por recombinación son defectuosas, 2) por una inapropiada incorporación de bases en el ADN (p. e. uracilo) o por una reparación simultánea por escisión de bases (p. e. 8-oxo-desoxiguanosina), sobre todo si no se completa el paso de llenado de huecos, lo que genera sitios abásicos, y 3) vía el ciclo de ruptura-fusión-puente (*BFB*), en el que se genera la ruptura de la doble cadena del ADN, dejando libres los extremos teloméricos, promoviendo la fusión y la generación de cromosomas dicéntricos que al momento de la división celular forman un puente nucleoplásmico, que se rompe al finalizar la citocinesis y así genera MN acéntricos (Fenech y cols., 2011). Entre los mecanismos de formación de MN que alojan cromosomas completos rezagados, se han descrito los siguientes: 1) por la hipometilación de la citosina en secuencias

repetidas centroméricas y pericentroméricas, provocando un ensamblaje inapropiado del cinetocoro, conduciendo a una mala segregación cromosómica, 2) por defectos en el ensamblaje del huso mitótico, 3) por defectos en los puntos de control de la mitosis y 4) por la amplificación anormal del centrómero, todo lo cual interfiere con la segregación correcta de los cromosomas (Fenech y cols., 2016).

La acumulación de MN puede provocar una alteración en las células o comprometer la integridad genómica, conduciendo a la expresión de varios tipos de cáncer, ya que esta patología refleja que el ADN ha sido dañado (Seukep y cols., 2014). Entonces, en etapas tempranas de la carcinogénesis la inducción de MN puede reflejar que están ocurriendo cambios celulares, y es probable que un nivel elevado de estos indique un mayor riesgo de cáncer (Abramsson-Zetterberg, 2018). Así, en varios estudios se ha reportado que existe una correlación entre los MN y el cáncer (Abramsson-Zetterberg, 2018). Por ejemplo, se ha descubierto que personas sanas con susceptibilidad a la formación de MN tienen un mayor riesgo de cáncer (Wu y cols., 2007; Bonassi y cols., 2011). También, que numerosos compuestos químicos que han sido clasificados como carcinógenos para los seres humanos (clase 1 de la *IARC*) aumentan la frecuencia de MN en linfocitos (LINF) *in vitro* y también en reticulocitos (RET) de roedores en estudios *in vivo* (Morita y cols., 1997).

Es claro, entonces, que la inducción de células micronucleadas ha sido una herramienta útil para detectar la actividad genotóxica de diversos agentes o compuestos químicos, que a su vez está relacionada con el desarrollo de cáncer (Abramsson-Zetterberg, 2018). Por lo tanto, usar este biomarcador para monitorear a las poblaciones o individuos resulta importante. Así, uno de los ensayos habituales a corto plazo más para el estudio de la genotoxicidad *in vivo* es el ensayo de micronúcleos en reticulocitos de médula ósea (MO) y de sangre periférica (SP) de roedores, daño presente en estas células es un reflejo de la afectación a la MO y, al presentar un tiempo de vida corto, después de la exposición a un determinado compuesto químico, muestran su efecto inmediato (Schmid y cols., 1973; Heddle, 1973; en Abramsson-Zetterberg y cols., 2013). Además, se ha recomendado incluir este ensayo en la batería de pruebas de genotoxicidad como parte del proceso de evaluación de la seguridad de los compuestos químicos (Krishna y Hayashi, 2000). Por otro lado, durante décadas, en estudios *in vitro* y en biomonitoreos de exposición ambiental a agentes genotóxicos, la evaluación de daño genotóxico ha sido ejecutada vía el ensayo de micronúcleos mediante la inhibición de la citocinesis (*CBMN*), en el cual se evalúan LINF de SP (Abramsson-Zetterberg, 2018), debido a que son una población celular fácilmente accesible, pueden cultivarse (Countryman y Heddle, 1976) y son adecuados para la detección de una exposición crónica, debido a que presentan un tiempo de vida largo *in vivo* (Nersesyan y cols., 2016). No obstante, la evaluación de MN en LINF requiere mayor tiempo, en promedio se evalúan dos mil células y, en ocasiones, tiende a ser subjetivo si participan

en el análisis dos evaluadores o más, cada evaluador determina si lo observado es o no un MN; se requiere experiencia y aplicar criterios específicos en la evaluación (Fenech, 2007). Por lo tanto, desde hace años se ha propuesto ejecutar el ensayo *in vivo* de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de seres humanos en biomonitoreos (Montero y cols., 2016). Sin embargo, aunque en modelos experimentales está bien establecido, en seres humanos aún falta estandarizarlo, y resulta importante hacerlo ya que nos puede proporcionar información sobre el daño que se está generando en la médula ósea.

I.II HISTORIA DEL ENSAYO IN VIVO DE MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS EN MODELOS EXPERIMENTALES

El ensayo *in vivo* de micronúcleos ha sido usado ampliamente como una prueba citogenética para la detección de agentes químicos ambientales que tienen actividad clastogénica (que son capaces de generar rupturas en el ADN) o aneugénica (generan el rezago de cromosomas completos) (Hayashi y cols., 1983).

La tinción única con Giemsa fue usada rutinariamente para este ensayo con células de médula ósea (Gollapudi y Kamra, 1979). Más el método con dicho colorante tiene algunas desventajas para evaluar la MO porque en ésta hay abundancia de células nucleadas y al hacer la preparación para observarlas se llegan a romper y liberan sus gránulos, los cuales se tiñen de azul oscuro como los MN, interfiriendo con la evaluación (Hayashi y cols., 1983). Además, existen otras inclusiones celulares que contienen ácido ribonucleico (ARN) y otros materiales ácidos que también pueden confundirse con MN, dificultando en ocasiones la distinción entre verdaderos MN y dichas estructuras celulares (Hayashi y cols., 1983) (ver *Fig. 1A y 1B*).

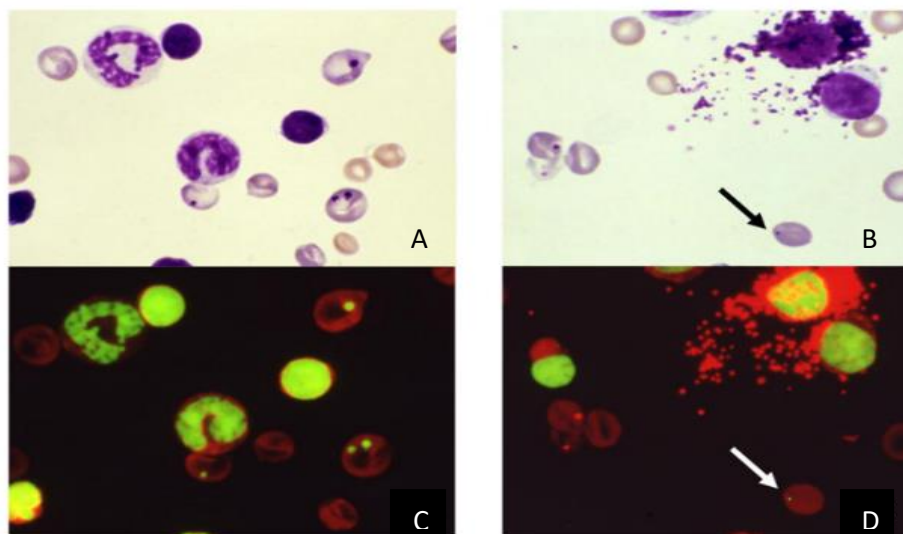


Figura 1. Células eritroides micronucleadas. A y B) células micronucleadas de MO de ratón. C y D) Células micronucleadas de MO de rata con gránulos de mastocitos dispersos; las flechas indican MN verdaderos; tinción con Giemsa (A y B) y con NA (C y D). Imagen tomada de Heddle y cols. (2011).

En 1983, dos métodos para evaluar MN con microscopía de fluorescencia fueron propuestos al mismo tiempo: uno por MacGrego y el otro por Hayashi. Los primeros propusieron el empleo de dos colorantes, pironina-Y y Hoechst 33258, que tiñen ARN y ADN, específicamente. Los segundos emplearon naranja de acridina (NA), que es un fluorocromo metacromático capaz de discriminar el ADN del ARN: el primero fluoresce en verde y el segundo en rojo (Kasten, 1967; Rigler, 1969; Pearse, 1972; en Hayashi y cols., 1983) (ver *Fig. 1C y 1D*), permitiendo así la distinción entre MN verdaderos de los que no lo eran. Se decidió que el método de tinción con NA era el más sencillo y conveniente para la evaluación microscópica de rutina, convirtiéndose en el estándar para evaluar MN (Heddle y cols., 2011).

Años más tarde, la NA fue introducida como un fluorocromo de tinción supravital en el ensayo de MN usando MO y SP de roedores, ya que puede penetrar en las células no fijadas e interactuar con el ARN y el ADN (Heddle y cols., 2011). Para 1998, Wakata, Hayashi y colaboradores reportaron que después de exponer a diferentes roedores a 40 productos químicos se obtuvo una concordancia en el daño encontrado en MO y SP, en forma de MN, siendo del 88% en ratones y del 92% en ratas, demostrando que las ratas pueden servir también para este ensayo, aun cuando al principio se creía que no serían organismos útiles para evaluar MN en SP porque el bazo filtra constantemente a las células aberrantes, como ocurre en los seres humanos (Wakata y cols., 1998; en Heddle y cols., 2011). Debido a estos hallazgos, se lograron hacer evaluaciones con poca cantidad de muestra y en repetidas ocasiones de un mismo animal, de tal forma que ya no eran sacrificados para obtener la MO; además, se reconoció a los reticulocitos más jóvenes de los más maduros y se clasificaron en distintas categorías de edad por su contenido de ARN, lo que permitió obtener más información sobre la cinética de la expresión de micronúcleos, y, lo más importante, este método fue evaluado y validado por el grupo de estudio colaborativo para la prueba de micronúcleos (CSGMT), quienes estudiaron diversos factores que podrían afectar los resultados de la prueba (Heddle y cols., 2011; Hayashi, 2016).

Grawé y cols. (1992) plantearon que, dado que los reticulocitos (eritrocitos jóvenes) y los eritrocitos (ERIT, células maduras) carecen de núcleo, los MN podían ser enumerados usando citometría de flujo (CF), y describieron un método para hacerlo usando Hoechst 33342 (HO) para teñir el ADN contenido en los MN, y naranja de tiazol (NT) para teñir el ARN presente en el citoplasma de los RET de SP de ratas e identificar a las células de interés (Montero y cols., 2016). Este tipo de estudio resultó ser práctico porque los citómetros de flujo pueden analizar un gran número de células en un corto periodo de tiempo, dándole mayor poder estadístico al estudio de la inducción de MN (Hayashi y cols., 2007; Hayashi, 2016; Montero y cols., 2016).

El método mencionado anteriormente, fue un sustituto de la evaluación de MN con microscopía, sin embargo, requiere el empleo de un citómetro que cuente con dos láseres, el violeta y el azul, para excitar a los fluorocromos empleados. Dado que no todos los laboratorios de genotoxicidad cuentan con un citómetro de dos láseres, Dertinger y cols. (1996) sugirieron un método alternativo para cuantificar los MN en los reticulocitos, usando un citómetro de un láser. Así, se volvió a usar la NA para identificar tanto a los RET como a los MN. Sin embargo, se presentaron algunas dificultades para discernir entre la fluorescencia del ARN y del ADN en CF, ya que el espectro de emisión de estos era muy cercano y difícilmente discernible en los equipos citométricos (Montero y cols., 2016). Por lo tanto, se propuso el empleo del anticuerpo anti-CD71 para detectar al receptor de transferrina presente en los reticulocitos más jóvenes (RETCD71) en SP, y así identificar a las células de interés en lugar de hacerlo por su contenido de ARN (Montero y cols., 2016).

Como la detección con CF se basa en la fluorescencia que emiten los diversos fluorocromos, es necesario conjugarlos con los anticuerpos que se usan para identificar los tipos celulares. Por lo tanto, el anti-CD71 se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC), mientras que para identificar los MN se utilizó yoduro de propidio (YP) (Montero y cols., 2016). Finalmente, este método fue documentado en varios reportes y se volvió reproducible y factible para el ensayo *in vivo* de micronúcleos en roedores, y varios estudios entre diferentes laboratorios demostraron su utilidad para evaluar y detectar la genotoxicidad de agentes conocidos (Montero y cols., 2016).

Una vez estandarizado el método para cuantificar MN con CF en roedores, se intentó aplicarlo para el ensayo *in vivo* de MN en muestras de seres humanos, pero surgieron algunos problemas ya que las células de interés, es decir los RETCD71, se encuentran en un porcentaje del 0.05% al 0.5% (Dertinger y cols., 2003), muy bajo comparado con lo reportado en ratas que es del 1% al 5% (ver **Fig. 2**) (R'zik y cols., 2001; Dertinger y cols., 2006; MacGregor y cols., 2006). Algunos investigadores plantearon retomar el uso de contenido de ARN para resolver este problema, ya que el porcentaje de células con ARN en SP es mayor, de 0.5-3% y es más probable obtener un conteo mayor de RET totales que de RETCD71 (ver **Figura 2**). En el siguiente apartado se abordará más sobre el ensayo *in vivo* de micronúcleos en reticulocitos de seres humanos.

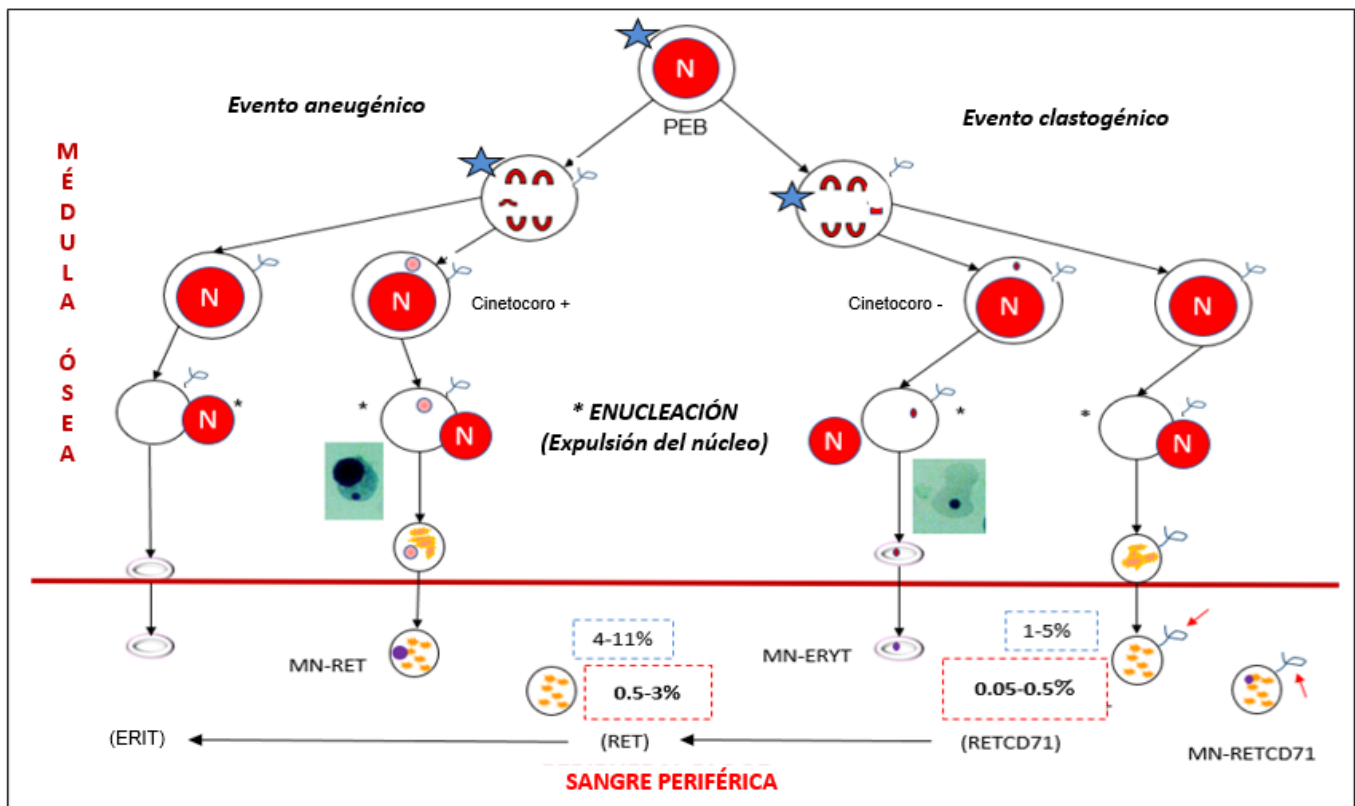


Figura 2. Mecanismo de formación de micronúcleos (MN) en las células eritroides. Células rojas de la sangre evaluadas: reticulocitos con ARN en su citoplasma portadores del receptor de transferrina (RETCD71), reticulocitos conteniendo ARN que pueden o no portar a CD71 (RET) y eritrocitos maduros (ERIT); las flechas negras indican la dirección de la maduración de las células eritroides en circulación; los recuadros rojos muestran la cantidad correspondiente a las subpoblaciones celulares en humanos; los recuadros azules muestran el conteo en ratas; las estrellitas azules indican la ocurrencia de daño al ADN. Esquema basado en Krishna y Hayashi (2000), obtenido de Beltrán -Portugal (2018); los porcentajes de los RET y RETCD71 fueron obtenidos de Montero y cols., 2016.

I.III DESARROLLO DEL ENSAYO IN VIVO DE MICRONÚCLEOS EN RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE SERES HUMANOS

Algunos investigadores han estado buscando la manera de mejorar el método y poder aplicarlo para seres humanos (Montero y cols., 2016). Así, Abramsson y cols. (2000) publicaron un método en el que se evalúa a los RETCD71 de SP, resultan de interés al reflejar el daño reciente en el ADN producido en la MO por la exposición a un determinado agente genotóxico. Para desarrollar este método, ellos emplearon paraformaldehído (PFA) para fijar a las células, perlas inmunomagnéticas para aislar a los RETCD71 exclusivamente, tiñeron con NT a esas células para poder determinar su contenido de ARN, usaron HO para identificar a los MN, y analizaron con un citómetro de flujo de dos láseres. Dentro de las desventajas que se encontraron fue que, aunque realizaron la purificación de RETCD71 mediante separación inmunomagnética, seguían teniendo contaminación de eritrocitos, que son las células maduras. En cuanto a los hallazgos que reportaron encontraron una relación positiva y significativa entre la edad y el

incremento de MN, así como mayor número de MN en sujetos del tipo sanguíneo A comparado con el O, y que no encontraron diferencias en el nivel de MN entre hombres y mujeres.

Por otro lado, Dertinger y cols. (2003) describieron un método en el que se evaluaron, tanto a los RETCD71 como a los ERIT, localizados en el torrente sanguíneo. Para ello, fijaron a las células con metanol (MET), usaron RNAsa para eliminar el ARN de las células, utilizaron el anticuerpo anti-CD71 conjugado con FITC para identificar a los RETCD71, y tiñeron con yoduro de propidio (YP) para obtener los MN, analizando sus muestras con un citómetro de flujo de un láser. La dificultad que encontraron fue que para obtener el número deseado de RETCD71, aproximadamente 10,000 células, tardaban alrededor de 25 minutos por cada muestra, lo cual incrementa el costo del uso de esta técnica, y con frecuencia no se alcanzaba ese número de células evaluables, sino un número considerablemente menor, semejante al que se evaluaría al microscopio. Pese a ello, lograron observar que es mayor el número de MN en RETCD71 (MN-RETCD71) que los MN en ERIT (MN-ERIT), y que, tanto en RETCD71 como en ERIT, el número de MN incrementó en un individuo esplenectomizado. Esto lo adjudicaron a la acción de filtración del bazo que, al no estar presente o estar defectuoso, no eliminaría las células dañadas, permitiendo que éstas se acumularan.

Existe otro método, el cual fue propuesto por Montero y cols. (2016), en donde se evalúa el sistema eritroide de SP: los RETCD71, los reticulocitos (RET) que ya no portan el receptor de transferrina pero sí ARN en su citoplasma, y los ERIT. Para implementarlo, las muestras de SP fueron fijadas en MET, teñidas con el anticuerpo anti-CD71 conjugado con ficoeritrina y cianina 7 (anti-CD71-PE-Cy7), NT para identificar a todos los reticulocitos mediante su contenido de ARN y HO para los MN, usando un citómetro de dos láseres. Con este protocolo se logró evaluar una muestra de 600 μ L por triplicado en 6 minutos. Además, encontraron que es posible obtener un mayor número de reticulocitos evaluables por su contenido de ARN, en comparación con los que se identifican por el receptor de transferrina, y que hay mayor número de MN-RET y MN-RETCD71 que MN-ERIT. En su estudio también encontraron un mayor número de RETCD71 en niños que en adultos y reportaron que los MN-ERIT también eran más frecuentes en niños, a pesar de que las frecuencias de daño en reticulocitos (CD71 o con ARN) fueron más altas en los adultos; esto sugeriría una menor función del bazo en los niños de las edades estudiadas.

Finalmente, aunque aún no hay un método estándar para el ensayo *in vivo* de micronúcleos en reticulocitos de seres humanos, cabe destacar que se está haciendo un gran esfuerzo por optimizar y estandarizar un protocolo, y para ello, también se requiere estudiar las posibles variables que pudieran influir en la inducción de MN en el sistema eritroide.

I.IV LA EDAD Y SU RELACIÓN CON LOS MN

El incremento de la edad se ha relacionado con el decremento de las funciones de los órganos y tejidos del cuerpo, expresado como resultado del incremento de la inestabilidad en la función y la estructura del genoma (Mathon y cols., 2001). Así, el declive en la eficiencia de los procesos de reparación y la acumulación de mutaciones debido a condiciones adversas exógenas como endógenas resultan en un incremento en el daño al ADN (Barnett y King, 1995; Bohr, 1995; Wojda y cols., 2006). Lo cual a nivel citológico es reflejado por un incremento en la frecuencia de lesiones visibles como translocaciones, inserciones, fragmentos dicéntricos y acéntricos que se acumulan con la edad en células de mamíferos (Lombard y cols., 2005). Este tipo de lesiones se observa como el daño cromosómico o la pérdida de cromosomas que pueden ser medidos mediante el ensayo de micronúcleos (Orta y Günebakan, 2012). Por ejemplo, Ramsey y cols. (1995) y Bolognesi y cols. (1997) demostraron que las aberraciones cromosómicas en seres humanos sanos incrementaron con la edad y definieron la posible responsabilidad de los factores ambientales y la inherente carga genética de dicho aumento. Por su parte, Ganguly (1993) demostró que las frecuencias de aberraciones cromosómicas y MN que se midieron en LINF de individuos de diferentes edades dieron una correlación positiva con las edades individuales, mientras que los índices mitóticos que se midieron para la proliferación celular dieron una correlación negativa con las mismas (Orta y Günebakan, 2012). Además, Fenech (1998) mostró que la edad podría estar explicando al menos el 25% de la variación del intervalo de daño cromosómico en linfocitos tanto de hombres como mujeres.

