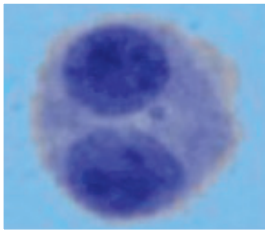
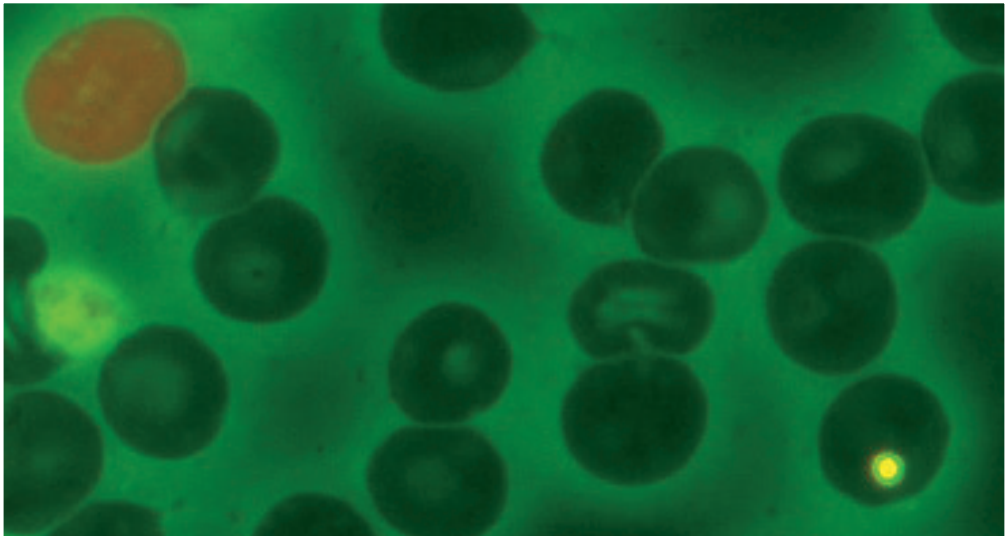
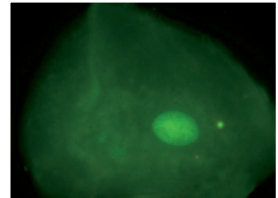


Micronúcleos, Genotoxicidad y Citotoxicidad: Implicaciones en la Salud y el Medio Ambiente

María Evarista Arellano García
Olivia Torres Bugarín
María Luisa Ramos Ibarra



Universidad de Guadalajara

Micronúcleos, genotoxicidad y citotoxicidad:

Implicaciones en la salud y el Medio Ambiente



DIRECTORIO

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Mtra. Karla Alejandrina Planter Pérez

Rectora

Dr. Héctor Raúl Solís Gadea

Vicerrector Ejecutivo

Mtro. César Antonio Barba Delgadillo

Secretario General

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Dra. Graciela Gudiño Cabrera

Rectora CUCBA

Dr. César Guillermo Ruvalcaba Gómez

Secretario Académico

Dr. Carlos Gauna Ruiz de León

Secretario Administrativo

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS

Dr. Miguel Ángel Ayala Valdovinos

Director de División

Mtra. Cecilia Jiménez Plascencia

Secretario

DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA

Dr. Salvador Hernández Macías

Jefe de Departamento

Micronúcleos, genotoxicidad y citotoxicidad: **Implicaciones en la salud y el Medio Ambiente**



María Evarista Arellano García
Olivia Torres Bugarín
María Luisa Ramos Ibarra

Micronúcleos, genotoxicidad y citotoxicidad: Implicaciones en la salud y el Medio Ambiente, es una publicación de la Universidad de Guadalajara



Este trabajo está autorizado bajo la licencia Creative Commons Atribución-NoComercialSinDerivadas 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND) lo que significa que el texto puede ser compartido y redistribuido, siempre que el crédito sea otorgado al autor, pero no puede ser mezclado, transformado, construir sobre él ni utilizado con propósitos comerciales. Para más detalles consúltese <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

©Primera edición: **2026**
D.R. Universidad de Guadalajara
Av. Juárez número 976
Guadalajara, Jalisco, México
44100

ISBN: **978-607-646-018-4**
eISBN pdf: **978-607-646-019-1**

Las características de esta edición son propiedad de la Universidad de Guadalajara.