Todas las evidencias anteriores indican que el daño cromosómico está ampliamente relacionado con el incremento de la edad, lo cual ha sido evaluado en LINF de sujetos sanos. Son numerosos los estudios que han demostrado dicho fenómeno en este sistema celular (Ganguly y cols., 1993; Fenech y cols., 1998; Orta y Günebakan, 2012). No obstante, en cuanto a las células eritroides de sangre periférica, un sistema recientemente empleado para el ensayo *in vivo* de MN en muestras de seres humanos, también ha mostrado la misma observación, aunque hasta ahora solamente los estudios de Abramsson-Zetterberg y cols. (2000) y Montero y cols. (2016), han reportado un incremento de MN conforme avanza la edad. Por lo tanto, hace falta que se continúe evaluando si la edad es un factor que influye en la inducción de daño genotóxico, evaluado a partir de la inducción de MN, en el sistema eritroide.

I.V EL SEXO Y SU RELACIÓN CON LOS MN

Los MN en LINF de personas sanas, no expuestas de manera anormal a agentes genotóxicos, generalmente se originan a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos o por eventos de pérdida de cromosomas completos en una proporción que varía entre 30:70% en un extremo a 70:30% en el otro, dependiendo de

la edad y el sexo (Fenech y cols., 2011). En estas células, los MN se incrementan con la edad y se encuentran generalmente más elevados en mujeres comparado con hombres (Fenech, 2007). En este caso, los cromosomas sexuales contribuyen a la mayoría de eventos de pérdida de cromosomas que se incrementa con la edad (Norppa y Falck, 2003). Así, en mujeres sanas, el cromosoma X puede representar hasta el 72% de los MN observados, de los cuales 37% parecen carecer de cinetocoro funcional, lo que sugiere que pueden existir defectos en el ensamblaje de éste, posiblemente debido a su inactivación (Fenech y cols., 2011).

Adicionalmente, así como se ha visto que el cromosoma X es preferencialmente perdido en mujeres, por su parte, el cromosoma Y tiende a ser rezagado en hombres, también de manera natural (Pierre y Hoagland, 1972; Fitzgerald y McEwan, 1977; Galloway y Buckton, 1978; Schneider, 1978; Richard y cols., 1993). Esta observación es debida a que la acumulación de células carentes de los cromosomas sexuales puede ser reflejo del nivel diferencial de supervivencia celular más que a la pérdida cromosómica preferencial, ya que los cromosomas autosómicos pueden ser perdidos con la misma frecuencia como los sexuales, pero su pérdida conduce a la muerte celular porque contienen genes requeridos para la sobrevivencia de los linfocitos (Hando y cols., 1994).

Pese a la evidencia acumulada del incremento de MN en LINF con la edad, en especial en mujeres, en células eritroides no se observó lo mismo en el único trabajo que evaluó si el sexo podría ser un factor diferencial de la inducción de MN en el sistema eritroide. Así, Abramsson y colaboradores (2000) no encontraron diferencias entre las frecuencias de MN-RETCD71 entre hombres y mujeres. Por ende, resulta importante continuar evaluando si el sexo realmente podría influir en las células eritroides como se ha observado en LINF.

I. VI EL TIPO SANGUÍNEO DEL SISTEMA ABO Y SU RELACIÓN CON LOS MN

En el año 2000, Abramsson y su equipo reportaron que había una relación entre el tipo sanguíneo y el nivel de MN en RETCD71 de SP, siendo más elevado en sujetos del tipo A comparado con el O. La explicación a este fenómeno no es definitiva, pero se propuso que podría haber una conexión entre el tipo sanguíneo A y una deficiencia en el metabolismo del hierro (Wegelius y Weber, 1978). Dado que el receptor de transferrina está involucrado en dicho proceso y fue el marcador para identificar a las células de estudio, podría reflejar el vínculo entre el tipo sanguíneo con el daño observado (Abramsson y cols., 2000). Hasta ahora, este es el único estudio que ha reportado dicho hallazgo en el sistema eritroide.

I.VII POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN, OGG1 Y XRCCI

En la mayoría de las células, el ADN es dañado por causas endógenas y exógenas (Goode y cols., 2002). Dentro de las endógenas pueden considerarse los errores en la replicación, los cambios espontáneos de la estructura química del ADN, las rupturas programadas de la doble cadena del ADN (durante la diferenciación de los linfocitos), y por algunos agentes que están presentes normalmente en las células (Lombard y cols., 2005). En la última categoría se encuentra el daño oxidante, principalmente causado por las especies reactivas de oxígeno, que pueden ser parte de procesos fisiológicos normales y también esenciales pero en algunos casos no son regulados o agentes externos pueden modificar su producción y concentración, provocando el daño en diversos componentes celulares (Lombard y cols., 2005). Por ejemplo, pueden generar peroxidación de lípidos, daño a proteínas y lesiones en el ADN: rompimientos de cadena sencilla o doble, aductos y entrecruzamientos (Sohal y Weindruch, 1996).

Para atenuar los efectos de este daño, existen diversos mecanismos de reparación del ADN, que cuentan con una maquinaria que involucra la participación de diversos componentes celulares, moléculas y enzimas para mantener la estabilidad genómica (Misteli y Soutoglou, 2009). Así, las rupturas de la doble cadena del ADN pueden ser reparadas por recombinación homóloga y por unión de extremos no homólogos, mientras que las lesiones de una sola cadena del ADN son reparadas vía la escisión de bases (*BER*) y la escisión de nucleótidos (*NER*) (Lombard y cols., 2005). Si estos mecanismos fallan, las células afectadas no reparan el daño, lo que puede conducir a la apoptosis (muerte celular programada) o a la producción de mutaciones que pueden alterar y desregular la división celular, lo cual puede promover la expresión de patologías importantes, como el cáncer (Goode y cols., 2002). Una de las razones por las que pueden llegar a fallar o a no realizar su función de manera eficiente es debido a que existen polimorfismos (variantes de un único nucleótido, *SNP*) en los genes de reparación del daño del ADN (Shen cols., 1998).

En relación con esto, los genes *OGG1* (oxoguanina glicosilasa 1; localizado en el cromosoma 3p25.3) y *XRCCI* (complemento reparador 1 de entrecruzamientos inducidos por rayos X; en el cromosoma 19q13.31), involucrados en *BER*, tienen un papel importante en la reparación eficiente del daño de cadena sencilla del ADN, causado, por ejemplo, por estrés oxidante y radiación ionizante (De Ruyck y cols., 2004). Mutaciones en *XRCCI* provocan que las células sean más susceptibles de sufrir daño en el ADN, el cual puede observarse, por ejemplo, en un aumento de aberraciones cromosómicas (Thompson y West, 2000). Esto fue reportado por Lunn y colaboradores (1999), los cuales evaluaron el efecto que tenía el polimorfismo del gen *XRCCI* (cambio en el codón 399 en el exón 10 de una arginina (*Arg*) por una glutamina (*Gln*)), encontrando que había más aductos de aflatoxina B1 placentaria y células variantes de

glicoforina A entre los portadores del polimorfismo 399Gln/Gln en este gen que en los portadores del genotipo nativo (399Arg/Arg). Cuando hablamos del producto proteico funcional de este gen podemos observar que actúa en la reparación de rupturas de cadena sencilla después de *BER* (**Fig. 3**, es parte del complejo que actúa en la parte de llenado del hueco con parches cortos), las cuales son resultado de la exposición a oxígeno reactivo producido endógenamente, a radiación ionizante o por agentes alquilantes (Duell y cols., 2000). El codón 399 en *XRCCI* está localizado dentro del dominio *BRCT* (C-terminal de *BRCA1*) el cual se piensa que es una interfase proteína-proteína que interactúa con *PARP* (poli ADP ribosa polimerasa) (Masson y cols., 1998; Zhang y cols., 1998). A su vez, *PARP* es una enzima con dedos de zinc que detecta los rompimientos de la cadena del ADN y ejerce su papel en *BER* (De Murcia y cols., 1997). Así, se postula que los individuos portadores del alelo mutante (399Gln) de *XRCCI* tienen niveles elevados de aductos debido a que al portar el polimorfismo se afecta la vía dependiente de *BER* para reparar bases dañadas (Duell y cols., 2000).

Por otro lado, el gen *OGGI* codifica una enzima glicosilasa bifuncional (ver **Fig. 3**) la cual es responsable de la escisión del aducto 8-oxoguanina (oxo8dG), una base mutagénica que ocurre como resultado de la exposición a especies reactivas de oxígeno (NCBI, 2019). La acción de esta enzima permite que el sitio abásico generado sea restaurado mediante la acción de una endonucleasa, la cual retira los residuos de los azúcares, permitiendo que el ADN sea resintetizado utilizando la cadena complementaria no afectada como molde, reparando así la lesión (Squire y cols., 1998; en Goode y cols., 2002). El polimorfismo en el gen *OGGI Ser326Cis* causa la sustitución de una serina (*Ser*) por una cisteína (*Cis*) en el codón 326 del exón 7 de este gen (Alanazi y cols., 2013). El alelo mutante (326Cis), que inactiva al gen *OGGI*, inhibe la escisión del aducto oxo8dG, provocando su acumulación y permitiendo que las células afectadas conserven la capacidad de proliferar y aumenten el número de mutaciones espontáneas (Arai y cols., 2003). Así, el polimorfismo 326Cis de este gen ha sido asociado con un alto riesgo de desarrollar muchos tipos diferentes de cáncer, incluyendo pulmonar y orofaríngeo (Alanazi y cols., 2013).

Aunque existen diversos genes implicados en los mecanismos de reparación del daño del ADN, parece ser que *XRCCI* y *OGGI* tienen un papel muy importante en *BER* (Jain y cols., 2017) (**Fig. 3**). Por lo anterior, se planteó el objetivo de determinar si el polimorfismo de estos genes podría estar relacionados con una inducción diferencial de MN en sujetos sanos habitantes de la Ciudad de México.

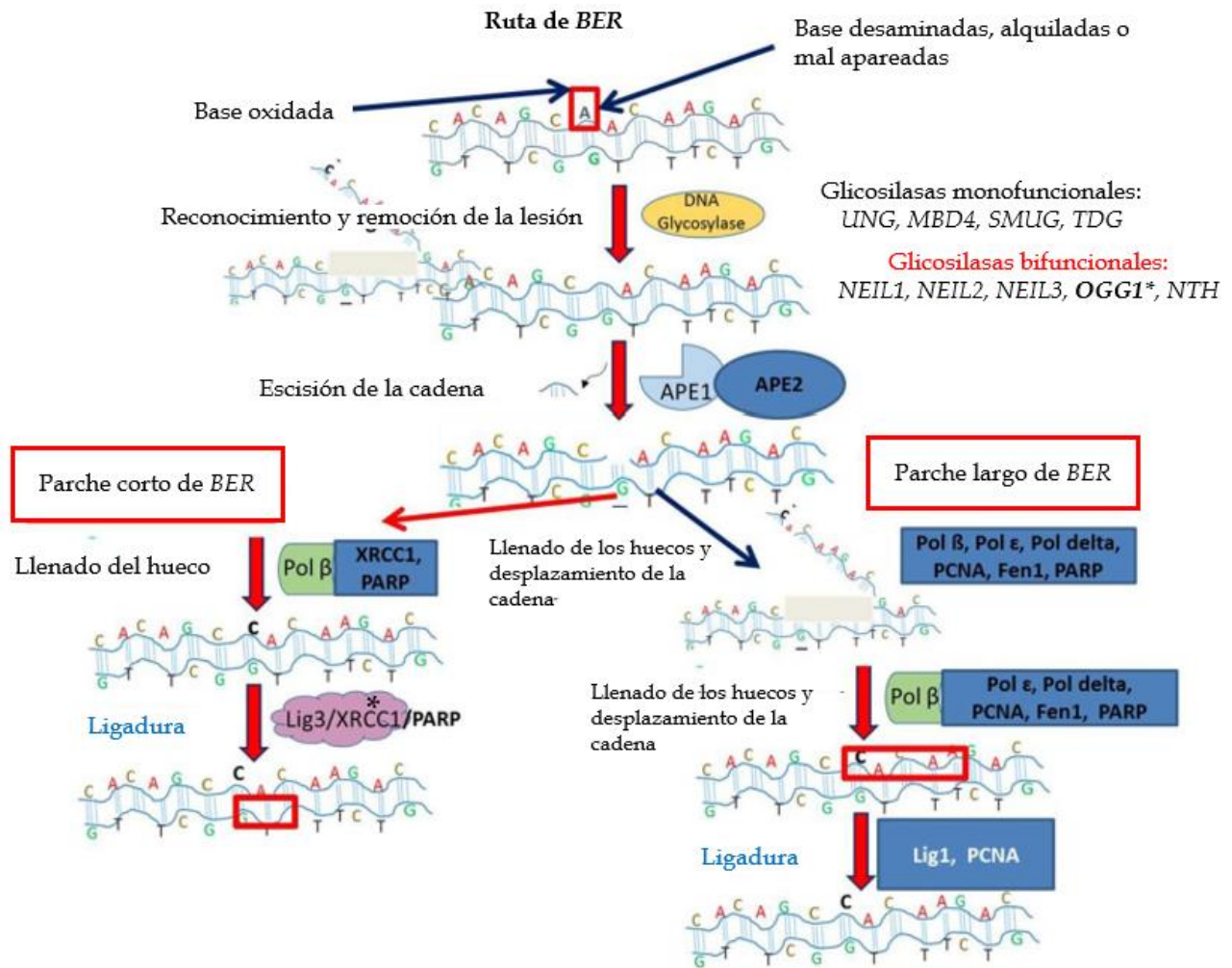


Figura 3. Ilustración de la vía de reparación por escisión de bases (BER). La ADN glicosilasa (*DNA glycosylase*) reconoce la lesión de daño. Además, la endonucleasa AP corta la base dañada. Seguido por el paso de llenado de huecos en el parche corto, BER es ejecutada por Pol β, la proteína de complemento cruzado de reparación de rayos X1 (*XRCC1*) y PARP. Para el parche largo, el relleno de huecos y el desplazamiento de la cadena se realizan mediante Pol β, Pol ε, Pol delta, antígeno nuclear de células proliferantes (*PCNA*), flap endonucleasa 1 (*Fen1*) y poli ADP ribosa polimerasa (*PARP*). El último paso de ligadura lo lleva a cabo la ADN ligasa III (*Lig3*) en un parche corto. En el parche largo, el paso de ligadura se completa con la ADN ligasa I (*Lig1*). Esquema tomado de Jain y cols. (2017). * Indica los genes evaluados en este estudio.

II. JUSTIFICACIÓN

El ensayo *in vivo* de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica en seres humanos ha sido poco usado por lo que hay poca información del daño genotóxico que se genera en este sistema. Esto ha sido adjudicado a algunos problemas técnicos, pues el tipo celular elegido para la evaluación no ha funcionado para muestras de seres humanos, como sí lo ha hecho en los modelos experimentales de rata y ratón. Esto conlleva a considerar la optimización del ensayo, considerando la mejora de la fijación, la tinción y la manipulación de las muestras (es decir, la temperatura y el tiempo bajo esa condición en el que pueden ser trasladadas las muestras sin que se altere su viabilidad).

Así, para este trabajo, primero se pretende optimizar algunos pasos del protocolo para desarrollar este ensayo, basándonos en tres métodos hasta ahora propuestos para muestras de sangre periférica de seres humanos, y después cuantificar la frecuencia de MN en sujetos sanos. Una parte del proyecto es definir ¿qué fijador conserva por mayor tiempo a las células de interés? Luego, ¿cuál colorante específico de ADN funciona mejor para identificar los MN? Y, después ¿qué temperatura es la óptima para trasladar las muestras desde el sitio de obtención hasta el sitio de análisis y por cuánto tiempo podrían estar bajo esa condición? Finalmente, una vez delimitados los parámetros óptimos para desarrollar el ensayo, la intención es conocer ¿cuál es la frecuencia basal de MN en las células eritroides de sangre periférica de donadores sanos que habitan en la Ciudad de México? Y establecer si ¿la frecuencia obtenida puede estar influenciada por la edad, el sexo, el tipo sanguíneo y los polimorfismos de los genes de reparación *OGGI Ser326Cis* y *XRCCI Arg399Gln*?

III. HIPÓTESIS

Optimizando el ensayo *in vivo* de reticulocitos micronucleados podremos homogeneizar, estandarizar y caracterizar la evaluación de daño genotóxico en el sistema eritroide de sangre periférica de seres humanos y conocer si en sujetos sanos algunos cofactores juegan un papel importante en la inducción de MN.

IV. OBJETIVOS

IV.I OBJETIVO GENERAL

- Optimizar aspectos técnicos del ensayo de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de seres humanos y estudiar la influencia que tienen algunos cofactores relevantes en los estudios de biomonitorio en la inducción del daño genotóxico observado en forma de MN en las células eritroides.

IV.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mejorar la fijación de las muestras de sangre periférica para preservar las células de interés por mayor tiempo.
- Identificar el colorante específico de ADN más sensible para determinar la presencia de MN en reticulocitos y eritrocitos de sangre periférica.
- Evaluar la temperatura y el tiempo más adecuados para el transporte de muestras desde sitios lejanos al laboratorio, antes de ser fijadas, de tal forma que no se pierda la muestra celular.
- Cuantificar la frecuencia basal de MN en reticulocitos y eritrocitos en sujetos sanos de distintos grupos de edad y de ambos sexos, que habitan en la Ciudad de México.
- Establecer si hay relación entre el nivel de MN en reticulocitos y eritrocitos de sangre periférica y la edad, el sexo, el tipo sanguíneo y los polimorfismos de los genes de reparación *OGG1 Ser326Cis* y *XRCC1 Arg399Gln*.

V. ANTECEDENTES

Hasta ahora, el ensayo *in vivo* de reticulocitos micronucleados en muestras de sangre periférica de seres humanos ha sido poco empleado debido a la dificultad para obtener el número celular adecuado para tener resultados robustos. No obstante, algunos grupos de trabajo como el de Abramsson y cols. (2000), Dertinger y cols. (2003) y Montero y cols. (2016) han propuesto diversos protocolos para implementar este ensayo. Aunque, los resultados reportados por los diferentes investigadores alrededor del mundo, que han evaluado el daño genotóxico en el sistema eritroide, resultan interesantes, se requiere proponer un método estándar que empleen la mayoría de los investigadores, de tal forma que los hallazgos encontrados puedan ser comparados. En la **tabla 1** se comparan diversos parámetros en los que difieren y coinciden las 3 metodologías propuestas por los grupos de estudio mencionados anteriormente. Además, se muestran algunos hallazgos que reportaron y que valdría la pena seguir estudiando.

Tabla 1

Metodologías para el ensayo in vivo de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de seres humanos.

	Abramsson y cols., 2000	Dertinger y cols., 2003	Montero y cols., 2016					
Fijación y preservación	Con PFA a temperatura ambiente	Con MET en ultracongelación	Con MET en ultracongelación					
Tipo de muestra	Sangre entera	Sangre entera	Sangre entera					
Obtención e identificación de reticulocitos	Perlas inmunomagnéticas conjugadas con anticuerpo anti-CD71 y NT	RNasa y Anti-CD71-FITC	Anti-CD71-PE y NT					
Subpoblación eritroide evaluada	RETCD71 (reticulocitos jóvenes)	RETCD71 (reticulocitos jóvenes) y ERIT (eritrocitos maduros)	RETCD71 (reticulocitos jóvenes), RET (reticulocitos) y ERIT (eritrocitos maduros)					
Tipo de tinción del ADN para identificar MN	HO (ADN)	YP (ADN y ARN)	HO (ADN)					
Tipo de citómetro de flujo	2 láseres	1 láser	2 láseres					
Hallazgos	Relación del incremento de MN con la edad	Mayor número de MN en RETCD71 que en ERIT	Mayor conteo de RET que RETCD71 evaluables					
	No diferencias entre hombres y mujeres	Más MN-RETCD71 y MN-ERIT en sujeto esplenectomizado que en sujetos con bazo funcional	Más MN en RETCD71 y RET que en ERIT					
	Mayor conteo de MN en sujetos del tipo sanguíneo A que del O		Más RETCD71 y MN-ERIT en niños que en adultos					
% MN en sujetos sanos	MN-RETCD71		MN-RETCD71		MN-RETCD71		MN-RET	
	Mujeres (1.38%)	Hombres (1.07%)	Adultos (0.09%)		Adultos (8.20%)	Niños (6.80%)	Adultos (2.50%)	Niños (1.50%)

PFA: paraformaldehido; MET: metanol; NT: naranja de tiazol; YP: Yoduro de propidio; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; HO: Hoechst 33342; CF: citometría de flujo

VI. METODOLOGÍA

La parte experimental de este proyecto se planteó en dos etapas. En la primera, se buscó optimizar algunos aspectos técnicos del ensayo *in vivo* de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de seres humanos y, en la segunda, obtener las frecuencias de MN en las células de SP de sujetos sanos de la Ciudad de México y determinar si algunos cofactores podrían influir en su inducción.

Para la primera etapa del proyecto se procesaron 6 muestras de sangre periférica de sujetos sanos (3 mujeres y 3 hombres). Se emplearon dos fijadores, metanol (MET) y paraformaldehído (PFA). Se realizaron tres formas de fijación: 1) en MET, 2) en PFA y 3) y muestras fijadas primero en PFA y luego en MET (las cuales nombramos como PM); con el fin de determinar cuál preservaba mejor las muestras y reducía el número de agregados celulares. También, se usaron dos colorantes que tiñen específicamente el ADN, DAPI y Hoechst 33342 (HO), para identificar los MN. Y finalmente, pensando en que las muestras pudieran ser enviadas de distintas regiones del país, donde las condiciones climáticas son variadas, se almacenaron las muestras a 4°C (en refrigeración), 25°C (temperatura ambiente) y 37°C (incubadora) por un máximo de 48 horas, antes de ser fijadas.

VI.1 FIJACIÓN

Este paso se realizó como lo reportado por Montero y cols. (2016). La fijación de las muestras con MET se realizó en una habitación con temperatura de 4°C. Previamente se diluyó heparina en una solución amortiguadora salina de bicarbonato (BBS) (0.9 g de NaCl (J. T. Baker, Lot. M47C56), 0.444 g de NaHCO₃ (Sigma, Lot.107F-0568; en 1 L de agua desionizada), 0.584 g de EDTA (Invitrogen, Lot. 1137951) y 0.200 g de NaN₃ (Gibco BRL, Lot. 1068434) en 1 L de agua destilada).

Se tomaron y colocaron 250 µL de sangre en 1.25 mL de solución heparinizada (500 U/mL) (Inhepar, Lot. C18J193) y se mezclaron con cuidado para homogeneizar. Posteriormente, se tomaron 400 µL y se colocaron en un criotubo que contenía 4 mL de metanol (ultracongelado a -80°C, 48 h antes) (J. T. Baker, Lot. Y32C31), cuidando que la punta de la pipeta estuviera 1 cm arriba del metanol y que la muestra cayera en el centro en un sólo impulso y que no tocara las paredes, posteriormente se agitó con vórtex, se tapó y se volvió a mezclar con vórtex durante 5 s y después, manualmente. Finalmente, las muestras fueron guardadas a -80°C en un ultracongelador hasta su uso.

Por otro lado, la fijación con PFA se llevó a cabo con base en lo reportado por Abramsson y cols. (2000), a temperatura ambiente. Se tomaron 500 µL de sangre y se colocaron en 2 mL de solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS, protocolo de R&D Systems a biotechne brand) (8 g de NaCl (J. T. Baker, Lot.

M47C56) y 5.9987 g NaH₂PO₄ (J. T. Baker, Lot.Y10C04) en 1 L de agua desionizada), después, en dos ocasiones, se centrifugaron durante 5 min a 400 g a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante. El botón obtenido fue resuspendido en 500 µL de PBS, centrifugado por 5 min a 400 g y el sobrenadante fue descartado. Enseguida y con cuidado, el botón fue mezclado en 400 µL de solución de dodecil sulfato sódico (SDS) (10 µg/mL PBS). Después de 1 min se añadieron 2.5 mL de solución al 2% de PFA (Aldrich, Lot. MKCD5529) mezclado con SDS (10 µg/mL PBS), manteniendo la agitación con vórtex. Finalmente, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

Para la fijación mixta, después de dos semanas de fijar en PFA, las muestras fueron colocadas en MET, y las etiquetamos como PM. Para ello, fueron centrifugadas a 287 g a 0°C por 8 min y se les retiró el sobrenadante. Enseguida, se añadieron y resuspendieron 2.9 mL de MET (ultracongelado por 48 h a -80°C). Se procedió a centrifugar, retirar el sobrenadante y añadir MET, dos veces más. Finalmente, en la tercera centrifugación, después de retirar el sobrenadante, se añadieron otros 2.9 mL de MET para almacenar las muestras en ultracongelación.

VI.II LAVADO DE MUESTRAS

Antes de procesar y analizar las muestras, estas deben ser lavadas para retirar el fijador en el que se conservaron.

Para las muestras fijadas en MET, se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de centrifuga que contenía 11 mL de BBS al 1% de suero fetal bovino (SFB) (ByProducts, Lot. FB515001) frío, mezclando por 5 s en vórtex. Enseguida, se realizó la centrifugación de las muestras a 300 g por 10 min a 4°C. Después, se aspiró el sobrenadante y se dejaron aproximadamente 100 µL del sobrenadante para resuspender el botón.

A las muestras fijadas en PFA, se les retiró el sobrenadante y se colocaron 2.5 mL de BBS al 4% de SFB. Luego, en dos ocasiones, se realizó la centrifugación a 300 g por 8 min a 0°C y se retiró el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 µL para poder resuspender el botón.

Las muestras fijadas con PM fueron lavadas bajo el mismo procedimiento que las de MET.

VI.III TINCIÓN DE MUESTRAS

Sin importar el fijador en el que fueron almacenadas las muestras, después de ser lavadas, se realizó la tinción, con base en lo reportado por Montero y cols. (2016), de la misma forma para todas ellas. La evaluación se realizó cada 4 semanas durante 3 meses. Además, se emplearon muestras de SP de rata para llevar a cabo la compensación requerida en citometría de flujo, debido a que contienen mayor proporción de reticulocitos que portan el antígeno CD71.

Se preparó la mezcla de anticuerpos conjugados con fluorocromos: anti-CD71-PE-Cy7 (BioLegend®, Lot. B268466) (marcaje de reticulocitos jóvenes, portadores del receptor de transferrina) y anti-CD61-PE (BioLegend®, Lot. B258932) (marcaje plaquetario, portadoras de la cadena de la integrina beta 3), junto con BBS con SFB 1%, en tubos de citometría como se indica en la **Tabla 2, especímenes 8 y 8 bis (primera incubación)**.

Tabla 2

Tinciones probadas con las muestras fijadas con MET, PFA o PM.

Especimen	Fluorocromos					BBS con SFB al 1%	Vol. Celular	BBS
	Antes de primera incubación		Antes de tercera incubación					
	Anti-CD61-PE	Anti-CD71-PE-Cy7	NT	HO	DAPI			
1 - Control negativo (humano)	-	-	-	-	-	75 µL	25 µL	2 mL
2 - Control positivo (rata)	1 µL (1%)	5 µL (5%)	0.4 µL (0.2%)	1.5 µL (0.075%)	-	69 µL	25 µL	2 mL
2 bis - Control positivo (rata)	1 µL (1%)	5 µL (5%)	0.4 µL (0.2%)	-	4 gotas	69 µL	25 µL	2 mL
3 - Control CD61 (humano)	1 µL (1%)	-	-	-	-	74 µL	25 µL	2 mL
4 - Control CD71 (rata)	-	5 µL (5%)	-	-	-	70 µL	25 µL	2 mL
5 - Control HO (humano)	-	-	-	1.5 µL (0.075%)	-	75 µL	25 µL	2 mL
6 - Control DAPI (humano)	-	-	-	-	4 gotas	75 µL	25 µL	2 mL
7 - Control NT (rata)	-	-	0.4 µL (0.2%)	-	-	75 µL	25 µL	2 mL
8 - Muestras de interés (humano)	1 µL (1%)	5 µL (5%)	0.4 µL (0.2%)	1.5 µL (0.075%)	-	69 µL	25 µL	2 mL
8 bis - Muestras de interés (humano)	1 µL (1%)	5 µL (5%)	0.4 µL (0.2%)	-	4 gotas	69 µL	25 µL	2 mL
9 - Muestras de interés HO (humano)	-	-	0.4 µL (0.2%)	1.5 µL (0.075%)	-	75 µL	25 µL	2 mL
9 bis - Muestras de interés DAPI (humano)	-	-	0.4 µL (0.2%)	-	4 gotas	75 µL	25 µL	2 mL

Cantidades empleadas de los colorantes por cada muestra. Los controles negativos incluyen a las muestras que no tienen anticuerpos y aquellas que sólo tienen un anticuerpo de los dos empleados, las que además no tendrán los colorantes para ARN y ADN. Dado que se evaluaron dos colorantes del ADN, HO y DAPI, cada muestra de interés (de humano) así como el control positivo (de rata), desde el principio de la tinción, fueron procesadas por duplicado para que en este punto una pudiera ser teñida con HO y otra con DAPI. El empaque de DAPI (Invitrogen, Lot. 1921604) no contenía información sobre la concentración de este colorante, solo la indicación de colocar 2 gotas por cada mL.

A la par, se prepararon los controles con un único colorante para la compensación en el equipo citométrico, añadiendo los anticuerpos y BBS con SFB 1%, como se indica en la **Tabla 2, especímenes 1, 3, 4, 5, 6 y 7 (antes de primera incubación)**. Los controles positivos de rata tenían anticuerpos y BBS con SFB 1% (**Tabla 2, especímenes 2 y 2 bis; antes de primera incubación**), los cuales fueron empleados para corroborar que la tinción se efectuó correctamente, ya que las ratas tienen mayor conteo de reticulocitos

de sangre periférica comparado con los seres humanos. También se empleó un control negativo, el cual solo contenía BBS con SFB 1% (**Tabla 2, espécimen 1**).

Una vez preparada la mezcla, se colocaron 25 μ L del volumen celular proveniente de muestras de rata o de seres humanos (**Tabla 2**), según fuera el caso, para alcanzar un volumen final de 100 μ L. En el caso de los controles de un único colorante se empleó la sangre del organismo indicado para cada uno (**Tabla 2**).

Enseguida, las muestras fueron puestas en incubación a 2.5°C durante 30 minutos (**primera incubación**) y luego a temperatura ambiente (25°C) por 60 minutos (**segunda incubación**), en condiciones de oscuridad.

En otro experimento, es decir, para evaluar los colorantes de tinción de ADN, Hoechst 33342 (HO) y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), la adición de anticuerpos conjugados con fluorocromos, descrito en el párrafo anterior, no se realizó. Así, en este paso, sólo se incubaron 75 μ L de BBS con SFB 1% y 25 μ L del botón celular (**Tabla 2, especímenes 9 y 9 bis**) (**antes de primera incubación**), por 30 min a 2.5°C (**primera incubación**) y después a temperatura ambiente por 60 min (**segunda incubación**).

Al finalizar la segunda incubación se añadieron 2 mL de BBS junto con el colorante naranja de tiazol (NT) (stock: 2 mg en 2 mL metanol) (Sigma, Lot. MRBL5381V) (**Tabla 2, especímenes 2, 2 bis, 7, 8, 8 bis, 9 y 9 bis**), que tiñe ARN y sirvió para la identificación de RET, y, ya sea HO (stock: 500 μ M en diH₂O) o DAPI, como se indica en la **Tabla 2 (especímenes 2, 2 bis, 8, 8 bis, 9 y 9 bis**, respectivamente) (**antes de tercera incubación**). Para el control negativo y los controles de un único colorante (**especímenes 1, 3, 4, 5 y 6**) se añadieron 2 mL de BBS. A los **especímenes 5 y 6 (Tabla 2)** se les añadió solamente HO o DAPI, respectivamente. Al control del colorante NT se añadieron 2 mL de BBS con 0.4 μ L del stock dicho colorante (**Tabla 2, espécimen 7**). Todas las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora. Los **especímenes 2 bis, 6, 8 bis y 9 bis** fueron incubados a 37°C durante 45 min, antes de añadir el colorante DAPI. Una vez añadido se volvieron a incubar por 15 minutos a la misma temperatura. Después de este tiempo, se dejaron reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron guardadas en refrigeración cubriéndolas de la luz (máximo 6 horas para evitar la pérdida de la fluorescencia de los colorantes y los fluorocromos) o colocadas en una hielera para trasladarlas y analizarlas en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT), del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

VI.IV ADQUISICIÓN DE EVENTOS EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO

Después de la tinción, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo hidrodinámico acústico Attune® azul-violeta. En este equipo se pueden detectar las emisiones de onda de fluoróforos o colorantes que sean excitados con una longitud de onda de 488 nm por el láser azul y 405 nm por el violeta. Las emisiones de ellos pueden ser detectadas por 6 canales distintos, dependiendo de la onda de excitación, tanto el láser azul como el violeta cuentan con 3 canales de detección, BL1, BL2 y BL3 del primero y VL1, VL2 y VL3 del segundo.

Los fluorocromos, su láser de excitación, longitud de emisión, canal de detección y qué identifican, que fueron empleados en este trabajo están enlistados en la **Tabla 3**.

Tabla 3
Fluorocromos y colorantes usados en este trabajo.

Canal detector	Láser de excitación	Fluorocromo	Espectro de emisión (nm)	Marcador celular
BL1-H	Azul	NT	533	ARN
BL2-H	Azul	PE	570	CD61
BL3-H	Azul	PE-Cy7	780	CD71
VL1-H	Violeta	HO / DAPI	460 / 458	ADN

Tomada de Montero y col. (2016). NT: naranja de tiazol, PE: ficoeritrina, PE-Cy7: ficoeritrina cianina 7, HO: Hoechst 33342, y DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

A continuación, a partir de R2, los histogramas fueron editados en el eje X para que cada histograma mostrará la fluorescencia de los fluorocromos y colorantes usados. En el primer histograma se seleccionó la fluorescencia detectada en el canal BL1, es decir, la emitida por NT (**Fig. 4c**); en el segundo, aquella en el canal BL3, emisión de ficoeritrina cianina 7 (PE-Cy7) conjugado con anti-CD71 (**Fig. 4d**); en el tercero se graficó el canal BL2, emisión de ficoeritrina (PE) que estaba conjugado con el anti-CD61 (**Fig. 4e**); y en el cuarto, en el VL1, emisión de HO ó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (**Fig. 4f**). En cada uno de los histogramas se delimitaron otras regiones: R3, R4, R5 y R6, respectivamente, conteniendo a las células que dieron positivo a cada coloración.

Para poder adquirir los eventos en el CF, en primera instancia es necesario que se realice la compensación. Este procedimiento permite que los colorantes que tengan emisiones de onda cercanas no sean adquiridos como positivos por diferentes canales. En este caso se emplearon los especímenes 1, 3, 4, 5 y 6 de la **Tabla 2** y se ajustaron los voltajes para cada histograma (dados de forma predeterminada), los cuales quedaron de la siguiente forma: SSC-H de 2300 V, FSC-H de 2500 V, BL1-H de 2000 V, BL2-H de 2000, BL3-H de 2100 V y VL1-H de 1600 V. Los voltajes se ajustan para colocar a la población negativa de manera homogénea para cada histograma, los cuales sirven para identificar a las células fluorescentes para cada fluoroforo empleado.

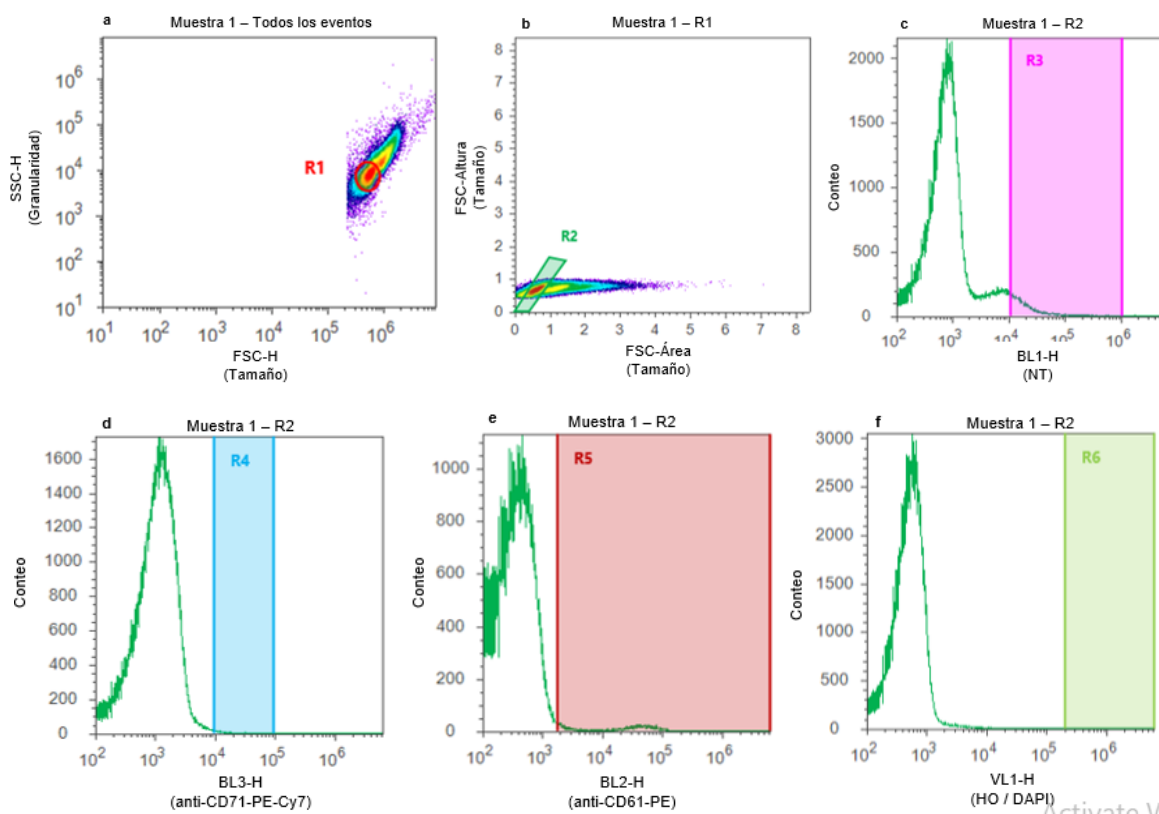


Figura 4. Área de trabajo para adquirir datos: **a)** En la primera gráfica se delimitó R1 (células eritroides); **b)** en la segunda, a partir de R1 (ver encabezado de la gráfica), fue delimitada R2 (células individuales); **c)** el primer histograma muestra las células positivas a NT en la población R2 (ver encabezado del histograma) (y se delimitó R3); **d)** el segundo, las células positivas a CD71 (R4); **e)** el tercero, las células positivas a CD61 (R5); **f)** el último corresponde a las células positivas a HO o DAPI; aquí sólo se delimitó a las células nucleadas (R6) para poder excluirlas.

Una vez obtenida la compensación, se ocupó el control positivo (especimen 2 de la **Tabla 2**) para corroborar que la tinción se hizo correctamente y después se analizaron las muestras de interés. En el histograma del canal BL1-H añadido al principio por cada lectura se obtuvieron entre 1500 a 3000 RET positivos al colorante NT, dependiendo de la muestra. Para asegurar un buen número de células para evaluar MN, se realizaron 6 lecturas o adquisiciones por cada muestra, empleando para cada una 300 μ L. Al final, los datos fueron recopilados en un archivo que fue enviado a otro computador para poder analizar los datos y obtener el conteo de MN.

VI.V OBTENCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MN EN EL SISTEMA ERITROIDE DE SP

Para analizar los datos capturados en el citómetro se ocupó el software Attune® versión 2.1. Primeramente, se eligió R2 como la única población celular a evaluar, es decir, a las células individuales de la sangre, probablemente eritroides en su mayoría. Después, a partir de las regiones (R3-R6), demarcadas en los histogramas durante la adquisición, se generaron regiones derivadas de la siguiente manera: NOTR5 para

excluir a las plaquetas y NOTR6 para excluir a las células nucleadas, luego, se seleccionaron en conjunto estas dos compuertas (NOTR5&NOTR6), y con esta se generó la compuerta derivada NOTR5&NOTR6&R2, donde nos aseguramos de no incluir en el análisis células nucleadas ni plaquetas.

Enseguida se insertaron dos nuevas gráficas de densidad; en una de ellas se seleccionó la compuerta derivada generada anteriormente para evaluar solamente las células de interés y se delimitaron con un cuadrante 4 nuevas regiones (R7-R10) (**Fig. 5a**); en la segunda, a partir de una nueva compuerta generada con la suma de R7 y R8 (R7 OR R8), se delimitaron otras 4 regiones (R11-R14) (**Fig. 5b**). En ambas se seleccionó el parámetro VL1-H-HO/DAPI en el eje X y BL1-H-NT en el eje Y de una, y BL3-H-anti-CD71-PE-Cy7 en el eje Y de la otra (**fig. 5a-b**).

De la primera gráfica se obtuvieron los siguientes datos (**Fig. 5a**): células positivas a NT, es decir, los RET (R7); positivas a NT y HO/DAPI que son los reticulocitos micronucleados (MN-RET) (R8); células doblemente negativas (NT-/HO- ó DAPI-) que son los ERIT identificaos en R9; y los eritrocitos micronucleados (MN-ERIT) en R10, que fueron negativos a NT y positivos a HO o DAPI.

En la otra gráfica se obtuvieron: células positivas al receptor CD71 que son los reticulocitos más jóvenes de SP (RETCD71) (R11); reticulocitos positivos a CD71 con MN (MN-RETCD71) (R12); RET (R13), que son negativos para CD71 y HO/DAPI, solo contienen ARN; reticulocitos con ARN que son positivos a HO/DAPI y negativos a CD71 (MN-RET) (R14).

La información de cada gráfico fue registrada en una hoja de Excel. Los datos de cada muestra se sumaron, ya que se obtuvieron 6 gráficas debido a que hubo 6 adquisiciones por cada muestra, y finalmente se calcularon las frecuencias para cada parámetro (RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT) como se indica en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Obtención de frecuencias de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT.

Parámetros determinados	Regiones específicas / subpoblación evaluada*
Frec. RET	$[(R7+R8) / (NOT-R5 \text{ AND } NOT-R6 \text{ AND } R2)] \times 100$
Frec. RETCD71	$[(R11+R12) / (NOT-R5 \text{ AND } NOT-R6 \text{ AND } R2)] \times 100$
Frec. MN-RET	$[R8 / (R7+R8)] \times 100$ (sólo reticulocitos NT+)
Frec. MN-ERIT	$[R10 / (R9 + R10)] \times 100$ (sólo eritrocitos maduros)
Frec. MN-RETCD71	$[R12 / (R11+R12)] \times 100$ (sólo reticulocitos CD71+)
Frec. células individuales	$R2/R1 \times 100$

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

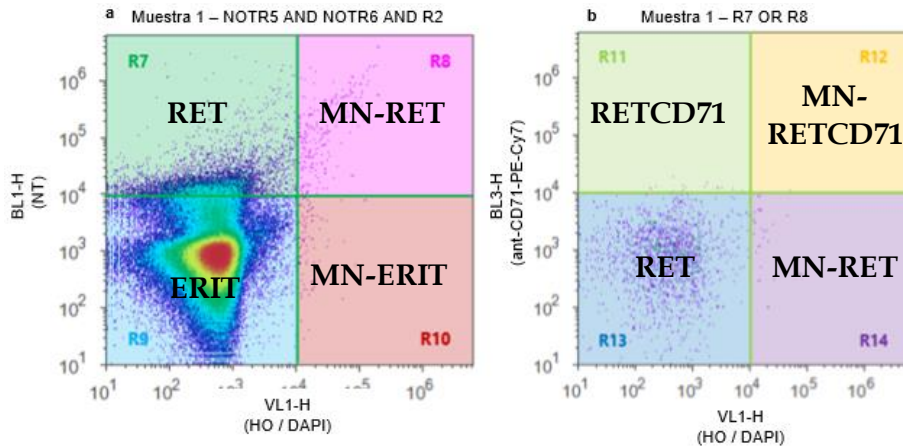


Figura 5. Gráficas de puntos a partir de las cuales se pudieron obtener el conteo de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT.