Este trabajo fue evaluado por las colegas: Dra. Brenda Díaz Cárdenas de la Universidad de Guadalajara y Dra. Clara Ibet Juárez Vázquez de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Revisión de estilo: Elisa Margarita Navarrete Quiroz

PRÓLOGO

Han transcurrido más de 70 años desde que Watson y Crick describieron la estructura del ADN, y más de dos décadas desde la culminación del Proyecto Genoma Humano. Sin embargo, a pesar de los notables avances científicos y tecnológicos alcanzados desde entonces, aún persisten numerosas interrogantes en torno al material genético que no se han resuelto.

La toxicología ha experimentado una evolución conceptual y metodológica progresiva, orientada primordialmente a la prevención de efectos adversos en la salud humana derivados de la exposición a agentes tóxicos, contaminantes ambientales y otros factores de riesgo. En este marco, las evaluaciones de genotoxicidad y citotoxicidad están consolidadas como componentes esenciales dentro de la toxicología moderna, al ofrecer herramientas fundamentales para el análisis de los mecanismos que protegen la estabilidad genética de los organismos.

El avance de las ciencias biomédicas y las tecnologías emergentes hacen posible la implementación de enfoques cada vez más sensibles y específicos para identificar alteraciones durante ciclo celular y en el ADN inducidas por xenobióticos. Estos desarrollos contribuyen al establecimiento de parámetros de la bioseguridad orientados a mitigar los riesgos asociados con la exposición a compuestos potencialmente genotóxicos o citotóxicos en sistemas biológicos complejos.

Aunque la genotoxicidad y la citotoxicidad constituyen disciplinas distintas dentro del campo de la toxicología, su estudio en conjunto

resulta indispensable, dado que proporcionan una visión integral del impacto biológico de diversos agentes. La genotoxicidad se orienta al análisis del daño directo sobre el material genético inducido por agentes mutagénicos, mientras que la citotoxicidad se enfoca en evaluar la viabilidad celular y las alteraciones en el ciclo celular como indicadores del impacto integral sobre la fisiología celular de una sustancia.

Sin duda, la complementariedad entre los estudios de genotoxicidad y citotoxicidad es esencial en la evaluación integral del riesgo toxicológico. Evaluar exclusivamente la ausencia de citotoxicidad puede ser insuficiente si una sustancia posee potencial genotóxico, dado que las alteraciones en el material genético pueden desencadenar efectos adversos acumulativos y de largo plazo, tales como la carcinogénesis. De manera análoga, la exclusión de compuestos basada únicamente en su citotoxicidad, sin una valoración concomitante de su perfil genético, podría derivar en decisiones regulatorias imprecisas o excesivamente restrictivas, con implicaciones negativas en contextos clínicos, industriales o ambientales.

Estas consideraciones adquieren particular relevancia en ámbitos como el desarrollo de fármacos, la creación de biomateriales, el diseño de dispositivos médicos y la gestión de residuos químicos, donde se demanda un enfoque integral que contemple tanto los efectos genotóxicos como los citotóxicos. En este sentido, la evaluación combinada de ambos tipos de toxicidad permite generar evidencia más sólida frente a la incertidumbre inherente al uso de nuevas sustancias sin historial toxicológico claramente establecido en organismos vivos.

A lo largo de los cinco capítulos que conforman esta obra, las autoras —con más de veinte años de experiencia en la aplicación de estas metodologías en sus respectivos laboratorios— proponen un enfoque integral para la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad fundamentado en técnicas validadas por organismos internacionales y aplicadas en diversos modelos biológicos. Cada capítulo ofrece una descripción minuciosa de los procedimientos metodológicos, abarcando desde la preparación de muestras hasta la interpretación de los resultados, lo que convierte a esta obra en una herramienta de consulta valiosa para estudiantes, académicos e investigadores interesados en incorporar es-

tos ensayos en sus propias investigaciones.

En particular, se destacan los ensayos basados en la detección de micronúcleos y otras anomalías nucleares, aplicables tanto en células animales como vegetales. Estos métodos no solo se caracterizan por su eficacia y relativa sencillez de implementación, sino también por su notable versatilidad, lo que permite su aplicación en una amplia gama de contextos, que incluyen estudios orientados a la salud humana, animal, vegetal e investigaciones ambientales y académicas.