VI.VI TEMPERATURAS

Una vez que se eligió el tipo de fijación y de tinción del ADN que se realizaría, se desarrolló este experimento para establecer cuál sería la forma óptima de preservar las muestras en caso de un estudio de monitoreo y de tener que trasladar las muestras desde largas distancias.

Se obtuvieron nuevas muestras de sangre periférica de 6 donadores con tubos vacutainer con heparina sódica. De cada muestra se tomaron 250 μ L para ser fijados bajo el procedimiento de MET. El resto de la muestra sanguínea fue repartida en 3 tubos con perlas de heparina sódica. De los 3 tubos por muestra, uno fue guardado en refrigeración a 4°C, el otro a temperatura ambiente (que era de 25°C) y el tercero, en la incubadora a 37°C. Después de 12 h, 24 h y 48 h se tomó parte de la muestra y se fijó en MET.

Todas las muestras fueron procesadas bajo los procedimientos descritos con anterioridad para las células fijadas en MET y, al momento de la tinción, se empleó HO. A su vez, fueron analizadas bajo las mismas condiciones descritas en la sección IV.II.IV usando la citometría de flujo. Finalmente, los parámetros RET, RETCD71 y ERIT fueron obtenidos como en el apartado de “obtención de las frecuencias de MN en el sistema eritroide de SP”.

VI.VII ESTUDIO DE BIOMONITOREO - FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS

Después de establecer cuál fijación, qué colorante y qué temperatura de almacenamiento eran los óptimos, se realizaron los procedimientos para analizar las muestras de los donadores como se planteó anteriormente.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, basado en el código de ética para personal académico y regulaciones nacionales e internacionales.

Los participantes fueron informados sobre los requerimientos y objetivos de este trabajo, y en caso de estar de acuerdo firmaron una carta de consentimiento informado, tanto adultos como los padres de los niños que aceptaron participar. También se les aplicó un cuestionario para determinar si los individuos podrían ser seleccionados en el estudio (**anexo, Fig. A1**). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: no fumadores (ni pasivos ni activos), no bebedores crónicos, que no fueran diabéticos, ni obesos, ni hipertensos, que no les hubieran realizado ninguna radiografía ni que hubieran padecido alguna enfermedad viral en el último mes. Se obtuvieron 90 muestras de sangre periférica de habitantes sanos de la Ciudad de México. Las muestras se tomaron con material nuevo y estéril, y fueron colectadas en un tubo Vacutainer con heparina sódica para evitar la formación de coágulos.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 90 donadores sanos, habitantes de las zonas centro, sur y oriente de la Ciudad de México. Todos fueron notificados sobre los requerimientos y objetivos de este estudio para que así pudieran firmar la carta de consentimiento informado. En adición, se les aplicó un cuestionario para conocer algunas características de los participantes y solamente considerar individuos que cumplieran con los criterios de inclusión. Es decir, se incluyeron individuos que no hubieran presentado algún tipo de enfermedad aguda o crónica, que no se hubieran realizado alguna radiografía en el último mes, así como no se hubieran hecho tatuajes o perforaciones en los últimos seis meses, y que no fueran fumadores ni alcohólicos.

Las muestras obtenidas se transportaron al laboratorio en las 2 horas siguientes a la toma de la muestra. Así, incluimos un total de 52 mujeres y 38 hombres, los cuales además dividimos por grupos de edad, teniendo 38 niños (6-18 años) y 52 adultos (19 años en adelante).

VI.VIII CUANTIFICACIÓN DE MN EN EL SISTEMA ERITROIDE DE SP EMPLEANDO CF

Para la obtención de las frecuencias de MN en las células eritroides de sangre periférica, se siguió el mismo procedimiento descrito en los apartados de la fijación hasta el de la obtención de las frecuencias de MN en el sistema eritroide de SP, considerando la fijación y el lavado para las muestras en MET, y la tinción del ADN fue con HO.

VI.IX DETERMINACIÓN DE TIPO SANGUÍNEO

Para determinar el tipo sanguíneo se ocupó un kit de SPINREACT que contenía 4 reactivos, cada uno con diferentes anticuerpos monoclonales: 3 IgM para establecer el tipo sanguíneo (ABO) y 1 anti-D IgG + IgM para determinar el Rh (+/-).

En un portaobjetos se combinaron 5 μ L de sangre con 5 μ L de reactivo, cada uno por separado, como se observa en la **Figura 8**. Los resultados se consideraron positivos si se observaba una reacción de aglutinación inmediata; en caso contrario, se tomaron como negativos.

VI.X DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS FENOTÍPICAS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO RH

Las frecuencias alélicas se calcularon como lo indican las siguientes formulas:

O Rh+ = no. individuos O Rh+ / total de individuos

A Rh+ = no. individuos A Rh+ / total de individuos

B Rh+ = no. individuos B Rh+ / total de individuos

O Rh- = no. individuos O Rh- / total de individuos

A Rh- = no. individuos A Rh- / total de individuos

B Rh- = no. individuos B Rh- / total de individuos

Total de A, B y O Rh- = sumatoria de individuos A, B y O Rh- / total de individuos

Rh + = no. individuos Rh+ / total de individuos

Rh - = no. individuos Rh- / total de individuos

VI.XI EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

De cada individuo se emplearon 200 μ L de sangre periférica para extraer el ADN utilizando un Kit de QIAGEN; se siguieron las instrucciones del fabricante. Para cuantificarlo se empleó un nanodrop ND.1000 V3.8.1.

VI.XII AMPLIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE REPARACIÓN OGG1 SER326CIS

Se amplificaron 90 muestras de los donadores para *OGG1*, con base en lo propuesto por De Ruyck y cols. (2004). Para cada muestra se preparó una mezcla de la siguiente forma: 15.8 μ L de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas, 2.5 μ L de amortiguador MPCR (2 mM de MgCl₂), 1 μ L del oligonucleótido

OGG1RV (20 μ M) (Sec. CTGTTGCTGTCGAGACTGC) (T4 Oligo, ID. D0584), 1 μ L del oligonucleótido OGG1FW (Sec. GTGGATTCTCATTGCCTTCG) (20 μ M) (T4 Oligo, ID. D0583), 2 μ L de dNTPs (2 mM) (Invitrogen, Lot. 2079038), 0.2 μ L de la enzima Taq Polimerasa Recombinante (1 U / μ L) (Invitrogen, Lot. 1144065) y 2.5 μ L del ADN purificado. La amplificación del gen *OGG1* se realizó en un termociclador Mastercycler® gradient 5331 de Eppendorf Scientific, Inc. El programa de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fue de 32 ciclos, iniciando con un primer paso a una temperatura de 95°C por 3 min continuado por ciclos de 1 min a 95°C, 40 seg a 62°C y 1 min a 72°C; al término de los ciclos se programó una elongación final de 5 min a 72°C. El producto de la amplificación por PCR fue un fragmento de 553 pb (pares de bases) (*véase Fig. 10*). Para corroborar la amplificación del gen *OGG1*, se tomaron 5 μ L del producto de PCR y se corrieron en una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% durante 40 min a 80 volts; para visualizar el producto de amplificación se utilizó tinción con el colorante Midori Green (1 μ L) (NIPPON EUROPE, Lot. 978MG02045) y luz ultravioleta (UV). Cada imagen se almacenó en una computadora.

En cuanto a la determinación de los polimorfismos de este gen, dados por la enzima de restricción *Fnu4HI* (Bio Labs, Lot. 10033055), se realizó la digestión o corte del producto de PCR. Para cada muestra, se tomaron 10 μ L de la mezcla de reacción y se les adicionaron 1.5 μ L del mismo amortiguador (1X) (Bio Labs, Lot. 10031565), 3.3 μ L de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas y 0.2 μ L de la enzima de restricción. Cada tubo fue sellado con parafilm y se colocaron en incubación a 37°C por un periodo máximo de 16 horas. Para observar la digestión, se corrió un gel de agarosa al 3% durante 50 min a 70 volts, el cual se tiñó también con 1 μ L de Midori Green y se reveló con luz UV. El establecimiento del polimorfismo dado por la enzima *Fnu4HI* se obtuvo de la siguiente manera: el homocigoto nativo (Ser/Ser) presentó una banda de 553 pb, el homocigoto mutante (Cis/Cis) dos bandas de 399 pb y 154 pb, y el heterocigoto (Ser/Cis) tres bandas de 553 pb, 399 pb y 154 pb. Cada gel fue documentado con foto e identificación de cada donador. A partir de estos resultados, se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas.

VI.XIII AMPLIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO DE XRCC1 ARG399GLN

Se amplificaron 90 muestras de los donadores para determinar este polimorfismo en *XRCC1*, con el protocolo de Duell y cols. (2000) y Wong y cols. (2002). Para cada muestra se preparó una mezcla de la siguiente forma: 13.3 μ L de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas, 2.5 μ L de amortiguador LPCR (1 mM de $MgCl_2$), 1 μ L del oligonucleótido XRCC1RV (20 μ M) (Sec. CCCCAAGTACAGCCAGGTC) (Invitrogen, Lot. 257785G01), 1 μ L del oligonucleótido XRCC1FW (20 μ M) (Sec.

TGTCCCGCTCCTCTCAGTAG) (Invitrogen, Lot. 2557785F12), 2 μ L de dNTPs (2 mM) (Invitrogen, Lot. 2079038), 0.2 μ L de la enzima Taq Polimerasa Recombinante (1 U / μ L) (Invitrogen, Lot. 1003668) y 5 μ L del ADN purificado. La amplificación del gen *XRCCI* se realizó en un termociclador Mastercycler® Gradient 5331 de Eppendorf Scientific, Inc. El programa de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fue de 35 ciclos, iniciando con un primer paso a una temperatura de 94°C por 4 min continuado por ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C; al término de los ciclos se programó una elongación final de 10 min a 72°C. El producto de la amplificación por PCR fue un fragmento de 242 pb. Para corroborar la amplificación del gen *XRCCI*, se tomaron 5 μ L del producto de PCR y se corrieron en una electroforesis en un gel de agarosa al 2% durante 50 min a 70 volts; para visualizar el producto de amplificación se utilizó tinción con el colorante Midori Green (1 μ L) o SYBR (1.5 μ L / 3 mL) (Invitrogen, Lot. 2107413) y luz ultravioleta (UV). Cada imagen se almacenó en la computadora.

En cuanto a la determinación de los polimorfismos de este gen, dados por la enzima de restricción *MspI* (Bio Labs, Lot. 0551303), se realizó la digestión o corte del producto de PCR, tomando 20 μ L de la reacción. Para cada muestra, además se adicionaron 2.5 μ L del amortiguador de reacción (1X) (Bio labs, Lot. 0221302), 2.3 μ L de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas y 0.2 μ L de la enzima de restricción. Cada tubo fue sellado con parafilm y se colocaron en incubación a 37°C por un periodo máximo de 16 horas. Para observar la digestión, se corrió un gel de agarosa al 4% durante 60 min a 70 volts, el cual se tiñó también con 1 μ L de Midori Green o SYBR y se reveló con luz UV. El establecimiento del polimorfismo dado por la enzima *MsPI* se obtuvo de la siguiente manera: el homocigoto nativo (Arg/Arg) presentó una banda de 242 pb, el homocigoto mutante (Gln/Gln) dos bandas de 148 pb y 94 pb, y el heterocigoto (Arg/Gln) tres bandas de 242 pb, 148 pb y 94 pb (*ver Fig. 13*). Cada gel fue fotografiado y guardado y con estos datos se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas.

VI.XIV OBTENCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS, ALÉLICAS Y DETERMINACIÓN DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG DE LOS POLIMORFISMOS

* Las frecuencias genotípicas para cada polimorfismo se calcularon de la siguiente manera:

p^2 = no. de homocigotos nativos / no. total de individuos.

$2pq$ = no. de heterocigotos / no. total de individuos.

q^2 = no. de homocigotos mutantes / no. total de individuos.

* Las frecuencias alélicas para cada polimorfismo se calcularon con las siguientes fórmulas:

$f(A=p) = [p^2 + \frac{1}{2} (2pq)] / p^2 + 2pq + q^2$, donde A es el alelo nativo o silvestre.

$f(a=q) = [\frac{1}{2} (2pq) + q^2] / p^2 + 2pq + q^2$, donde a es el alelo mutante.

* Para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg se empleó la siguiente fórmula:

$\chi^2 = \sum (\mathbf{o} - \mathbf{e})^2 / \mathbf{e}$, donde **o** son los observados y **e** los esperados, y el valor obtenido se comparó con tablas de χ^2 .

VI.XV ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada experimento se realizó la estadística descriptiva y una prueba de normalidad para tener la distribución de los datos. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos para todas las pruebas estadísticas empleadas. Los paquetes estadísticos empleados fueron GraphPad Prism® 6.01 y STATA®.

Para determinar la fijación más adecuada para las muestras, se emplearon los datos ya procesados de CF y se realizó una prueba estadística de Kruskal-Wallis para establecer si existía diferencia entre las tres formas de fijación en cuanto al conteo de células individuales y RET. También se aplicó la prueba post hoc de Dunn para definir cuáles difirieron, si era el caso.

En cuanto a la evaluación de los colorantes del ADN, se usó la prueba estadística U de Mann-Whitney (U de M-W) para poder decidir si había diferencias entre HO y DAPI en su capacidad de teñir el ADN para la identificación de MN en las células de interés (RET, RETCD71 y ERIT).

Respecto al experimento de las temperaturas, se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis (K-W) para establecer si existía diferencia entre ellas en cuanto al conteo de RET, RETCD71 y ERIT, y se realizó una prueba post hoc para definir cuáles fueron diferentes.

Por otro lado, con los resultados obtenidos de las muestras de los participantes en este estudio se obtuvo la estadística descriptiva y también se evaluó si existía una relación entre el conteo de MN y la edad, el sexo, el tipo sanguíneo, y los polimorfismos genéticos de *OGG1 Ser326Cis* y *XRCC1 Arg399Gln*. Para ello, se realizaron múltiples pruebas estadísticas.

La prueba estadística de U de de M-W se aplicó para establecer si habían diferencias en el conteo de MN entre niños (6-18 años) y adultos (>18 años) y entre mujeres y hombres. En adición, se implementó la prueba de Kruskal-Wallis para establecer si había diferencias en el conteo de MN dependiendo del tipo sanguíneo (A+, B+, O+) y de los polimorfismos de *OGG1 Ser326Cis* (Ser/Ser, Ser/Cis y Cis/Cis) y de

XRCC1 Arg399Gln (Arg/Arg, Arg/Gln y Gln/Gln). En caso de tener un valor de $p < 0.05$ se realizó la prueba estadística post hoc de Dunn para definir cuáles difirieron.

También se aplicó una regresión lineal bivariada, considerando edad y sexo, y edad y tipo sanguíneo para ver cómo se comportaban estas variables en la inducción diferencial de micronúcleos.

VII. RESULTADOS

VII.1 SELECCIÓN DE LA FIJACIÓN

Para establecer qué tipo de fijación redujo el número de agregados celulares, cuantificamos las células individuales; por otro lado para determinar cuál preservó mejor a las células de interés, que fueron los reticulocitos, los cuantificamos.

Dos semanas después de haber fijado las muestras se realizó la primera evaluación. Se obtuvo que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el conteo de reticulocitos entre MET, PFA ni PM ($p > 0.05$) (*Fig. 6 semana 2; anexo, Tabla 1a*). Sin embargo, las muestras fijadas en PFA tuvieron cambios físicos, ya que se formaron coágulos, lo que volvió difícil su manipulación. Por lo tanto, tuvimos que descartar las células que fueron fijadas en PFA en las subsecuentes evaluaciones.

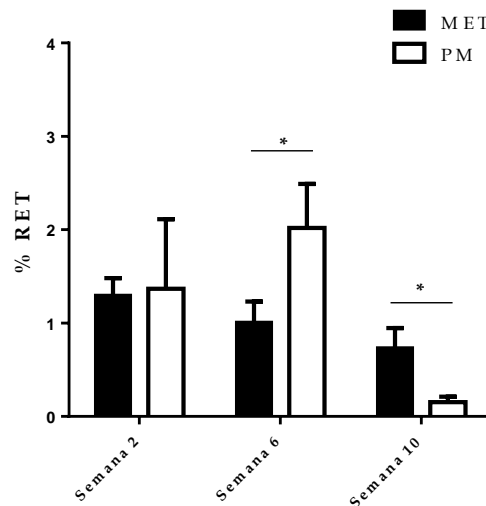


Figura 6. Porcentaje de reticulocitos a largo del tiempo de muestras fijadas en MET y PM. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el conteo de reticulocitos entre MET y PM (semana 2) ($p > 0.05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el conteo de reticulocitos entre MET y PM ($p < 0.05$) (semanas 6 y 10). Se observa mayor variabilidad en las muestras fijadas con PM; mientras que las muestras fijadas en MET se mantuvieron con la menor variabilidad a lo largo del tiempo.

Seis semanas después de haber fijado las muestras, se volvió a realizar la cuantificación de las células de interés. Obtuvimos que el porcentaje de reticulocitos, en las muestras fijadas en MET se mantuvo similar a la primera evaluación y disminuyeron en las de PM (*Fig. 6 semana 6; anexo, Tabla 2a*). También hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Finalmente, diez semanas después de fijar las muestras se realizó una última evaluación. Encontramos que el porcentaje de reticulocitos en MET se mantuvo en el rango de las anteriores evaluaciones y en PM disminuyó drásticamente comparado con los conteos anteriores. Hubo diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0.05$) (**Fig. 6 semana 10; anexo, Tabla 3a**). Así, con los datos obtenidos se consideró realizar la fijación con MET para los futuros experimentos.

VII.II ELECCIÓN DEL COLORANTE DE TINCIÓN DEL ADN

El objetivo de este experimento fue determinar qué colorante específico de ADN, HO o DAPI, resultaba más eficiente y sensible para la identificación de MN y células nucleadas positivas a esta tinción.

Obtuvimos que para la identificación de células nucleadas no hubo diferencias entre HO y DAPI para identificarlas en el citómetro ($p > 0.05$); obtuvimos conteos muy similares entre uno y otro (**Tabla 5**). En cuanto al valor de MN en reticulocitos (MN-RET) tampoco hubo diferencias entre ambos colorantes ($p > 0.05$) (**Tabla 5**). Finalmente, el conteo de MN en eritrocitos (MN-ERIT), aun cuando se obtuvo que las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) (**Tabla 5**).

Sin embargo, en lo relativo al tiempo de tratamiento, sí resultaba más eficiente la tinción con HO, debido a que el tiempo de procesamiento de varias muestras a la vez se hizo en menor tiempo; mientras que con DAPI es necesario añadir un paso extra de procedimiento que al momento de trabajar con varias muestras resulta muy laborioso, pues incrementa alrededor de 25 minutos más en el procesamiento de 10 muestras. Con esta información se decidió emplear HO para identificar a los MN en el resto de los experimentos.

Tabla 5

Diferencias en la capacidad de tinción de células nucleadas, MN-RET y MN-ERIT entre HO 33342 y DAPI.

%	HO (n=6)				DAPI (n=6)				P *
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
Células nucleadas	0.15 (± 0.12)	0.13	0.03	0.30	0.10 (± 0.06)	0.08	0.03	0.18	0.5714
MN-RET	3.91 (± 2.51)	3.17	1.05	7.23	3.50 (± 1.69)	3.19	1.88	6.24	0.7879
MN-ERIT	0.09 (± 0.10)	0.07	0.007	0.21	0.04 (± 0.04)	0.04	0.007	0.08	0.3874

HO: Hoechst 33342; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol. Las comparaciones se hicieron entre HO y DAPI. No hubo diferencias estadísticamente significativas en su capacidad de teñir ADN ($p > 0.05$).

VII.III ESTABLECIMIENTO DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE TRASLADO

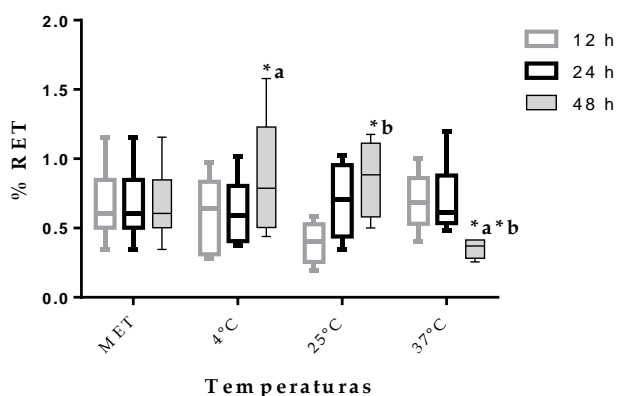
El objetivo de este experimento fue determinar si había diferencias en el conteo de RET, RETCD71 y ERIT, debido a la temperatura de almacenamiento antes de fijar las muestras, condiciones a las cuales se podrían transportar. Como controles de referencia se usaron muestras fijadas en MET inmediatamente después de su obtención.

El conteo de RET, RETCD71 y ERIT de las muestras preservadas durante 12 horas bajo las temperaturas de 4°C, 25°C (temperatura ambiente) y 37°C (en incubadora), antes de ser fijadas, no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) (**Fig. 7A,B y C; anexo, Fig. A2a,b y c; Tabla 4a**).

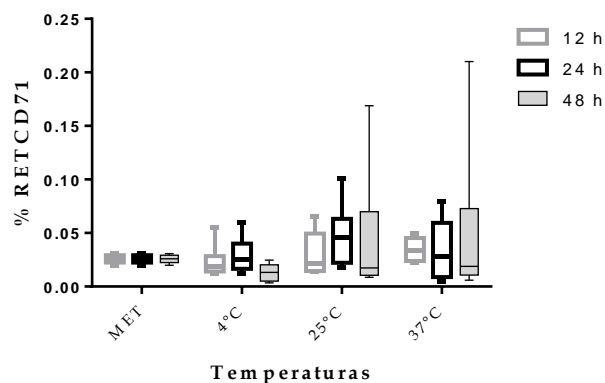
Entre las muestras que fueron fijadas 24 horas después de mantenerlas bajo las diferentes temperaturas, no se encontraron diferencias en el conteo de RET, RETCD71 y ERIT ($p>0.05$) (**Fig. 7A,B,C, e, f; anexo, Fig. A2d,e,f y Tabla 5a**).