Ofrece una guía detallada sobre las metodologías más utilizadas para evaluar el daño al ADN y la citotoxicidad, presentadas de manera accesible y didáctica. Las técnicas incluidas en este libro son ampliamente empleadas en laboratorios de toxicología genética y ambiental, ya que permiten obtener resultados confiables sin requerir equipos altamente especializados. Este enfoque lo convierte en un recurso valioso para laboratorios que buscan desarrollar investigaciones significativas con recursos limitados, sin sacrificar la calidad científica.

El proyecto que dio origen a esta obra fue auspiciado por la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California, en el marco del proyecto “Genotoxicidad y citotoxicidad de nanomateriales”, desarrollado en colaboración con el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara y la Universidad Autónoma de Guadalajara¹. Gracias al respaldo institucional y al trabajo conjunto entre estas casas de estudio, ha sido posible consolidar una línea de investigación orientada al análisis de los efectos genotóxicos y citotóxicos de diversas sustancias, con un énfasis particular en los nanomateriales y otros contaminantes emergentes.

Esta publicación refleja el compromiso de las autoras con la difusión del conocimiento y la promoción de metodologías accesibles, reproducibles y científicamente validadas para la evaluación de la genotoxicidad y la citotoxicidad.

En un contexto global cada vez más consciente de los riesgos asociados a la exposición a compuestos químicos y contaminantes ambientales, el estudio de la genotoxicología emerge como una disciplina cla-

¹El Programa Estancias Posdoctorales por México 2023, Modalidad Académica, con apoyo al posdoctorante con número de Registro 19104 (SECIHTI).



ve para la protección de la salud humana, animal y vegetal, así como también para la conservación del medio ambiente. Esta obra aspira a contribuir a ese objetivo mediante la formación de nuevas generaciones de científicos comprometidos con la evaluación rigurosa de los riesgos genéticos en sistemas biológicos.

Dra. Yanis Toledano Magaña
Instituto Tecnológico de Ensenada, Baja California



CONTENIDO

Prólogo	7
Introducción	11
Capítulo I. Micronúcleos: fundamento, relevancia biológica e implicaciones en la salud	21
Capítulo II. Micronúcleos en eritrocitos: evaluación genotoxicológica en médula ósea y sangre periférica	37
Capítulo III. Citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos	71
Capítulo IV. Ensayo de micronúcleos y anormalidades nucleares en epitelio de la mucosa oral	89
Capítulo V. El bioensayo en <i>Allium cepa</i> : herramienta para estudios de genotoxicidad y citotoxicidad	119
Literatura citada	135





INTRODUCCIÓN

Este libro está dirigido a estudiantes de licenciatura y posgrado que requieren información concisa y sintética sobre la evaluación del daño al ADN mediante técnicas de fácil implementación, relativamente rápidas y ampliamente validadas por la comunidad científica. También puede resultar de interés para investigadores y docentes que estudian la inestabilidad genómica y la citotoxicidad en muestras biológicas accesibles para casi cualquier laboratorio académico, mediante el uso de modelos celulares como el epitelio bucal, los eritrocitos de sangre periférica, los linfocitos y las células meristemáticas vegetales.

La genotoxicidad y la citotoxicidad son términos distintos, aunque conceptualmente complementarios. La genotoxicidad se refiere a las alteraciones inducidas en el material genético por agentes físicos, químicos o biológicos, los cuales pueden comprometer la integridad del ADN y, en consecuencia, afectar la funcionalidad celular y sus procesos vitales. La citotoxicidad, en cambio, alude a las modificaciones en el ciclo celular provocadas por agentes capaces de alterar su ritmo o interferir en los mecanismos de muerte celular, como la necrosis y la apoptosis.

En diversos casos, la citotoxicidad puede ser una manifestación de la genotoxicidad, ya que la viabilidad celular y la regulación del ciclo celular dependen directamente de la integridad estructural y funcional del ADN.

Aunque la estructura del ADN puede modificarse de manera natural como parte de un proceso dinámico, continuo y gradual, cuya con-



secuencia es la generación de la variabilidad genética y, por ende, la diversidad biológica; la genotoxicidad y la citotoxicidad, constituyen alteraciones inducidas por agentes que independientemente de su origen pueden comprometer gravemente la integridad del material genético. La naturaleza del daño genético puede ser silenciosa, especialmente cuando afecta regiones no codificantes del ADN sin impactar directamente en los procesos celulares. Sin embargo, cuando la alteración ocurre en secuencias funcionalmente relevantes, puede originar mutaciones que afectan la funcionalidad celular comprometiendo el funcionamiento de tejidos, órganos o sistemas completos, con implicaciones potencialmente severas para la integridad del organismo e incluso de la especie.

La información contenida en el genoma no solo se relaciona con las características físicas de un organismo, sino que también abarca aspectos como la susceptibilidad genética a enfermedades, la adaptación a entornos cambiantes y otros procesos biológicos. El estudio del genoma, conocido como genómica, proporciona la comprensión detallada de la base genética de la biología y la salud de un organismo. En este sentido, la estabilidad genómica se refiere a la capacidad de los organismos para mantener la integridad y la consistencia de su genoma a lo largo del tiempo y a través de las generaciones. En otras palabras, implica que el material genético (ADN, ARN y epigenoma) se mantenga sin daños o alteraciones significativas en las células somáticas del organismo durante su ciclo de vida, así como en las células germinales que se transmiten a la descendencia, dado que estas últimas son responsables de conservar la información genética de una generación a otra y pueden influir en la aparición de enfermedades hereditarias si presentan mutaciones.

Cualquier daño o alteración en el genoma puede tener consecuencias significativas, como la aparición de mutaciones que deriven en enfermedades genéticas, el desarrollo de cáncer u otros trastornos. La inestabilidad genómica y la citotoxicidad pueden ser inducidas por diversos factores, entre ellos la exposición a radiación ionizante, compuestos químicos mutagénicos, errores en los procesos de replicación del ADN o fallas en los mecanismos celulares de reparación del material genético,

que son esenciales para mantener la integridad del genoma; sin embargo, su deficiencia puede conducir a acumulación de daño y transformación celular. En este contexto, biomarcadores como los micronúcleos permiten detectar la presencia de daño genético acumulado y constituyen una herramienta clave en estudios genotoxicológicos.

Para la evaluación de la genotoxicidad y la citotoxicidad se han desarrollado diversas metodologías reconocidas y ampliamente aplicadas. Entre ellas se encuentran el ensayo de intercambio de cromátides hermanas, el ensayo cometa, y pruebas de viabilidad celular como el ensayo TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), que permite detectar la fragmentación del ADN mediante el marcaje de los extremos terminales de los ácidos nucleicos y el ensayo MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), un método colorimétrico para medir la viabilidad celular y el crecimiento celular en cultivos.

Además de estas técnicas, las pruebas basadas en el análisis citológico de micronúcleos y otras anormalidades nucleares se consideran de gran relevancia por su elevado grado de sensibilidad, aceptación científica, relativa simplicidad en su ejecución y accesibilidad metodológica. Existen múltiples variantes de este tipo de ensayos, todas derivadas del principio teórico propuesto inicialmente por Schmid (Schmid, 1975) y posteriormente adaptado a diferentes modelos celulares, entre ellos *Allium cepa* (Fisikesjö, 1979), médula ósea de ratón (Miller, 1973), eritrocitos de sangre periférica en ratón (Hayashi, et al., 2007) y otros vertebrados (Zúñiga et al., 1996a; 1996b; Zúñiga-González et al., 2000; Zúñiga-González et al., 2001); así como células epiteliales de mucosa oral o uroepiteliales (Torres-Bugarín et al., 2007).

Los micronúcleos son masas de cromatina con forma de pequeños núcleos cercanas a éste en células interfásicas. La técnica de micronúcleos presenta diversas ventajas cuando se cuenta con la certeza de que las células han atravesado su primera división celular. Se trata de un método sencillo, relativamente rápido, de bajo costo que permite detectar efectos genotóxicos o citotóxicos incluso tiempo después de la exposición al agente. Empero, puede presentar factores de confusión y limitaciones que deben considerarse cuidadosamente, en función del

conocimiento detallado del modelo celular utilizado.

Otra técnica emblemática es la prueba de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis en linfocitos de sangre periférica humana (Fenech & Morley, 1985), así como la prueba de micronúcleos en células epiteliales exfoliadas, como las de la mucosa oral (Bolognesi et al., 2013; Tolbert et al., 1991; 1992). Cada una de estas metodologías, basadas en la formación de micronúcleos y otras anomalías nucleares, posee particularidades propias, puntos críticos, sensibilidad, ventajas, limitaciones y un campo de aplicabilidad específico (Heddle et al., 1991).