Finalmente, de las muestras que estuvieron preservadas por 48 horas a diferentes temperaturas antes de ser fijadas, encontramos que el conteo de RET disminuyó en las que estuvieron a 37°C y fue estadísticamente diferente de las preservadas a 4°C y 25°C ($p<0.05$) (**Fig. 7A; anexo, Fig. A2g y Tabla 6a**). El conteo de RETCD71 fue similar a lo previamente obtenido; hubo diferencias estadísticamente significativas en el conteo de RETCD71 entre las muestras almacenadas a 4°C con respecto a las fijadas inmediatamente en MET ($p<0.05$) (**Fig. 7B; anexo, Fig. A2h y Tabla 6a**). Y el porcentaje de ERIT difirió significativamente entre las muestras almacenadas a 37°C respecto a las que fueron preservadas a 4°C y 25°C ($p<0.05$) (**Fig. 7C; anexo, Fig. A2i**); no difirió de las almacenadas inmediatamente en MET, ni esta última marcó diferencias con las muestras almacenadas a 4°C ni 25°C ($p>0.05$) (**Fig. 7C; anexo, Fig. A2i y Tabla 6a**).

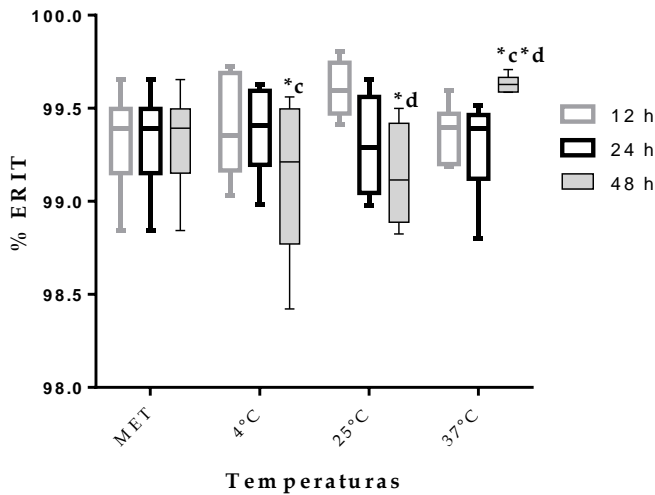
Lo observado condujo a la decisión de trasladar las muestras a bajas temperaturas desde el sitio de obtención hasta el laboratorio donde serían procesadas las muestras de la población sana piloto.



A



B



C

Figura 7. Porcentaje de RET, RETCD71 y ERIT. La comparación fue hecha entre las muestras fijadas en MET (las que se fijaron inmediatamente después de su obtención) y las distintas temperaturas de almacenamiento (4°C, 25°C y 37°C) antes de fijar las muestras. **A)** Porcentaje de RET: *a*b Diferencias significativas en el porcentaje de RET entre las muestras almacenadas a 37°C comparadas con las de 4°C y 25°C. **B)** Porcentaje de RETCD71. No hubo diferencias significativas. **C)** Porcentaje de ERIT: *c*d Diferencias significativas en el porcentaje de ERIT entre las muestras almacenadas a 37°C respecto a aquellas de 4°C y 25°C.

VII.IV FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN EL SISTEMA ERITROIDE DE SANGRE PERIFÉRICA DE SUJETOS SANOS

En la tabla 6 se presentan la frecuencia de reticulocitos y eritrocitos micronucleados de los participantes de este estudio, incluidos niños en edades de 6 s 18 años (porque así lo considera nuestro sistema de salud) y adultos, de 19 años en adelante. La información proporcionada corresponde a los porcentajes de reticulocitos identificados por su contenido de ARN o por el receptor CD71 y el porcentaje de células con MN.

De los valores obtenidos reportamos las medidas de tendencia central del total de la muestra evaluada (N=90). Encontramos mayor porcentaje de reticulocitos identificados por su contenido de ARN (del 0.311 al 12.55%) que por el receptor CD71 (del 0.02 al 3.73%) (**Tabla 6**). En cuanto al porcentaje de MN, se obtuvo que fue mayor en los RET (del 0.16 al 14.50%), seguido por los RETCD71 (del 0.00 al 3.61%) y los ERIT fueron las células que presentaron menor porcentaje de daño (del 0.0004 al 0.7%) (**Tabla 6**).

Tabla 6

Frecuencias de reticulocitos y eritrocitos micronucleados en sujetos sanos de la CDMX (n=90).

% Reticulocitos	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.
ARN (RET)	3.4 (±3.35)	1.49	0.31	12.55
CD71 (RETCD71)	0.33 (±0.62)	0.15	0.02	3.73
% Micronúcleos	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.
MN-RET	2.56 (±2.81)	1.49	0.16	14.50
MN-RETCD71	0.4 (±0.56)	0.19	0	3.61
MN-ERIT	0.045 (±0.09)	0.01	0.0004	0.70

Se reportan los valores generales obtenidos de las 90 muestras analizadas de sujetos sanos de la Ciudad de México.

VII.V FRECUENCIAS DE TIPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO RH

Se determinó el tipo sanguíneo con el sistema ABO Rh para cada muestra; del total, 28.88% (n=26) correspondió al tipo sanguíneo A Rh+ (**Fig. 8**, cuadro central), 5.55% (n=5) tipo B Rh+ ((**Fig. 8**, cuadro de la derecha), 62.22% (n=56) tipo O Rh+ ((**Fig. 8**, cuadro de la izquierda), y el 3.33% (n=3) mostraron los tipos sanguíneos A, B y O Rh-; el 96.67% del total de los individuos presentaron el antígeno Rh. Entre los participantes, no hubo donadores del tipo sanguíneo AB. Hay que hacer notar que el tipo sanguíneo más frecuente en población mexicana es el O Rh+, pero como en la Ciudad de México hay una población más variada y mezclada se esperaba encontrar una mejor distribución de los diferentes tipos sanguíneos, sin embargo no se logró por lo cual no hubo una representación equiparable del número de individuos por cada tipo.

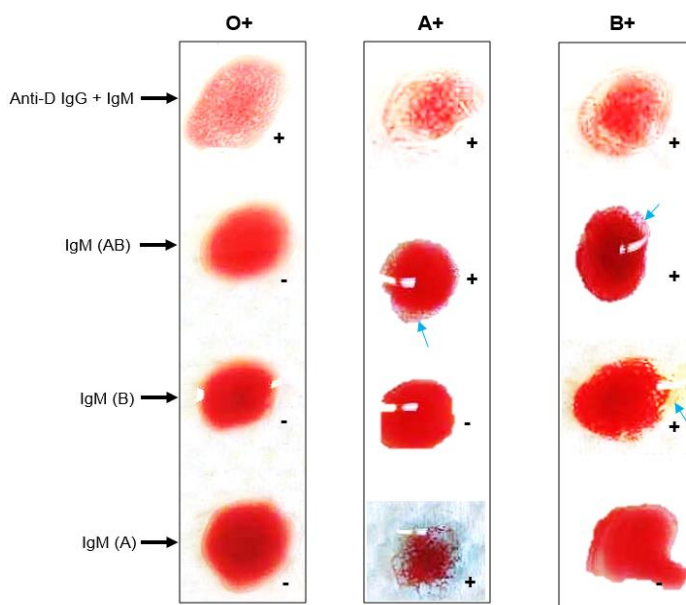


Figura 8. Reacción de aglutinación para determinar tipo sanguíneo. Las flechas azules ejemplifican la aglutinación. El tipo O se determinó si no hubo reacción de aglutinación una vez añadidos los anticuerpos monoclonales IgM para A, B y AB. El símbolo - indica que no hubo reacción; el + indica que sí hubo reacción. La primera fila representa la detección de Rh, en este ejemplo, todos son positivos.

VII.VI DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO DE OGG1 SER326CIS

Después de corroborar que el producto de la amplificación por PCR fuera un fragmento de 553 pb (**Fig. 9**), para cada muestra se determinó el genotipo mediante la digestión con la enzima de restricción *Fnu4HI* verificando que el homocigoto nativo (o silvestre) presentara sólo una banda de 553 pb, el homocigoto mutante dos bandas de 399 pb y 154 pb, y el heterocigoto tres bandas de 553 pb, 399 pb y 154 pb (**Fig. 10**).

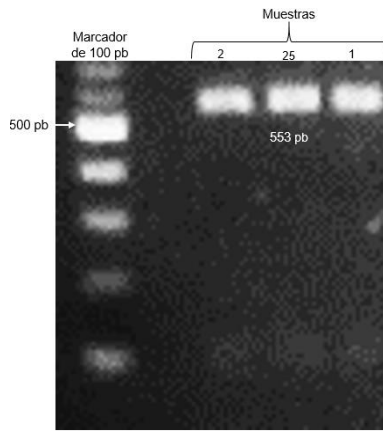


Figura 9. Amplificación del gen *OGG1*. El producto de PCR correspondió a un fragmento de 553 pb.

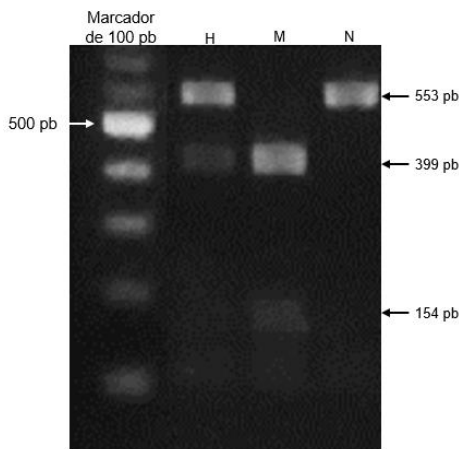


Figura 10. Digestión del fragmento amplificado de *OGG1* con la enzima de restricción Fnu4HI. Se obtienen 3 genotipos: H – heterocigoto: Ser/Cis (carril 1), M – homocigoto mutante: Cis/Cis (carril 2), N – homocigoto nativo: Ser/Ser (carril 3).

VII.VII FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO DE *OGG1 SER326CIS*

De los 90 individuos analizados se obtuvo que 34 fueron nativos (Ser/Ser), 44 heterocigotos (Ser/Cis) y 12 mutantes (Cis/Cis), obteniendo una frecuencia genotípica del 37.8%, 48.9% y 13.3%, respectivamente (**Tabla 7**). Las frecuencias alélicas se calcularon a partir de las frecuencias genotípicas del polimorfismo obteniendo un valor de Ser=0.62 y Cis=0.38 (**Tabla 8**). También se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas para determinar si los genotipos están en el equilibrio de Hardy-Weinberg, y al comparar el valor obtenido de $\chi^2=0.1579$ ($p=0.9241$) con el de tablas, cuyo valor para $\alpha=0.05$ y 1GL es $\chi^2=3.8415$, se observó que este polimorfismo sí está en equilibrio.

Tabla 7

Frecuencias genotípicas del polimorfismo de *OGG1 Ser326Cis* en habitantes de la Ciudad de México.

Polimorfismo	Frecuencia	Porcentaje
Ser/Ser	0.38	37.78
Ser/Cis	0.49	48.89
Cis/Cis	0.13	13.33
Total	90	100

Polimorfismo de *OGG1 Ser329Cis*: Ser/Ser – homocigoto nativo; Ser/Cis – heterocigoto; Cis/Cis – homocigoto mutante.

Tabla 8

Frecuencias alélicas del polimorfismo de *OGG1 Ser326Cis* en habitantes de la Ciudad de México.

Alelos	Ser	Cis	N
Frecuencia	0.62	0.38	90

Polimorfismo de *OGG1 Ser329Cis*: Ser – alelo nativo; Cis – alelo mutante.

VII.VIII DETERMINACIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO DE *XRCC1 ARG399GLN*

Una vez que se comprobó que el producto de la amplificación por PCR fuera un fragmento de 242 pb (**Fig. 11**), para cada muestra se determinó el genotipo para este polimorfismo verificando que el homocigoto nativo presentara sólo una banda de 242 pb, el homocigoto mutante dos bandas de 94 pb y 148 pb, y el heterocigoto tres bandas, de 94 pb, 148 pb y 242 pb (**Fig. 12**).

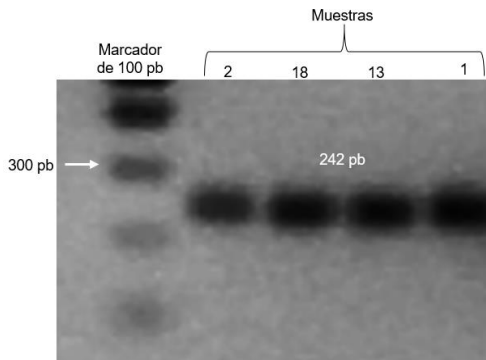


Figura 11. Amplificación del gen *XRCC1*. El producto de PCR fue un fragmento de 242 pb.

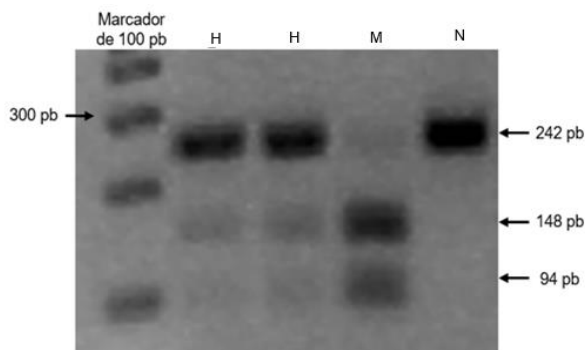


Figura 12. Digestión del fragmento amplificado de *XRCC1* con la enzima de restricción *MspI*. Se obtienen 3 genotipos: N – homocigoto nativo: Arg/Arg (carril 4), H – heterocigoto: Arg/Gln (carriles 1 y 2), M – homocigoto mutante: Gln/Gln (carril 3).

VII.IX FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO DE XRCCI ARG399GLN

De los 90 genotipos analizados se obtuvo que 14 fueron nativos (Arg/Arg), 41 heterocigotos (Arg/Gln) y 35 mutantes (Gln/Gln), obteniendo una frecuencia fenotípica del 15.5%, 45.5% y 38.9%, respectivamente (**Tabla 9**). Las frecuencias alélicas se calcularon a partir de las frecuencias genotípicas del polimorfismo obteniendo un valor de Arg=0.38 y Gln=0.62 (**Tabla 10**). También se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas para determinar si los genotipos están en el equilibrio de Hardy-Weinberg, y al comparar el valor obtenido de $\chi^2=0.02404$ ($p=0.9881$) con el de tablas, cuyo valor con una $\alpha=0.05$ y 1GL es $\chi^2=3.8415$, se observó que sí.

Tabla 9

Frecuencias genotípicas del polimorfismo de XRCCI Arg399Gln en habitantes de la Ciudad de México.

Polimorfismo	Frecuencia	Porcentaje
Arg/Arg	0.16	15.56
Arg/Gln	0.46	45.56
Gln/Gln	0.39	38.89
Total	90	100

Polimorfismo de XRCCI Arg399Gln: Arg/Arg – homocigoto nativo; Arg/Gln – heterocigoto; Gln/Gln – homocigoto mutante.

Tabla 10

Frecuencias alélicas del polimorfismo de XRCCI Arg399Gln en habitantes de la Ciudad de México.

Alelos	Arg	Gln	N
Frecuencia	0.38	0.62	90

Polimorfismo de XRCCI Arg399Gln: Arg – alelo nativo; Gln – alelo mutante.

VII.X INDUCCIÓN DE MN Y LA EDAD

Evaluamos si la frecuencia de MN en las células eritroides podría estar relacionada con la edad. Para ello dividimos a los donadores en niños (6-18 años, con base en lo considerado por el sistema de salud mexicano) y adultos (19 años en adelante), quedando dos grupos con una n=38 y n=52, respectivamente.

Entre los parámetros evaluados con este sistema, se obtuvo que el conteo de RET y RETCD71 fue significativamente mayor en niños que en adultos ($p<0.05$) (**Tabla 11; Fig. 13, gráficas a y b**). Respecto los porcentajes de MN-RET y MN-RETCD71, fueron más elevados en adultos que en niños (**Tabla 11; Fig. 13, gráficas c y d**). Al analizar los niveles de MN-ERIT no se encontró una diferencia significativa entre niños y adultos ($p>0.05$) (**Tabla 11; Fig. 11 gráfica e**).

Tabla 11

Diferencias entre niños y adultos.

% Reticulocitos	Niños (n=38)				Adultos (n=52)				P *
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
ARN (RET)	3.07 ^a (±1.69)	3.1	0.36	6.07	1.08 (±0.65)	0.91	0.31	3.32	0.0001
CD71 (RETCD71)	0.26 ^b (±0.2)	0.22	0.04	0.92	0.17 (±0.08)	0.17	0.02	0.41	0.0321
% Micronúcleos	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	P *
MN-RET	1.89 ^c (±1.55)	1.5	0.16	6.47	3.59 (±3.19)	2.29	0.24	14.50	0.0094
MN-RETCD71	0.15 ^d (±0.29)	0.05	0	1.41	0.64 (±0.67)	0.36	0	3.61	0.001
MN-ERIT	0.02 (±0.05)	0.01	0.002	0.24	0.05 (±0.08)	0.01	0.0004	0.34	0.8917

La comparación fue hecha entre niños (6-18 años) y adultos (19 años en adelante). (a-d) Diferencias estadísticamente significativas en el conteo de RET, RETCD71, MN-RET y MN-RETCD71, respectivamente, entre niños y adultos ($p < 0.05$). En el conteo de MN-ERIT no hubo diferencias estadísticamente significativas entre niños y adultos ($p > 0.05$).

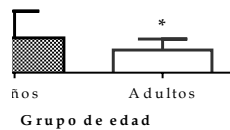


Figura 13. Porcentajes de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT obtenidos en niños y en adultos. (a, b, c y d) % de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71, respectivamente. * Diferencias estadísticamente significativas entre niños y adultos ($p < 0.05$). (e) No hubo diferencias significativas en el porcentaje de MN-ERIT entre niños y adultos ($p > 0.05$).

VII.XI INDUCCIÓN DE MN Y EL SEXO

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar si el sexo podría influir en la inducción de MN en este sistema. Para ello se obtuvieron 90 muestras de SP de sujetos sanos de las cuales 57.7% (n=52) fueron mujeres y 42.2% (n=38) hombres. Se aplicó la prueba estadística de U de M-W para determinar si había

diferencias significativas en el porcentaje de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-RETCD71 debido al sexo. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos. En este caso, para ningún parámetro considerado existieron diferencias estadísticamente significativas (*Tabla 12*).

Tabla 12
Diferencias entre mujeres y hombres.

% Reticulocitos	Mujeres (n=52)				Hombres (n=38)				P *
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
ARN (RET)	2.21 (±1.74)	1.53	0.31	6.07	1.61 (±1.2)	1.67	0.34	4.87	0.1711
CD71 (RETCD71)	0.22 (±0.16)	0.19	0.04	0.92	0.2 (±0.14)	0.17	0.02	0.72	0.456
% Micronúcleos	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	P *
MN-RET	3.16 (±2.8)	2.14	0.38	12.16	2.57 (±2.73)	1.68	0.16	14.50	0.1764
MN-RETCD71	0.37 (±0.52)	0.18	0	2.03	0.52 (±0.68)	0.28	0	3.61	0.1715
MN-ERIT	0.04 (±0.06)	0.01	0.0009	0.24	0.04 (±0.08)	0.01	0.0004	0.34	0.789

La comparación se hizo entre hombres y mujeres de entre 6 hasta más de 60 años de edad.

Obtuvimos que el sexo no es una variable que influye de manera diferencial en la inducción de MN en el sistema eritroide, ya que no encontramos diferencias entre hombres y mujeres, ni siquiera cuando se realizó la comparación en ambos sexos considerando grupos de niños y adultos (*Figura 7A*).

VII. XII. INDUCCIÓN DE MN Y EL TIPO SANGUÍNEO DEL SISTEMA ABO RH

De las noventa muestras obtenidas, el 28.8% (n=26) fueron del tipo sanguíneo A Rh+, el 5.5% (n=5) del tipo B Rh+, el 62.2% (n=56) del tipo O Rh+ y el 3.3% (n=3) A, B y O Rh negativos. Las muestras de los tipos sanguíneo ABO negativos no se consideraron en el análisis estadístico porque solamente se tenía un individuo por cada tipo. Este experimento se realizó con el fin de establecer si hay diferencias en el conteo de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT dependiendo del tipo sanguíneo. Solamente se observó una diferencia estadísticamente significativa en el conteo de MN-RETCD71 entre sujetos del tipo O Rh+ comparado con B Rh+ ($p < 0.05$) (**anexo, tabla 7a**). En el resto de los parámetros no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (*Fig. 14; anexo, tabla 7a*).

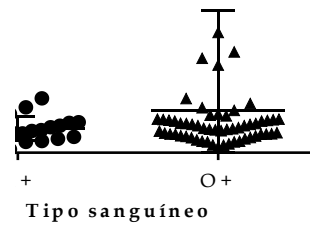


Figura 14. Porcentajes de RET, RET CD71, MN-RET y MN-RET CD71 obtenidos de individuos de los tipos sanguíneos A+ y O+. (a, b, c, d) Conteo de RET, RET CD71, MN-RET y MN-RET CD71 respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

VII.XIII INDUCCIÓN DE MN Y EL POLIMORFISMO DE *OGG1* SER326CIS

El objetivo de este experimento fue determinar si el polimorfismo del gen de reparación *OGG1* Ser326Cis influía en la inducción diferencial de MN en el sistema eritroide. Se obtuvo que en ningún caso habían diferencias significativas ($p>0.05$) (Tabla 13; Fig. 15). No obstante, se observó un ligero aumento de MN-ERIT en los portadores del polimorfismo de *OGG1* Ser326Cis, con un valor de $p=0.0542$, cercano a lo significativo (Tabla 13; Fig. 15).

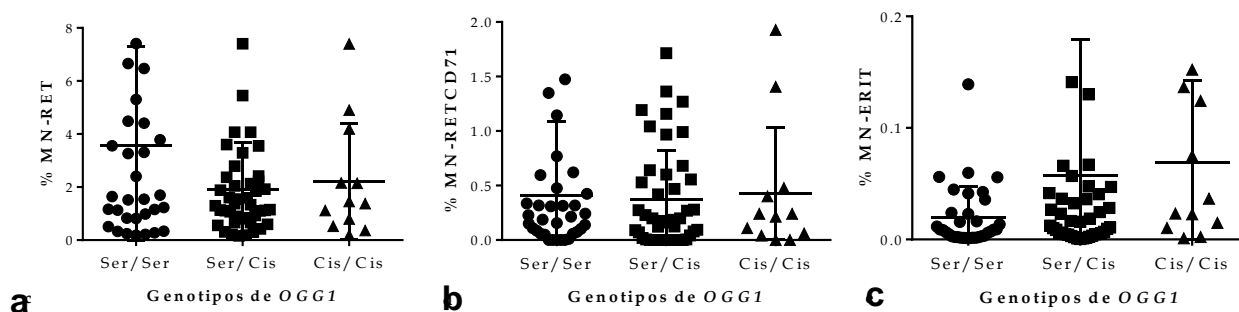


Figura 15. Porcentajes de MN-RET, MN-RET CD71 y MN-ERIT por cada genotipo del gen *OGG1*. Se evaluó el polimorfismo de *OGG1* Ser326Cis. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

Tabla 13

Diferencias entre los genotipos del polimorfismo de OGG1 Ser326Cis.