No obstante, el desarrollo de modelos y técnicas para la evaluación de la genotoxicidad y la citotoxicidad ha sido constante. Existen enfoques bioquímicos y espectrofotométricos que, si bien aportan información valiosa, dependen del uso de equipos sofisticados y reactivos de alto costo. En contraste, las técnicas aquí descritas —centradas en la observación microscópica— no requieren instrumental costoso y son relativamente accesibles para cualquier laboratorio que cuente con un microscopio óptico y sistemas básicos de tinción celular. El requisito más importante es, principalmente, la comprensión profunda de los mecanismos celulares involucrados en cada modelo experimental.

Aquí se presentan únicamente algunas de las técnicas utilizadas en genética toxicológica, de entre la amplia gama que existe en la actualidad. Se seleccionaron aquellas que destacan por ser de bajo costo y alta versatilidad, particularmente en su aplicabilidad para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad en diversos contextos experimentales. En primer lugar, se expone la prueba de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis, seguida de la técnica aplicada en epitelio oral, el ensayo en eritrocitos de sangre periférica en el que se utiliza en diversos vertebrados *in vivo* y, por último, la prueba de micronúcleos en células meristemáticas de origen vegetal.

De tal suerte que este libro se compone de cinco capítulos; el primero aborda las generalidades sobre los micronúcleos, comenzando con una visión histórica que remonta su descubrimiento a las observaciones microscópicas de anomalías celulares en la década de 1950 y su posterior asociación con la genotoxicidad y la carcinogénesis. Tras esta contextualización, se explica qué son estas estructuras denominadas micro-

núcleos, cómo se forman y qué representan como indicadores de daño genético y alteraciones en el ciclo celular. Esto sugiere su posible papel en la vigilancia del genoma y la prevención de enfermedades asociadas con la inestabilidad genómica.

La detección de micronúcleos se ha aplicado en diversos contextos, incluidos estudios de genotoxicidad, monitoreo ambiental y evaluación del riesgo carcinogénico. De manera similar, se utiliza en la investigación biomédica para profundizar en la comprensión de los mecanismos subyacentes de distintas enfermedades.

El segundo capítulo se centra en la detección de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea y sangre periférica, como una técnica fundamental en toxicología y genotoxicología. Estas pruebas permiten evaluar el daño al material genético y los potenciales riesgos para la salud, ya que los micronúcleos actúan como biomarcadores sensibles capaces de detectar alteraciones genéticas y daño celular, al reflejar el estado de salud o enfermedad de un organismo.

En este capítulo, el lector encontrará la descripción detallada del procedimiento metodológico para realizar la prueba de micronúcleos en médula ósea, que abarca desde la selección y alojamiento de los animales de ensayo hasta la extracción del tejido y la interpretación de los datos. Además de la médula ósea, los micronúcleos también pueden detectarse en eritrocitos circulantes de sangre periférica, lo que brinda una alternativa valiosa para evaluar genotoxicidad crónica y acumulativa sin necesidad de sacrificar al organismo de estudio. Se exploran las bases biológicas de la presencia de eritrocitos micronucleados en sangre periférica, destacando la relación entre el daño genético y la citotoxicidad con la formación de micronúcleos. Se discute, además, la paradoja de la citotoxicidad en médula ósea: cuando un agente citotóxico inhibe la división celular, puede impedir la visualización de micronúcleos, lo cual requiere de la evaluación cuidadosa para evitar interpretaciones erróneas.

Se examina la presencia de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de amplia variedad de especies de vertebrados, en las que se incluyen mamíferos, aves, reptiles y anfibios; se analizan sus implicaciones en la evaluación del riesgo genotóxico. En este contexto, el bazo



— junto con la edad de los organismos — desempeña un papel clave en la eliminación de eritrocitos micronucleados, por lo que ambos factores deben considerarse al interpretar los resultados de la prueba.

Se recomienda conocer en profundidad el funcionamiento fisiológico del organismo bioindicador seleccionado, ya que algunas especies son excelentes modelos en etapas tempranas de vida, mientras que en otras ocurre lo contrario (Zúñiga-González et al., 2001; Ramos-Ibarra et al., 2020). Incluso, existen especies que no resultan adecuadas para la aplicación de esta prueba en sangre periférica, como el cuy (*Cavia porcellus*), un mamífero roedor que, debido a las características de su sistema reticuloendotelial, no presenta micronúcleos espontáneos ni siquiera al nacer, salvo que haya sido esplenectomizado (Ramírez-Muñoz et al., 1999; Zúñiga-González et al., 1996a).