% Micronúcleos	Ser/Ser (n=34)				Ser/Cis (n=44)				Cis/Cis (n=12)				P*
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
MN-RET	3.55 (±3.73)	1.67	0.19	14.50	1.9 (±1.8)	1.31	0.16	8.59	2.22 (±2.19)	1.42	0.19	7.40	0.3016
MN-RETCD71	0.41 (±0.68)	0.2	0	3.61	0.37 (±0.45)	0.18	0	1.71	0.43 (±0.61)	0.23	0	1.92	0.9235
MN-ERIT	0.02 (±0.03)	0.01	0.001	0.14	0.06 (±0.12)	0.02	0.0004	0.70	0.07 (±0.12)	0.03	0.001	0.22	0.0542

La comparación se realizó entre los genotipos del polimorfismo de *OGG1 Ser326Cis*. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

VII.XIV INDUCCIÓN DE MN Y EL POLIMORFISMO DE *XRCC1 ARG399GLN*

El objetivo de esta sección fue determinar si existían diferencias en los porcentajes de MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT dependientes del polimorfismo de *XRCC1 Arg399Gln*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en MN-RET y MN-RETCD71 dependientes del genotipo ($p<0.05$) (**Tabla 14; Fig. 16a y 16b**). En el primer caso, el genotipo mutante difirió del heterocigoto ($p<0.05$). En el segundo caso, el genotipo heterocigoto difirió tanto del homocigoto nativo como del mutante ($p<0.05$). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de MN-ERIT debido al polimorfismo de *XRCC1 Arg399Gln*, aunque el valor de p es cercano al considerado significativo (**Tabla 14; Fig. 16e**).

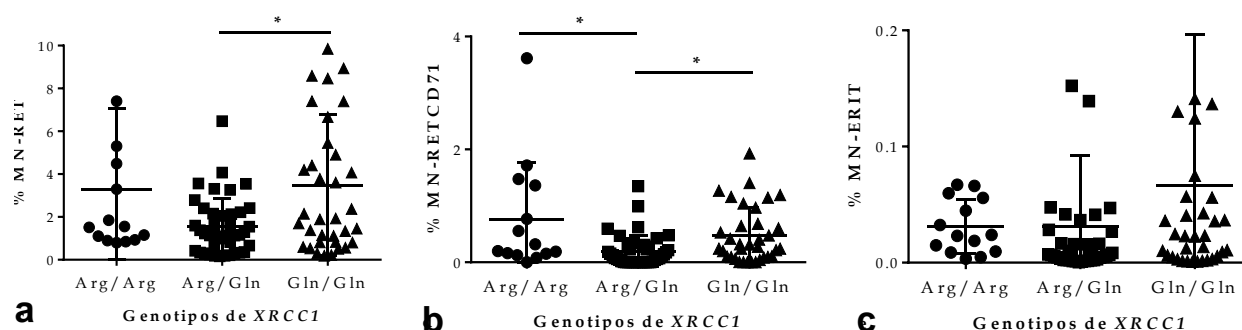


Figura 16. Porcentajes de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT por cada genotipo del gen *XRCC1*. Se evaluó el polimorfismo de *XRCC1 Arg399Gln*. (a) Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de MN-RET entre Arg/Gln y Gln/Gln ($p<0.05$). (b) Diferencias estadísticamente significativas en el conteo de MN-RETCD71 entre Arg/Gln respecto Arg/Arg y Gln/Gln ($p<0.05$). (c) No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

Tabla 14*Diferencias entre los genotipos del polimorfismo de XRCCI Arg399Gln.*

% Micronúcleos	Arg/Arg (n=14)				Arg/Gln (n=41)				Gln/Gln (n=35)				P *
	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	
MN-RET	3.26 (±3.81)	1.53	0.79	14.50	1.55a (±1.33)	1.61	0.16	6.47	3.48 (±3.29)	1.93	0.19	12.16	0.0367
MN-RETCD71	0.76b (±1)	0.26	0	3.61	0.2c (±0.28)	0.07	0	1.35	0.47 (±0.49)	0.27	0	0.93	0.0026
MN-ERIT	0.03 (±0.02)	0.23	0.003	0.07	0.03 (±0.06)	0.007	0.0004	0.27	0.07 (±0.13)	0.02	0.0009	0.70	0.0553

La comparación se realizó entre los genotipos del polimorfismo de *XRCCI Arg399Gln*. (a) Diferencias estadísticamente significativas en el conteo de MN-RET entre Arg/Gln con respecto Gln/Gln ($p < 0.05$). (b). Diferencias en el conteo de MN-RETCD71 entre Arg/Arg con respecto Arg/Gln ($p < 0.05$). (c) Diferencias en el conteo de MN-RETCD71 entre Arg/Gln con respecto Gln/Gln ($p < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

Al analizar los resultados de los distintos tipos de fijación, decidimos que el mejor es el uso del metanol porque este preservó un conteo uniforme de células individuales y de reticulocitos a lo largo de diez semanas. Esto corresponde con la literatura que reporta que la fijación con MET al 100% permite la preservación celular por largos periodos de tiempo (Levitt y King, 1987). Descartamos la fijación con PFA porque obtuvimos un bajo conteo de las células de interés, ya que el tiempo máximo de preservación en este fijador es de dos semanas (Fixation and flow cytometry, 2014). En cuanto a la fijación mixta, también fue descartada, aun cuando a las dos y a las seis semanas presentó el mayor conteo de células individuales y de RET, pues se complicó la manipulación de las muestras ya que se formaron coágulos, además el número fue decayendo y llegó a ser menor que las muestras fijadas en MET a las diez semanas. Por esto consideramos que obtuvimos mejores conteos de células individuales y de RET fijando solamente con MET.

Al comparar la eficiencia para detectar el contenido de DNA con los fluorocromos Hoechst 33342 y DAPI, no encontramos diferencias. Esto se puede deber a que ambos fluorocromos se excitan con una longitud de onda de 405 nm (láser violeta o ultravioleta) y a que se unen en el mismo sitio, es decir, al surco menor del ADN por interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno (Gryczynski, Malak y Lakowicz, 1996), de tal forma que con nuestro instrumento no se observó una diferencia, pues cuenta con el láser violeta. Por lo que para cuantificar MN se puede emplear uno u otro sin que se alteren los resultados. No obstante, decidimos trabajar con HO en los siguientes experimentos por conveniencia, ya que al momento del procesamiento de las muestras, éste se añade simultáneamente con el colorante de ARN (el NT) para incubar a 37°C por una hora, mientras que DAPI se agrega por separado, 45 min después de haber colocado el NT, lo que requiere alrededor de 25 minutos cuando se trabaja con 10 muestras y se debe incubar por 15 min adicionales, lo que alarga el tiempo de procesamiento, mucho más cuando se procesan varias muestras al mismo tiempo.

Finalmente, al momento de establecer a qué temperatura y por cuánto tiempo podrían ser preservadas las muestras para trasladarlas hasta el sitio de análisis, determinamos que puede ser a 4°C o 25°C, ya que permitieron la conservación del conteo de las células de interés similar a aquellas que fueron fijadas en MET, inmediatamente después de su obtención, aun cuando habían pasado 12, 24 y 48 h bajo esas condiciones de temperatura. Estos resultados concuerdan con la literatura. Ríos y Velasco (2017) reportaron que para fines hematológicos, las muestras pueden ser conservadas hasta 24 h a 25°C e incluso 48 h si se mantienen a 4°C. No obstante, descartamos la temperatura de 37°C porque los niveles de RET

y de ERIT decayeron a las 48 h y también debido a que las muestras se volvieron muy espesas y fue difícil manejarlas, desde las 12 horas bajo esa condición de temperatura. Por lo tanto, el traslado de las muestras empleadas en la siguiente etapa se realizó en frío por un tiempo máximo de 4 horas (tiempo transcurrido desde su obtención hasta el sitio de procesamiento) y fueron fijadas inmediatamente al llegar al laboratorio.

Después de establecer las condiciones del método para este ensayo, cuantificamos los niveles de MN en sujetos sanos, habitantes de la Ciudad de México, y estudiamos la influencia de algunos cofactores en su inducción.

Al obtener el conteo de las células de interés, corroboramos que se puede obtener un porcentaje mayor de RET que RETCD71 evaluables, como lo habían reportado Montero y cols. (2016) (*Tabla 16*). Adjudicado a que el ARN permanece en un rango de 24-48 horas dentro de las células, una vez que ingresaron al torrente sanguíneo, mientras que el receptor de transferrina se pierde temprano en la maduración de los reticulocitos circulantes, en un tiempo aproximado de 3 horas (Montero y col., 2016). Por lo tanto, confirmamos la propuesta de evaluar completo el sistema eritroide de sangre periférica para obtener resultados robustos e integrales y resolver los problemas técnicos que se presentan cuando nos limitamos a evaluar solamente los RETCD71 en muestras de seres humanos.

A la vez, corroboramos que tanto el conteo de RET como de RETCD71 fue mayor en niños que en adultos, concordando con los resultados de Montero y cols. (2016) (*Tabla 16*), que podría explicarse porque la proliferación celular va disminuyendo conforme avanza la edad, fenómeno que ha sido observado en otros tipos celulares como los linfocitos (Orta y Günebakan, 2012), de tal forma que la regeneración de la médula ósea disminuye a través del tiempo. En cuanto a los niveles de MN, obtuvimos que se incrementan conforme avanza la edad, coincidiendo con los resultados de Abramsson y cols. (2000) y de Montero y cols. (2016) (*Tabla 16*). Este hallazgo podría explicarse por dos razones: debido al deterioro de los mecanismos de reparación del daño al ADN a lo largo de la vida (Barnett y King, 1995; Bohr, 1995; Wojda y cols., 2006) y porque puede ser que entre más tiempo esté expuesto un individuo a un agente ambiental tóxico, se genera un desequilibrio que conduce a la acumulación de células dañadas, pues decae la capacidad de la maquinaria de reparación y el daño se incrementa, ya que la célula en su totalidad es susceptible a los efectos tóxicos, no solo el ADN, también las proteínas, los lípidos, las enzimas y el ARN, los cuales son susceptibles a sufrir alteraciones, que podemos observarlos en forma de MN, pero no es el único tipo de efecto que se puede evaluar, pero es de los más sencillos y sensibles (Fenech y cols., 2011). No obstante, este tipo de daño también puede deberse a otros factores, más allá de la exposición ambiental, como la desnutrición, las infecciones, la terapia con radiación para tratar el cáncer, la ingesta alimenticia alta en alimentos no nutritivos, la exposición ocupacional, etcétera, como se ha descrito en numerosos

estudios en relación con la formación de MN (*Tabla 16*). Sin embargo, los participantes de este estudio fueron sujetos sanos aunque viven en una ciudad considerada de las más contaminadas, que es la Ciudad de México (CDMX, quinta ciudad más contaminada del mundo, 2020). Por lo tanto, quizá el ambiente sí esté ejerciendo algún tipo de presión sobre la estabilidad genómica de las células y sobre los mecanismos de reparación, pero se requieren más estudios para asegurar esta afirmación. En suma, encontramos que la edad sí tiene un efecto en los niveles de micronúcleos en el sistema eritroide, que coincide con lo descrito en otros tipos celulares, como los linfocitos, y con otros tipos de alteraciones, como las aberraciones cromosómicas, por ejemplo (Migliore y cols., 1991).

Por otro lado, como se ha establecido una asociación entre el gen ABO y el manejo intracelular del hierro (Benyamin y cols., 2014; Senga y cols., 2011; Raffield y cols., 2017), lo que conlleva a que, dependiendo del tipo sanguíneo, haya una deficiencia en su metabolismo favoreciendo la inducción de MN-RETCD71 (Abramsson y cols., 2000; Wegelius y Weber, 1978), consideramos esta variable en el estudio. Por otro lado, se ha descrito una relación entre los tipos sanguíneos A y B con procesos inflamatorios (Dabelsteen y Gao, 2004), lo cual podría estar generando mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno, las cuales dañarían al ADN, lo que se traduce en la formación de diversos tipos de biomarcadores, como los MN. A pesar de todo lo anterior, cuando se realizó el análisis del papel del tipo sanguíneo del sistema ABO Rh no obtuvimos diferencias significativas en los niveles de micronúcleos entre donadores del tipo sanguíneo A Rh+ y O Rh+ que fueron los tipos más abundantes que encontramos en este estudio, como ya se explicó en los resultados, y más abundantes en el país, como lo demuestran numerosos estudios hechos en los diferentes estados (Méndez, 2004; Iturbe y cols., 2013). No obstante, en relación con las observaciones de Abramsson y cols. (2000), no se logró confirmar su observación de que los individuos del tipo A Rh+ tengan mayor susceptibilidad a mostrar una frecuencia mayor de micronúcleos. Hay que señalar que el tamaño de la muestra con la que trabajaron en aquel ensayo preliminar y para fines de estandarización del método, fue de 26 individuos, 13 de ellos con tipo A y los otros 13 del tipo O. En este estudio se encontraron 26 participantes con el tipo A Rh+ y 56 con el tipo O Rh+, pero se requiere tener una muestra representativa del número de sujetos incluidos para cada tipo sanguíneo para darle mayor peso a los resultados y poder tener una conclusión sobre papel que juega el tipo sanguíneo en la inducción diferencial de los MN en el sistema eritroide. Cuando esta variable se consideró junto con la edad, en un análisis de regresión bivariada, solamente no se observó una interacción ($p > 0.05$) (**anexo, Fig. 3A**). Pero se requiere seguir estudiando estos cofactores.

Tabla 16

Frecuencias de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT en seres humanos de distintas poblaciones de estudio.

Tipo de población	Valores promedio (%)					Referencia
	RET	RETCD71	MN-RET	MN-RETCD71	MN-ERIT	
Mexicana (niños no expuestos a COV)	1.5	0.06	2.3	5.3	0.03	Montero <i>et al.</i> , 2020
Mexicana (niños expuestos a COV)	1.6	0.03	3.9	9.3	0.08	
Mexicana(niños bien nutridos)	-	1.77	-	0.49	-	Cervantes <i>et al.</i> , 2018
Mexicana (niños bien nutridos con infección)	-	2.73	-	1.11	-	
Mexicana (niños moderadamente desnutridos con infección)	-	2.45	-	1.69	-	
Mexicana (niños severamente desnutridos con infección)	-	3.93	-	2.92	-	
Colombiana (pacientes con glioma, tratados con yodo radioactivo)	-	-	-	12.45	-	Barrera <i>et al.</i> , 2018
Colombiana (controles)	-	-	-	2.97	-	
Mexicana (niños)	3.9	0.1	1.5	6.8	0.09	Montero <i>et al.</i> , 2016
Mexicana (adultos)	2.4	0.05	2.5	8.2	0.01	
Sueca (no vegetarianos)	-	-	-	0.86	-	Kotova <i>et al.</i> , 2015
Sueca (vegetarianos)	-	-	-	0.53	-	
Mexicana(niños bien nutridos)	-	-	-	0.44	-	Cervantes <i>et al.</i> , 2014
Mexicana (niños bien nutridos con infección)	-	-	-	1.08	-	
Mexicana (niños moderadamente desnutridos con infección)	-	-	-	1.63	-	
Mexicana (niños severamente desnutridos con infección)	-	-	-	2.02	-	
Sueca (antes del régimen alimenticio alto en alimentos fritos)	-	-	-	1.29	-	Abramsson <i>et al.</i> , 2008
Sueca (después del régimen alimenticio alto en alimentos fritos)	-	-	-	1.46	-	
Estadounidense	-	0.12	-	0.09	0.001	Dertinger <i>et al.</i> , 2003
Sueca (hombres)	-	-	-	1.07	-	Abramsson <i>et al.</i> , 2000
Sueca (mujeres)	-	-	-	1.38	-	
Mexicana (niños)	3.07	0.26	1.89	0.15	0.02	Este estudio
Mexicana (adultos)	1.08	0.17	3.59	0.64	0.05	

La mayoría de los estudios que han realizado la evaluación de micronúcleos en el sistema eritroide reportan los valores en poblaciones expuestas con fines médicos o ambientalmente a agentes genotóxicos, pero en algunos casos también consideran y reportan información en población sana.

En cuanto al papel del sexo en la inducción diferencial de MN en las células eritroides, obtuvimos que no fue un factor explicativo para ninguno de los parámetros que estudiamos, coincidiendo con lo reportado por Abramsson y cols. (2000), quienes reportaron que no hubo diferencias entre hombres y mujeres en MN-RETCD71 (**Tabla 16**). Cuando esta variable se consideró junto con la edad, en un análisis de regresión bivariada, solamente en el caso de las mujeres marcó un valor de $p < 0.05$. Esto indicaría que la interacción de la edad y el ser mujer podrían influir en el incremento de MN (**anexo, Fig. 4A**). Por lo tanto, es necesario profundizar en la interacción de estos dos cofactores en estudios posteriores.

En relación con los polimorfismos implicados en BER, *OGG1 Ser326Cis* y *XRCC1 Arg399Gln*, primero determinamos sus frecuencias alélicas y genotípicas. Estas pueden variar de población a población, como se observa en las **Tablas 17 y 18**, lo que puede deberse a la composición étnica de las diferentes regiones (aun cuando las personas provengan del mismo país), a factores geográficos particulares a los que se han adaptado, o a que los flujos migratorios en todo el mundo han hecho variar las proporciones en que se

presentan estos polimorfismos. Así, la distribución de estos alelos y fenotipos en una población dada podría traducirse en una susceptibilidad diferencial a los efectos de los compuestos tóxicos que producen el daño genotóxico que medimos en el sistema eritroide mediante la cuantificación de micronúcleos.

Tabla 17

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen OGG1 Ser326Cis, en diversas poblaciones.

Tipo de población	Frecuencia genotípica, n (%)			Frecuencia alélica (%)		Referencia
	<i>OGG1 Ser326Cis</i>			<i>Alelos</i>		
	Ser/Ser	Ser/Cis	Cis/Cis	Arg	Gln	
Mexicana	(25)	(58)	(17)	54	46	Montero <i>et al.</i> , 2020
Caucásica	16 (23)	38 (54)	16 (23)	50	50	Smolarz <i>et al.</i> , 2014; en He <i>et al.</i> , 2016
Asiática	137 (18)	401 (52)	239 (30)	44	56	Xie <i>et al.</i> , 2013; en He <i>et al.</i> , 2016
Coreana	89 (3)	181 (47)	116 (30)	33	67	Jung <i>et al.</i> , 2012; en Wang <i>et al.</i> , 2013
China	144 (36)	206 (51)	50 (13)	61	39	Yuan <i>et al.</i> , 2012; en Wang <i>et al.</i> , 2013
China	22 (15)	72 (48)	56 (37)	39	61	Tang <i>et al.</i> , 2011; en Wang <i>et al.</i> , 2013
Caucásica	1125 (60)	670 (35)	92 (5)	77	23	Roberts <i>et al.</i> , 2011; en He <i>et al.</i> , 2016
Mexicoamericana	-	-	-	64	36	Thameem <i>et al.</i> , 2010
Japonesa	73 (42)	23 (13)	79 (45)	48	52	Sakamoto <i>et al.</i> , 2006; en Wang <i>et al.</i> , 2013
Mexicana	34 (38)	44 (49)	12 (13)	62	38	Este estudio

Las frecuencias genotípicas y alélicas corresponden a poblaciones de individuos sanos.

Tabla 18

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen XRCC1 Arg399Gln, en distintas poblaciones.

Tipo de población	Frecuencia genotípica, n (%)			Frecuencia alélica (%)		Referencia
	<i>XRCC1 Arg399Gln</i>			<i>Alelos</i>		
	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Arg	Gln	
Italiana	96 (51)	83 (44)	9 (5)	73	27	Santonocito <i>et al.</i> , 2017
China	130 (56.30)	89 (38.50)	12 (5.20)	75	25	Li <i>et al.</i> , 2014; en Yang <i>et al.</i> , 2016
India	95 (48)	29 (14)	77 (38)	54	46	Natukula <i>et al.</i> , 2013
Saudi	204 (53)	143 (37)	39 (10)	71	29	Alanazi <i>et al.</i> , 2013
Egipcia	33 (54.10)	27 (44.26)	1 (1.64)	76	24	Sorour <i>et al.</i> , 2013; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Turca	19 (38)	26 (52)	5 (10)	64	36	Duman <i>et al.</i> , 2012; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Coreana	914 (54)	693 (41)	91 (5)	75	25	Kim <i>et al.</i> , 2012; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Brasileña	186 (52)	152 (42)	23 (6)	73	27	Canalle <i>et al.</i> , 2011; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Brasileña	27 (45)	32 (53)	1 (2)	72	28	Rodrigues, Vanzeler y Espíndola, 2015
Mexicana	211 (55)	147 (39)	24 (6)	74	26	Pérez <i>et al.</i> , 2011
Estadounidense	37 (37)	53 (53)	10 (10)	64	36	Monroy <i>et al.</i> , 2011; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Mexicana	65 (54)	47 (39)	8 (7)	74	26	Meza <i>et al.</i> , 2009; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Austríaca	184 (43)	193 (45)	52 (12)	65	35	Ganster <i>et al.</i> , 2009; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Japonesa	287 (57)	183 (37)	30 (6)	75	25	Matsuo <i>et al.</i> , 2004; en Yang <i>et al.</i> , 2016
Mexicana	14 (15)	41 (45)	35 (40)	38	62	Este estudio

Las frecuencias genotípicas y alélicas corresponden a poblaciones de individuos sanos.

El polimorfismo de *OGG1 Ser326Cis* fue incluido en el estudio porque en el artículo de Montero y cols. (2020) observaron que individuos expuestos ambientalmente a compuestos orgánicos volátiles, y que mostraron incremento en el estado oxidante en plasma, presentaron mayor conteo de MN-RET si además eran portadores del genotipo mutante (Cis/Cis), comparado con los portadores del nativo (Ser/Ser) o del

heterocigoto (Ser/Cis). No obstante, este efecto no se observó entre los habitantes de una comunidad donde no existe esa contaminación ambiental (datos no mostrados, obtenidos en el laboratorio), y entre los habitantes de la Ciudad de México no vimos tampoco diferencias significativas en los niveles de MN para los genotipos del polimorfismo de este gen, y pensamos que podría deberse a que los individuos que participaron en el presente estudio no estaban expuestos a los mismos contaminantes ni a los mismos niveles que los niños del estudio de Montero y cols. (2020).

Para complementar el estudio de *OGGI*, se incluyó la determinación del polimorfismo del gen *XRCCI Arg399Gln*, y se obtuvo una mayor frecuencia de MN-RETCD71 entre los portadores de los genotipos homocigotos mutantes, respecto a los heterocigotos. Esta observación podría revelar que este polimorfismo tiene una función importante en la reparación del daño al ADN generado en las células de los individuos de este estudio. Lo que coincide con lo reportado en la literatura, donde se describe que mutaciones en *XRCCI* provocan que las células sean más susceptibles de sufrir daño al ADN y que correlaciona con el incremento de aberraciones cromosómicas, que son un biomarcador de efecto temprano como los micronúcleos (Thompson y West, 2000). Sin embargo, este es el primer estudio que considera este cofactor al momento de evaluar MN en células del sistema eritroide de seres humanos, por lo que se sugiere continuar con esta evaluación.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo aportan conocimiento sobre las condiciones óptimas para la evaluación del daño genotóxico en el sistema eritroide, además de determinar algunas variables biológicas asociadas con el daño al ADN en las células eritroides, así como información sobre la persistencia del daño en las células maduras.

IX. CONCLUSIONES

- El MET contribuyó a la preservación de las células de interés durante diez semanas que fue nuestro tiempo de observación.
- Resulta más práctico el uso de Hoechst 33342 para teñir los MN.
- Temperaturas de 4-25°C son recomendables para trasladar las muestras por un máximo de 24 horas para mantener la estabilidad de la muestra.
- Evaluar todas las células eritroides de sangre periférica nos brinda una visión integral del daño generado en este sistema celular.
- Se obtiene consistentemente un mayor conteo de reticulocitos que contienen RNA que de reticulocitos que portan el receptor de transferrina, CD71, en seres humanos.
- La frecuencia de micronúcleos se determina con mayor robustez en los reticulocitos que contienen RNA que en los portadores del receptor CD71.
- Se puede determinar una frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros.
- El nivel de daño genotóxico fue mayor en adultos que en niños.
- Los niveles de reticulocitos en sangre periférica fue menor en adultos que en niños.
- Portar tipo sanguíneo A u O no fue un factor significativo en la inducción diferencial de MN.
- No se encontraron diferencias en los niveles de micronúcleos entre hombres y mujeres.
- No se encontraron diferencias en los niveles de MN debido al polimorfismo del gen *OGGI Ser326Cis*.
- Con el polimorfismo de *XRCC1 Arg399Gln* se encontraron diferencias en el nivel de MN-RETCD71 entre los portadores heterocigotos respecto a los individuos homocigotos.

X. PERSPECTIVAS

El método propuesto por Montero y cols. (2016) puede reproducirse en cualquier laboratorio donde posean un equipo con dos láseres para cuantificar el daño genotóxico en reticulocitos y eritrocitos de sangre periférica de seres humanos. Por lo tanto, se sugiere continuar empleando este protocolo en estudios posteriores.

En particular, para el biomonitoreo de personas expuestas por razones ocupacionales o ambientales, reduce significativamente el tiempo de evaluación, lo que compensa su costo. Además, sería posible estudiar más individuos en menor tiempo.

Por otro lado, sugerimos que en este tipo de estudios continúen evaluando el papel que juegan los distintos cofactores que podrían impactar en la inducción diferencial de MN en el sistema eritroide.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramsson, L., Zetterberg, G., Bergqvist, M., Grawé, J. 2000. Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 36: 22-31.
- Abramsson-Zetterberg, L. 2018. Strongly heated carbohydrate-rich food is an overlooked problem in cancer risk evaluation. *Food Chem. Toxicol.*, vol. 121: 151-155.
- Abramsson, L., Vikstöm, A., Törnqvist, M., Hellenäs, K. 2008. Differences in the frequency of micronucleated erythrocytes in humans in relation to consumption of fried carbohydrate-rich food. *Mut. Res.*, vol. 653: 50-56.
- Alanazi, M., Pathan, A., Ajaj, S., Khan, W., Shaik, J., Tassan, N., Parine, N. 2013. DNA Repair Genes XRCC1, XRCC3, XPD, and OGG1 Polymorphisms among the Central Region Population of Saudi Arabia. *Biol. Res.*, vol. 46: 161-167.
- Arai, T., Kelly, V., Komoro, K., Minowa, O., Noda, T., Nishiura, S. 2003. Cell proliferation in liver of Mmh/Ogg1-deficient mice enhances mutation frequency because of the presence of 8-hydroxyguanine in DNA. *Can. Res.*, vol. 63: 4287-4292.
- Barnett, Y., King, C. 1995. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mut. Res.*, vol. 338: 115-128.
- Barrera, L., Ortiz, L., Grisales, H., Rojas, M., Camargo, M. 2018. Citometría de flujo en reticulocitos de sangre periférica como indicador de inestabilidad cromosómica en pacientes con gliomas de alto grado. *Bioméd.*, vol. 38: 379-387.
- Beltrán-Portugal, R. 2018. Comparación de los sistemas de micronúcleos en linfocitos y en reticulocitos de sangre periférica para evaluar daño genotóxico en estudios de monitoreo humano (tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Benyamin, B., Esko, T., Ried, J., Radhakrishnan, A., Vermeulen, S., Traglia, M., Gögele, M., Anderson, D., Broer, L., Podmore, C., Luan, J., Kutalik, Z., Sanna, S., Van der Meer, P., Tanaka, T., Wang, F., Westra, H., Franke, L., Mihailov, E., Milani, L., Hälldin, J., Winkelmann, J., Meitinger, T., Thiery, J., Peters, A., Waldenberger, M., Rendon, A., Jolley, J., Sambrook, J., Kiemeny, L., Sweep, F., Sala, C., Schwienbacher, C., Pichler, I., Hui, J., Demirkan, A., Isaacs, A., Amin, N., Steri, M., Waeber, G.,

- Verweij, N., Powell, J., Nyholt, D., Heath, A., Madden, P., Visscher, P., Wright, M., Montgomery, G., Martin, N., Hernandez, D., Bandinelli, S., Van der Harst, P., Uda, M., Vollenweider, P., Scott, R., Langenberg, C., Wareham, N., InterAct Consortiumw, Van Duijn, C., Beilby, J., Pramstaller, P., Hicks, A., Ouweland, W., Oexle, K., Gieger, C., Metspalu, A., Camaschella, C., Toniolo, D., Swinkels, D., Whitfield, J. 2014. Novel loci affecting iron homeostasis and their effects in individuals at risk for hemochromatosis. *Nat. Comm.*, vol. 5: 1-10.
- Bohr, V. 1995. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogen.*, vol. 16: 2885-2892.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalprà, L., De Ferrani, M., Degrassi, F., Formi, A., Lamberti, L., Lando, C., Migliore, L. Padovani, P., Pasquini, R., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M., Bonassi, S. 1997. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Can. Epidemiol. Biomar. Prev.*, vol. 6: 249-256.
- Canalle, R., Silveira, V., Scrideli, C., Queiroz, R., Lopes, L., Tone, L. 2011. Impact of thymidylate synthase promoter and DNA repair gene polymorphisms on susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymph.*, vol. 52: 1118-1126.
- Cervantes, E., Ortiz, R., Konigsberg, M., Graniel, J., Rodríguez, L. 2018. Assessment of micronucleus and oxidative stress in peripheral blood from malnourished children. *Nut. Hosp.*, vol. 35: 519-526.
- Cervantes, E., Rodríguez, L., Graniel, J., Ortiz, R. 2014. Evaluación de la frecuencia y tipo de micronúcleos en niños con desnutrición moderada y grave. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, vol. 30: 23-35.
- Countryman, P., Heddle, J. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Rev. Mutagen.*, vol. 41: 321-332.
- Dabelsteen, E. y Gao, S. 2004. ABO blood-group antigens in oral cancer. *Dent. Res.*, vol. 84: 21-28.
- Dawson, D.; Bury, H. 1961. The significance of Howell-Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears. *Rev. Clin. Path.*, vol. 14: 374-378.
- De Murcia, J., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Marks, M., Olivier, F., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Waltzinger, C., Chambon, P., De Murcia, G. 1997. Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl., Acad. Sci.*, vol. 94: 7303-7307.

- Dertinger, S., Bishop, M., McNamee, J., Hayashi, M., Suzuki, T., Asano, N., Nakajima, M., Saito, J., Moore, M., Torous, D., MacGregor, J. 2006. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: intra- and inter-laboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicol. Sci.*, vol. 94: 83-91.
- Dertinger, S., Chen, Y., Miller, R., Brewer, K., Smudzin, T., Torous, D., Hall, N., Olvany, K., Murante, F., Tometsko, C. 2003. Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. *Mut. Res.*, vol. 542, 77-87.
- Dertinger, S., Torous, D., Tometsko, K. 1996. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mut. Res.*, vol. 371: 283-292.
- De Ruyck, K., Eijkeren, M., Claes, K., Morthier, R., Paepe, A., Vral, A., Ridder, L., Thierens, H. 2004. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in *XRCC1*, *XRCC3*, and *OGG1* genes and *in vitro* chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Elsevier*, vol. 62: 1140-1149.
- Duell, E., Wiencke, J., Cheng, T., Varkonyi, A., Zuo, Z., Devi, T., Ashok, S., Mark, E., Wain, J., Christiani, D., Kelsey, K. 2000. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogen.*, vol. 21: 965-971.
- Duman, N., Aktan, M., Ozturk, S., Palanduz, S., Cakiris, A., Ustek, D., Ozbek, U., Nalcaci, M., Cefle, K. 2012. Investigation of Arg399Gln and Arg194Trp polymorphisms of the *XRCC1* (x-ray cross-complementing group 1) gene and its correlation to sister chromatid exchange frequency in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genet. Test Mol. Biomark.*, vol. 16: 287-291.
- Fenech, M. 1998. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci.*, vol. 20: 23-36.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, vol. 2: 1084-1104.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A., Surralles, J., Crott, J., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D., Tucker, J., Thomas, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagen.*, vol. 26: 125-132.
- Fenech, M., Nersesyan, A., Knasmueller, S. 2016. A systematic review of the association between occupational exposure to formaldehyde and effects on chromosomal DNA damage measured using the cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes. *Mut. Res.*, vol. 770: 46-57.

- Fitzgerald, R., McEwan, C. 1977. Total aneuploidy and age-related sex chromosome aneuploidy in cultured lymphocytes of normal men and women. *Hum. Genet.*, vol. 39: 329-337.
- Fixation and flow cytometry. 2014. En línea. Fecha de consulta: 22 noviembre de 2019. Sitio web: <https://bitesizebio.com/22141/fixation-and-flow-cytometry/>
- Galloway, S., Buckton, K. 1978. Aneuploidy and aging: chromosome studies on a random sample of the population using GBanding. *Cytogen. Cell. Genet.*, vol. 20: 78-95.
- Ganguly, B. 1993. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors. Related to donor's age. *Mutat. Res.*, vol. 295: 135-148.
- Ganster, C., Neesen, J., Zehetmayer, S., Jager, U., Esterbauer, H., Mannhalter, C., Kluge, B., Fonatsch, C. 2009. DNA repair polymorphisms associated with cytogenetic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Gen. Chrom. Can.*, vol. 48: 760-767.
- Gollapudi, B. y Kamra, O. 1979. Application of a simple Giemsa-staining method in the micronucleus test. *Mut. Res.*, vol. 64: 45-46.
- Goode, E., Ulrich, C., Potter, J. 2002. Polymorphism in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biom. Preven.*, vol. 11: 1513-1530.
- Grawé, B., Zetterberg, G., Amnéus, H. 1992. Flow-cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Cytom.*, vol. 13: 750-758.
- Hando, J., Nath, J., Tucker, J. 1994. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromos.*, vol. 103: 186-192.
- Hayashi, M. 2016. The micronucleus test – most widely used *in vivo* genotoxicity test-. *Gen. Environ.*, vol. 38: 2-6.
- Hayashi, M., MacGregor, J., Gatehouse, D., Blakey, D., Dertinger, S., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Asano, N., Suzuki, H., Ohyamal, W., Gibson, D. 2007. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mut. Res.*, vol. 627: 10-30.
- Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, J. 1983. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mut. Res.*, vol. 120:241-247.

- Heddle, J. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mut. Res.*, vol.18: 187-190.
- Heddle, J., Fenech, M., Hayashi, M., MacGregor, J. 2011. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagen.*, vol. 26: 3-10.
- Jain, A., Yadav, S., Beig, M., Purohit, S., Sharma, N. 2017. Base excision repair manipulation in breast carcinoma: a prospective avenue to potentiate genome insulting approach. *Oncomed.*, vol. 2: 42-51.
- Jung, S., Park, N., Shin, J., Park, B., Kim, C., et al. 2012. Polymorphisms of DNA repair genes in Korean hepatocellular carcinoma patients with chronic hepatitis B: possible implications on survival. *Hepatol.*, vol. 57: 621–627.
- Kasten, F. 1967. Cytochemical studies with Acridine Orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acid. *Cytol.*, vol. 21: 141-202.
- Kim, H., Kim, N., Yu, L., Tran, H., Kim, Y., Lee, I., Shin, M., Park, K., Choi, J., Kim, H. 2012. Association of GSTT1 polymorphism with acute myeloid leukemia risk is dependent on smoking status. *Leuk. Lymph.*, vol. 53: 681-7.
- Kotova, N., Frostne, C., Abramsson, L., Tareke, E., Bergman, R., Haghdoost, S., Paulsson, B., Törnqvist, E., Segerbäck, D., Jenssen, D., Grawé, J. 2015. Differences in micronucleus frequency and acrylamide adduct levels with hemoglobin between vegetarians and non-vegetarians. *Eur. J. Nutr.*, vol. 54: 1181-1190.
- Krishna, G. y Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mut. Res.*, vol. 455: 155-166.
- Levitt, D., King, M. 1987. Methanol fixation permits flow cytometric analysis of immunofluorescent stained intracellular antigens. *Immuno. Meth.*, vol. 96: 233-237.
- Lombard, D., Chua, K., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., Alt, F. 2005. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell.*, vol. 120: 497-512.
- Lunn, R., Langlois, R., Hsieh, L., Thompson, C., Bell, D. 1999. *XRCC1* polymorphisms: effect on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Can. Res.*, vol. 59: 2557-2561.
- MacGregor, J., Bishop, E., McNamee, P., Hayashi, M., Asano, N., Wakata, A., Nakajima, M., Saito, J., Aidoo, A., Moore M., Dertinger, S. 2006. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood

- reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. *Toxicol. Sci.*, vol. 94: 92-107.
- Manahan, S. 2003. Toxicological chemistry and biochemistry. Boca Raton, Florida. 3ra. Ed. Lewis Pub. 424.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier, J., De Murcia, G. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18: 3563-3571.
- Mathon, N., Lloyd, A. 2001. Cell senescence and cancer. *Nat. Rev. Can.*, vol. 1: 203-213.
- Matsuo, K., Hamajima, N., Suzuki, R., Andoh, M., Nakamura, S., Seto, M., Morishimae, Y., Tajima, K. 2004. Lack of association between DNA base excision repair gene XRCC1 Gln399Arg polymorphism and risk of malignant lymphoma in Japan. *Can. Genet. Cytogenet.*, vol. 149: 77-80.
- Méndez, E. 2004. Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO Rh (D) en la zona media del Estado de San Luis Potosí. *Rev. Fac. Med. UNAM*, vol. 47: 21-23.
- Meza, J., Peralta, V., Gutierrez, M., Macias, N., Ayala, M., Barros, P., Duran, J., Leal, E. 2009. XRCC1 polymorphisms and haplotypes in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia. *Genet. Mol. Res.*, vol. 8: 1451-1458.
- Migliore, L., Parrini, M., Sbrana, I., Biagini, A., Battaglia, A., Loprieno, N. 1991. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutat. Res.*, vol. 256: 13-20.
- Misteli, T., Soutoglou, E. 2009. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Mol. Cell Biol.*, vol. 10: 243-254.
- Monroy, C., Cortes, A., Lopez, M., Rourke, E., Etzel, C., Younes, A., Strom, S., El-Zein, R. 2011. Hodgkin lymphoma risk: role of genetic polymorphisms and gene-gene interactions in DNA repair pathways. *Mol. Carcinogen.*, vol. 50: 825-834.
- Montero, R., Araujo, A., Serrano, L., Castellanos, C. 2016. Use of RNA content to identify reticulocytes in the *in vivo* micronucleus test in humans. *Cur. Top. Toxicol.*, vol. 12, 111-123.
- Montero, R., López, R., Méndez, A., Galicia, I., García, G., Serrano, L., Beltrán, R., Rosado, S., Albores, A., Oropeza, L., Hernández, L., Mercado, F., Alvarado, E., Herrera, S., Arellano, O. 2020. Increased

- micronucleus frequencies in reticulocytes of children exposed to industrial pollution: oxidative stress and the *OGG1 S326C* polymorphism. *Mut. Res. Gen. Toxicol. Environ.*, vol. 853: 503170.
- Morita, T., Asano, N., Awogi, T., Sasaki, Y., Sato, S., Shimada, H., Sutou, S., Suzuki, T., Wakata, A., Sofuni, T., Hayashi, M. 1997. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens – Groups 1, 2A and 2B. The summary report of the 6th collaborative study by CSGMTrJEMSPMMS. *Mut. Res.*, vol. 389: 3-122.
- Natukula, K., Jamil, K., Pingali, U., Suresh, V., Naidu, U. 2013. The codon 399 Arg/Gln XRCC1 polymorphism is associated with lung cancer in Indians. *Asian Pac. J. Can. Prev.*, vol. 14: 5275-5279.
- Nersesyan, A., Fenech, M., Bolognesi, C., Mišák, M., Setayesh, T., Wultsch, G., Bonassi, S., Thomas, P., Knasmüller, S. 2016. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: past, present and future. *Mutat. Res.*, vol. 770: 1–11.
- NCBI. 2019. *OGG1 8-oxoguanine DNA glycosylase (Homo sapiens (human))*. En línea. Fecha de consulta: 31 de octubre de 2019. Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=4968>
- Norppa, H., Falck, G. 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagen.*, vol. 18: 221-233.
- Orta, T., Günebakan, S. 2012. The effect of aging on micronuclei frequency and proliferation in human peripheral blood lymphocytes. *Indian J. Hum. Genet.*, vol. 18: 95-100.
- Pearse, A. 1972. Fluorescence microscopy, in: A.G.E. Pearse, *Histochemistry -- Theoretical and Applied*, 3rd edn., Churchill Livingstone, Edinburgh and London, pp. 1171-1206.
- Pérez, R., Méndez, I., Castro, C., Martínez, O., Gonsebatt, M., Rubio, J. 2011. Polymorphisms associated with the risk of lung cancer in a healthy Mexican Mestizo population: application of the additive model for cancer. *Genet. Mol. Biol.*, vol.34: 546-552.
- Pierre, R., Hoagland, H. 1972. Age-associated aneuploidy: loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging. *Can.*, vol. 30: 889-894.
- Raffield, L., Louie, T., Sofer, T., Jain, D., Ipp, E., Taylor, K., Papanicolaou, G., Avilés-Santa, L., Lange, L., Laurie, C., Conomos, M., Thornton, T., Chen, Y., Qi, Q., Cotler, S., Thyagarajan, B., Schneiderman, N., Rotter, J., Reiner, A., Lin, H. 2017. Genome-wide association study of iron traits and relation to

- diabetes in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL): potential genomic intersection of iron and glucose regulation? *Hum. Mol. Gen.*, vol. 26: 1966-1978.
- Ramsey, M., Moore, D., Briner, J., Lee, D., Olse, L., Senft, J., Tucker, J. 1995. The effects of age and lifestyle on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mut. Res.*, vol. 338: 95-106.
- Richard, F., Aurias, A., Couturier, J., Dutrillaux, A., Herard, A., Gerbault-Seureau, M., Hoffschir, F., Lamoliatte, E., Lefrancois, D., Lombard, M., Muleris, M., Prieur, M., Ricoul, M., Sabatier, L., Viegas-Pequignot, E., Volobouev, V., Dutrillaux, B. 1993. Aneuploidy in human lymphocytes: an extensive study of eight individuals of various ages. *Mutat. Res.*, vol. 295: 71-80.
- Rigler, R. 1969. Acridine Orange in nucleic acid analysis. *Acad. Sci.*, vol. 157: 211-224.
- Ríos, G., Velasco, M. 2017. Manual de practicas para el laboratorio de hematología. En línea. Fecha de consulta: 10 de abril de 2020. Sitio web: https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/17Manual_Hematologia.pdf
- R'zik, S., Loo, M., Beguin, Y. 2001. Retycolocyte transferrin receptor (Tfr) expression and contribution to soluble Trf levels. *Haematol.*, vol. 86: 244-251.
- Roberts, M., Shields, P., Ambrosone, C., Nie, J., Marian, C., Krishnan, S., Goerlitz, D., Modali, R., Seddon, M., Lehman, T., Amend, K., Trevisan, M., Edge, S., Freudenheim, J. 2011. Singlenucleotide polymorphisms in DNA repair genes and association with breast cancer risk in the web study. *Carcinogen.*, vol. 32: 1223-1230.
- Rodrigues, A., Vanzeler, T., Espíndola, G. 2015. Identification of polymorphisms of XRCC1 gene in patients with cancer in a city of northern Brazil. *Bras. Patol. Med. Lab.*, vol. 51: 138-142.
- Sakamoto, T., Higaki, Y., Hara, M., Ichiba, M., Horita, M., et al. 2006. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma among Japanese. *Epidemiol.*, vol. 16: 233-239.
- Santonocito, C., Scapaticci, M., Nedovic, B., Annicchiarico, E., Guarino, D., Leoncini, E., Boccia, S., Gasbarrini, A., Capoluongo, E. 2017. XRCC1 Arg399Gln gene polymorphism and hepatocellular carcinoma risk in the Italian population. *Int. J. Biol. Markers*, vol. 32: e190-e194.
- Schmid, W. 1973. Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Ag. Act.*, vol. 3: 77-85.
- Schneider, E. 1978. The genetics of aging. *Plenum Publish. Corp.*, New York, New York, 27-52.

- Senga, E., Harper, G., Koshy, G., Kazembe, P., Brabin, B. 2011. Reduced risk for placental malaria in iron deficient women. *Mal. J.*, vol. 10: 1-5.
- Seukep, A., Noumedem, J., Djeussi, D., Kuete, V. 2014. Genotoxicity and teratogenicity of African medicinal plants. Dschang, Cameroon. *Toxicol. Surv. Of African Med. Plants.* 235-275.
- Shen, M., Jones, I., Mohrenweiser, H. 1998. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Can. Res.*, vol. 58: 604-608.
- Smolarz, B., Makowska, M., Samulak, D., Michalska, M., Mojs, E., Wilczak, M., Romanowicz, H. 2014. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of ERCC2, hOGG1, and XRCC1 DNA repair genes and the risk of triple-negative breast cancer in Polish women. *Tumour Biol.*, vol. 35: 3495-502.
- Sohal, R., Weindruch, R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Sci.*, vol. 273: 59-63.
- Sorour, A., Ayad, M., Kassem, H. 2013. The genotype distribution of the XRCC1, XRCC3, and XPD DNA repair genes and their role for the development of acute myeloblastic leukemia. *Genet. Test Mol. Biomark.*, vol. 17: 195-201.
- Squire, J., Whitmore, G., Phillips, R. 1998. Genetic basis of cancer. In: I. F. Tannock and R. P. Hill (eds.), *The Basic Science of Oncology*, pp. 48–78.
- Tang, Y., Li, X., Liu, T., Yang, J., Luo, J., et al. 2011. Genetic polymorphisms of DNA repair genes in patients with hepatocellular carcinoma. *Shandong Yi Yao*, vol. 51: 19–20.
- Thameem, F., Puppala, S., Lehman, D., Stern, M., Blangero, J., Abboud, H., Duggirala, R., Habib, S. 2010. The Ser(326)Cys polymorphism of 8-oxoguanine glycosylase 1 (OGG1) is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Hum. Hered.*, vol. 70: 97-101.
- Thompson, L., West, M. 2000. *XRCC1* keeps DNA from getting stranded. *Mutant. Res.*, vol. 459: 1-18.
- Wakata, A., Miyamae, Y., Sato, S., Suzuki, T., Morita, T., Asano, N., Awogi, T., Kondo, K., Hayashi, M. 1998. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: the summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group. *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 32: 84-100.
- Wang, W., Dang, S., Li, Y., Sun, M., Jia, X., Wang, R., Liu, J. 2013. *HOGG1* Ser326Cys polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma among East Asians: a metaanalysis. *PLoS ONE*, vol. 8: e60178.

- Wegelius, R., Weber, T. 1978. Transient erythroblastopenia in childhood. *Acta Paediatr. Scand.*, vol. 67: 513-518.
- Wong, R., Du, C., Wang, J., Chan, C., Luo, J., Cheng, T. 2002. *XRCC1* and *CYP2E1* polymorphisms as susceptibility factors of plasma mutant p53 protein and anti-p53 antibody expression in vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers. *Can. Epidemiol.*, vol. 11: 475-482.
- Wu, X., Gu, J., Spitz, M. 2007. Mutagen sensitivity: a genetic predisposition factor for cancer. *Can. Res.*, vol. 67: 3493-3495.
- Xie, H., Xia, K., Rong, H., Chen, X. 2013. Genetic polymorphism in hOGG1 is associated with triplenegative breast cancer risk in Chinese Han women. *Breast*, vol. 22: 707-712.
- Yang, X., Ma, L., Zhao, X., Yang, H., Ruan, L. 2016. A meta-analysis study on XRCC1 Arg399Gln polymorphism and hematological malignancies. *Int.J. Clin. Exp. Med.*, vol. 9: 19244-19255.
- Yuan, T., Wei, J., Luo, J., Liu, M., Deng, S., et al. 2012. Polymorphisms of base excision repair genes hOGG1 326cys and XRCC1 280His increase hepatocellular carcinoma risk. *Dig. Dis. Sci.*, vol. 57: 2451-2457.
- Zhang, X., Morera, S., Bates, P., Whitehead, P., Coffey, A., Hainbucher, K., Nash, R., Stenberg, M., Lindahl, T., Freemont, P. 1998. Structure of an *XRCC1* BCRT domain: a new protein-protein interaction module. *EMBO*, vol. 17: 6404-6411.

XII. ANEXO



Instituto de Investigaciones Biomédicas
APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MÉXICO, CDMX

Folio _____

Fecha: día _____ mes _____ año _____

Nombre completo: _____

Sexo: (F) (M) Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____

Domicilio (Colonia y delegación o municipio): _____

Tiempo de residencia en la Ciudad de México: ____ Peso: ____ Estatura: ____ Nacionalidad: ____

¿Practica algún deporte? (sí) (no) ¿Qué deporte y con qué regularidad? _____

Aproximadamente, ¿cuántas horas dormió la noche anterior a la toma de muestra? _____

¿Se hidrató adecuadamente durante el día anterior a la toma de muestra? (sí) (no) ¿Cuántos litros consumió? _____

¿Tiene o tuvo:

Enfermedad viral reciente (menos de un mes)? (Sí) (No)

Radiografía reciente (menos de un mes)? (Sí) (No)

Enfermedad parasitaria? (Sí) (No)

Diabetes? (Sí) (No)

Obesidad? (Sí) (No)

Hipertensión? (Sí) (No)

¿Está tomando algún tipo de medicamento o complemento vitamínico? (sí) (no)

¿Qué está tomando? _____ ¿Cuál es la marca? _____

¿Con qué frecuencia? _____ ¿Cuál es la dosis? _____

(NOTA: Si está tomando antibiótico, favor de llenar completa esta sección)

¿Padres fumadores? (sí) (no) ¿Con qué frecuencia y cantidad de cigarros? _____

¿Autoriza que se determine sus polimorfismos genéticos? (sí) (no)

¿Autoriza que se determine su grupo sanguíneo? (sí) (no)

Encuesta aplicada por: _____

Figura A1. Encuesta aplicada a los donadores de este estudio.

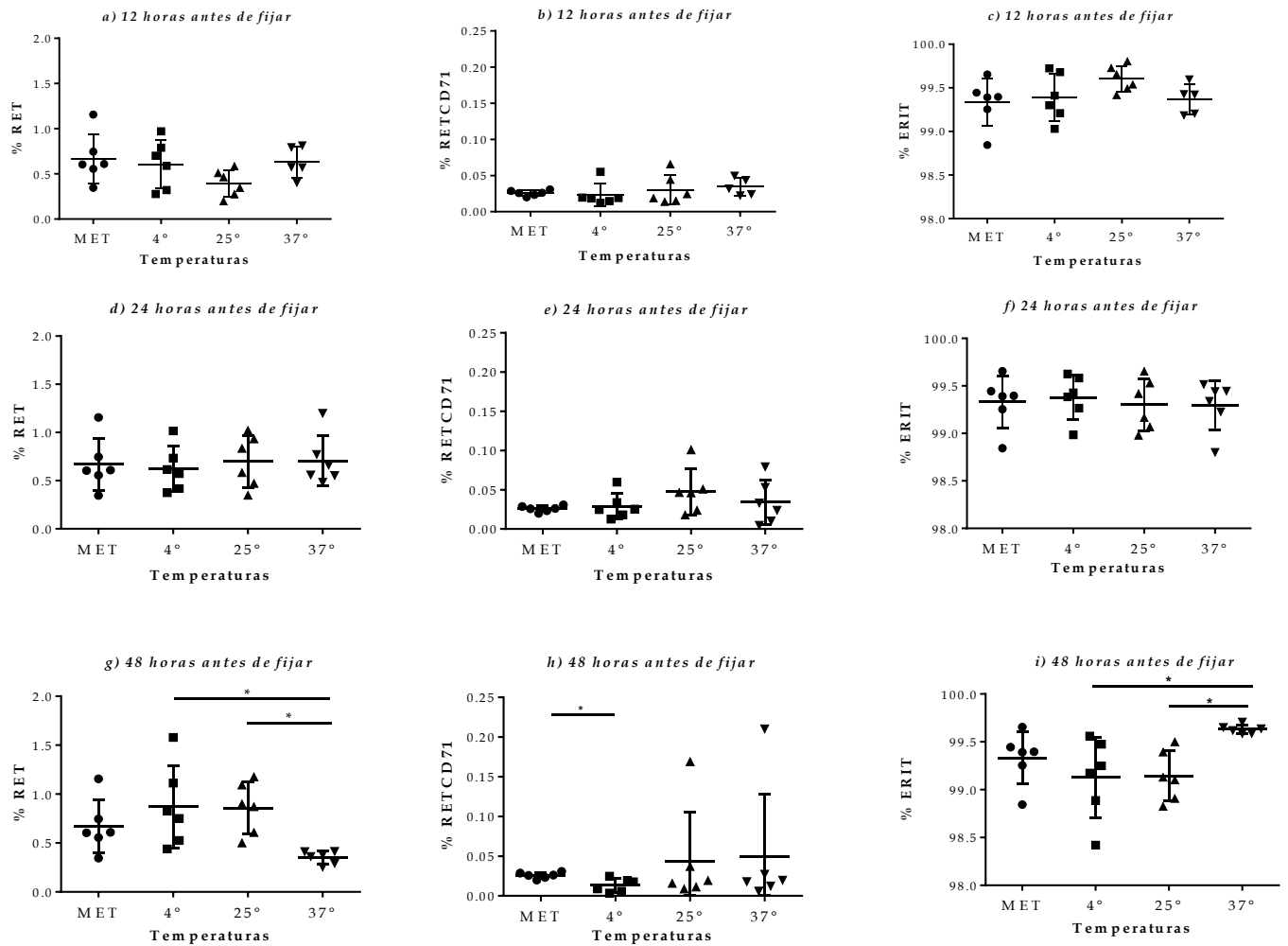


Figura A2. Porcentaje de RET, RETCD71 y ERIT. La comparación fue hecha entre las muestras fijadas en MET (las que se fijaron inmediatamente después de su obtención) y las distintas temperaturas de almacenamiento (4°C, 25°C y 37°C) antes de fijar las muestras. **(a, d, g)** Comparación del conteo de RET que fueron mantenidos bajo las temperaturas mostradas durante 12, 24 y 48 horas antes de fijarlos, respectivamente. **(b, e, h)** Comparación del conteo de RETCD71 que fueron mantenidos bajo las temperaturas mostradas durante 12, 24 y 48 horas antes de fijarlos, respectivamente. **(c, f, i)** Comparación del conteo de ERIT que fueron mantenidos bajo las temperaturas mostradas durante 12, 24 y 48 horas antes de fijarlos, respectivamente. El conteo de ERIT fue estadísticamente significativo entre MET y las almacenadas a 25°C durante 12 y 48 horas previas a la fijación ($p < 0.05$) (c y f). El porcentaje de RET fue estadísticamente significativo entre las muestras almacenadas durante 48 horas a 37°C con respecto a aquellas de 4°C y 25°C ($p < 0.05$) (g). También hubo diferencias significativas en el conteo de RETCD71 entre las muestras almacenadas a 4°C respecto aquellas almacenadas inmediatamente en MET ($p < 0.05$) (h).

Tabla 1a

Diferencias entre los tipos de fijación MET, PFA y PM (dos semanas después fijar las muestras).

%	MET (n=6)				PFA (n=6)				PM (n=6)				P *
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
Células individuales	95.01a (±3.06)	94.40	90.27	98.92	11.66 (±5.81)	10.26	5.77	20.10	58.22 (±8.95)	59.87	46.98	69.16	0.0001
RET	1.30 (±0.18)	1.31	1.03	1.56	3.49 (±3.63)	1.90	0.64	10.21	1.37 (±0.74)	1.32	0.54	2.49	0.3998

MET: metanol; PFA: paraformaldehído; PM: paraformaldehído y metanol. Las comparaciones se hicieron entre los tres tipos de fijación MET, PFA y PM. Valor de *p* obtenido de la prueba de Kruskal-Wallis. (a): Diferencias estadísticamente significativas en el conteo de células individuales entre MET y PFA ($p < 0.05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el conteo de las células individuales entre PFA y PM, ni entre MET y PM ($p > 0.05$).

Tabla 2a

Diferencias entre los tipos de fijación MET y PM (seis semanas después fijar las muestras).

%	MET (n=6)				PM (n=6)				P *
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
Células individuales	88.25a (±8.08)	87.95	75.82	101	5.50 (±1.53)	5.25	3.94	8.15	0.0022
RET	1.01b (±0.22)	0.96	0.76	1.34	2.02 (±0.47)	1.97	1.57	2.67	0.0022

MET: metanol; PM: paraformaldehído y metanol. Las comparaciones se hicieron entre los tres tipos de fijación MET y PM. (a y b): Diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células individuales y de RET entre MET y PM ($p < 0.05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el conteo de células individuales entre MET y PM ($p > 0.05$).

Tabla 3a

Diferencias los tipos de fijación MET y PM (diez semanas después fijar las muestras).

%	MET (n=6)				PM (n=6)				P *
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
Células individuales	79.69a (±8.71)	80.35	69.65	94.18	48.22 (±22.42)	40.80	21.17	80.08	0.0260
RET	0.74b (±0.21)	0.77	0.45	1.01	0.15 (±0.06)	0.14	0.10	0.26	0.0022

MET: metanol; PM: paraformaldehído y metanol. Las comparaciones se hicieron entre los tipos de fijación MET y PM. (a y b) Diferencias estadísticamente significativas en el conteo de células individuales y RET, respectivamente, entre MET y PM ($p > 0.05$).

Tabla 4a*Diferencias en el conteo de células eritroides almacenadas bajo las temperaturas indicadas durante 12 horas antes de fijar.*

%	MET (n=6)				4°C (n=6)				25°C (n=6)				37°C (n=6)				P *
	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	
RET	0.67 (±0.27)	0.61	0.34	1.16	0.61 (±0.27)	0.64	0.28	0.97	0.40 (±0.15)	0.4	0.20	0.58	0.63 (±0.17)	0.57	0.40	0.81	0.1408
RETCD71	0.02 (±0.004)	0.02	0.02	0.03	0.02 (±0.02)	0.02	0.01	0.05	0.03 (±0.02)	0.02	0.01	0.06	0.03 (±0.01)	0.03	0.02	0.05	0.2028
ERIT	99.33 (±0.27)	99.39	98.84	99.65	99.39 (±0.27)	99.36	99.03	99.72	99.60 (±0.15)	99.60	99.42	99.80	99.37 (±0.17)	99.42	99.19	99.60	0.1408

Las comparaciones se hicieron entre las muestras fijadas en MET, las almacenadas a 4°C, 25°C y 37°C durante 12 horas antes de ser fijadas en MET. (a) Diferencias significativas en el conteo de ERIT de las muestras almacenadas a 25°C con respecto a MET ($p < 0.05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los otros parámetros entre las diversas temperaturas de almacenamiento ($p < 0.05$).

Tabla 5a*Diferencias en el conteo de células eritroides almacenadas bajo las temperaturas indicadas durante 24 horas antes de fijar.*

%	MET (n=6)				4°C (n=6)				25°C (n=6)				37°C (n=6)				P *
	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	
RET	0.67 (±0.27)	0.61	0.34	1.16	0.62 (±0.23)	0.59	0.37	1.01	0.70 (±0.27)	0.71	0.35	1.02	0.7 (±0.26)	0.61	0.48	1.20	0.965
RETCD71	0.02 (±0.004)	0.02	0.02	0.03	0.03 (±0.02)	0.02	0.01	0.06	0.05 (±0.03)	0.05	0.02	0.10	0.03 (±0.03)	0.03	0.005	0.08	0.6854
ERIT	99.33 (±0.27)	99.39	98.84	99.65	99.38 (±0.23)	99.41	98.98	99.63	99.30 (±0.27)	99.29	98.98	99.65	99.30 (±0.26)	99.39	98.80	99.52	0.9650

Las comparaciones se hicieron entre las muestras fijadas en MET, las almacenadas a 4°C, 25°C y 37°C durante 24 horas y luego fijadas en MET. (a) Diferencias significativas en el conteo de ERIT de las muestras almacenadas a 25°C con respecto a MET ($p < 0.05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los otros parámetros entre las diversas temperaturas de almacenamiento ($p < 0.05$).

Tabla 6a*Diferencias en el conteo de células eritroides almacenadas bajo las temperaturas indicadas durante 48 horas antes de fijar.*

%	MET (n=6)				4°C (n=6)				25°C (n=6)				37°C (n=6)				P *
	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Media	Mediana	Mín.	Máx.	
RET	0.67 (±0.27)	0.61	0.34	1.16	0.87a (±0.42)	0.79	0.44	1.58	0.86b (±0.26)	0.88	0.50	1.17	0.35 (±0.06)	0.37	0.26	0.41	0.0066
RETCD71	0.02 (±0.004)	0.02	0.02	0.03	0.01c (±0.008)	0.01	0.003	0.02	0.04 (±0.06)	0.02	0.009	0.17	0.05 (±0.08)	0.02	0.006	0.21	0.0412
ERIT	99.33 (±0.2714)	99.39	98.84	99.65	99.13 (±0.42)	99.21	98.42	99.56	99.14 (±0.26)	99.12	98.82	99.50	99.63d (±0.04)	99.63	99.59	99.71	0.0077

Las comparaciones se hicieron entre las muestras fijadas en MET, las almacenadas a 4°C, 25°C y 37°C durante 48 horas y luego fijadas en MET. (a) Diferencias significativas en el conteo de RET de 4°C con respecto a 37°C ($p < 0.05$). (b) diferencias significativas en el conteo de RET de 25°C con respecto a 37°C ($p < 0.05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los otros parámetros entre las diversas temperaturas de almacenamiento ($p < 0.05$). (c) Diferencias significativas en el conteo de RETCD71 entre las muestras que estuvieron almacenadas a 4°C y las fijadas inmediatamente en MET ($p < 0.05$). (d) Diferencias significativas en el porcentaje de ERIT entre las muestras almacenadas a 37°C comparado con aquellas que estuvieron a 4°C y 25°C ($p < 0.05$).

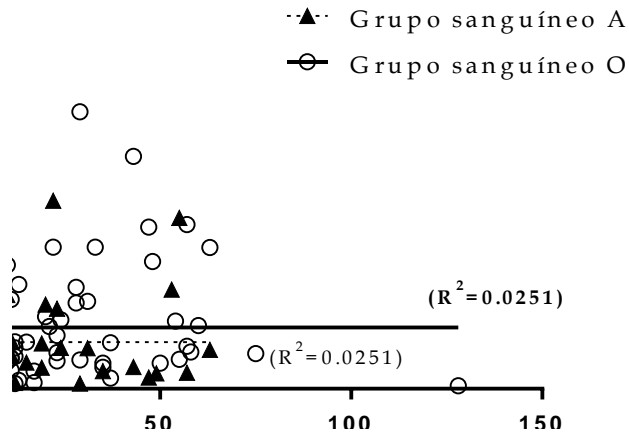


Figura 3A. Relación del grupo sanguíneo y la edad con la frecuencia de MN-RET determinada con CF en donadores sanos. El valor de $R^2=0.0251$ indica la línea regresión para ambos grupos sanguíneos ($p>0.05$). No hay diferencias estadísticas entre los participantes de los grupos sanguíneos O ni A

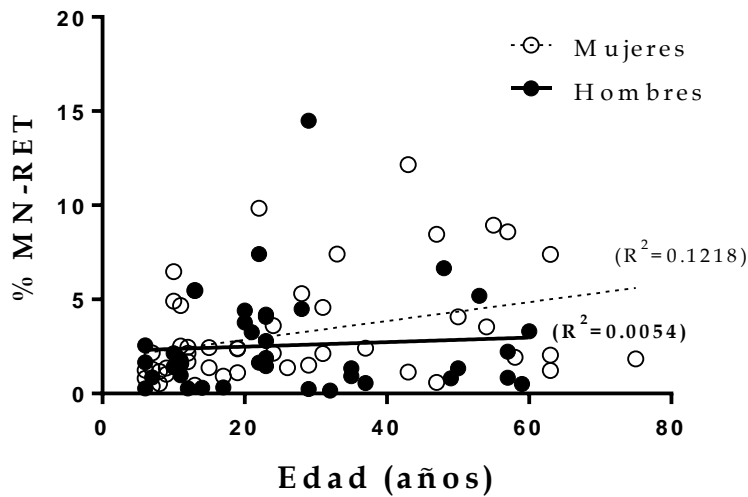


Figura 4A. Relación del sexo y la edad con la frecuencia de MN-RET determinada con CF en donadores sanos. El valor de $R^2=0.1218$ indica la línea regresión para las mujeres ($p<0.05$); el valor de $R^2=0.0054$ indica la línea de regresión para los hombres ($p>0.05$). No hay diferencias estadísticas entre hombres y mujeres.

Tabla 7a

Diferencias en el conteo de RET, RETCD71, MN-RET, MN-RETCD71 y MN-ERIT entre individuos con tipos sanguíneos A+, B+ y O+.

% Reticulocitos	A+ (n=26)				B+ (n=5)				O+ (n=59)				P *
	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	
ARN (RET)	1.85 (±1.49)	1.24	0.34	0.07	0.74 (±0.36)	0.63	0.42	1.37	2.07 (±1.63)	1.44	0.31	6.03	0.0765
CD71 (RETCD71)	0.19 (±0.09)	0.17	0.02	0.41	0.13 (±0.08)	0.13	0.02	0.21	0.23 (±0.17)	0.18	0.04	0.92	0.387
% Micronúcleos	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	Media (D.E.)	Mediana	Mín.	Máx.	P *
MN-RET	2.44 (±2.47)	1.52	0.28	9.85	2.28 (±1.72)	1.64	0.24	4.07	3.21 (±2.97)	2.15	0.16	14.50	0.2945
MN-RETCD71	0.44 (±0.56)	0.22	0	1.93	0.94 ^a (±0.37)	0.99	0.33	1.35	0.4 (±0.61)	0.18	0	3.61	0.0304
MN-ERIT	0.26 (±0.04)	0.009	0.0009	0.14	0.09 (±0.09)	0.04	0.002	0.22	0.04 (±0.08)	0.01	0.0004	0.34	0.2649

La comparación se realizó entre individuos de los tipos sanguíneos del sistema ABO Rh. (a) Diferencias estadísticamente significativas en el conteo de MN-RETCD71 entre los tipos sanguíneos O+ y B+ ($p < 0.05$). En el resto de los parámetros no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).