Se describe el procedimiento metodológico para llevar a cabo la prueba de micronúcleos en sangre periférica, abarcando desde la toma de muestras y el procesamiento de frotis; hasta el conteo celular y la interpretación de resultados. Además, se discuten las ventajas, desventajas y consideraciones asociadas con la aplicación de esta técnica tanto en médula ósea como en sangre periférica, así como aspectos de la sensibilidad, especificidad y aplicabilidad en distintos contextos experimentales y clínicos.

Aunque la prueba de micronúcleos es ampliamente utilizada y reconocida por su utilidad en la evaluación del daño genético y la salud celular, presenta ciertas limitaciones. Entre ellas, destaca la necesidad de experiencia técnica para su correcta lectura e interpretación, así como variaciones en su sensibilidad y especificidad según el modelo biológico y el tipo de exposición analizada. No obstante, es una herramienta valiosa en toxicología genética por su capacidad de detectar alteraciones nucleares de forma accesible y relativamente económica.

El tercer capítulo aborda la evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad mediante el cultivo de linfocitos con bloqueo de la citocinesis, con el propósito de monitorear los efectos adversos de diversas sustancias sobre el material genético y la viabilidad celular. Se destaca la relevancia de estas evaluaciones en toxicología y farmacología por su implicación en la salud humana, animal y ambiental.

Esta metodología permite identificar distintos biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad, proporcionando una visión integral de los efectos de compuestos tóxicos sobre la viabilidad celular, los mecanismos de muerte celular y la citostasis. En particular, los biomarcadores genotóxicos revelan alteraciones en el ADN de los linfocitos, tales como la formación de micronúcleos y otras aberraciones nucleares, producto de la exposición a agentes dañinos.

Se describen los procedimientos generales para llevar a cabo este ensayo, desde la siembra del cultivo y el bloqueo de la citocinesis, hasta la cosecha de células, preparación de laminillas, tinción y observación microscópica. El ensayo de micronúcleos en células binucleadas (CBMN) se presenta como una de las técnicas más utilizadas y validadas para la detección de genotoxicidad en linfocitos humanos y animales. Se analizan sus aplicaciones, ventajas, limitaciones y consideraciones prácticas para su implementación efectiva.

Se recapitulan hallazgos relevantes en distintos contextos experimentales y de biomonitoreo, subrayando la importancia de evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad en linfocitos como herramienta para el análisis de riesgos y la protección de la salud. Esta técnica también ha sido empleada en especies de interés económico y ecológico, como ganado bovino, porcino y caprino, así como en animales de compañía como perros, gatos y aves.

El cuarto capítulo se centra en la detección de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en células epiteliales exfoliadas de la mucosa oral humana, como una metodología fundamental para la evaluación y prevención del riesgo de carcinogénesis oral y la detección temprana de posibles anomalías.

Se presenta un cuadro resumen que sintetiza las aplicaciones y frecuencias de células micronucleadas y otras anormalidades nucleares en mucosa oral, que ofrece una visión general de su utilidad clínica. Al mismo tiempo, se discuten las características del epitelio oral y los criterios citológicos para identificar adecuadamente células micronucleadas y otras alteraciones nucleares en muestras citológicas.

Además, se analiza el papel de los micronúcleos como factor predictivo en procesos de carcinogénesis oral, resaltando la importancia

de su detección temprana para mejorar el pronóstico y la efectividad de los tratamientos. El capítulo también aborda consideraciones éticas, subrayando la necesidad de proteger los derechos y la privacidad de los pacientes durante la recolección y análisis de muestras de mucosa oral.

Se describe con claridad el procedimiento para la toma y procesamiento de muestras, que incluye la asignación de folios, delimitación del área de trabajo, recolección, preservación de datos de interés, y la obtención de muestras de mucosa oral. Esto abarca la recolección en citología de base líquida, su preparación, fijación y posterior análisis. Se detallan los pasos para la tinción y el conteo celular, así como los factores que pueden influir en la frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades, como la exposición a carcinógenos y factores genéticos relevantes para la promoción de la salud oral.

Sin lugar a dudas, la detección de micronúcleos y anormalidades nucleares en células epiteliales exfoliadas de la mucosa oral, representa una herramienta valiosa para la identificación temprana del riesgo de cáncer oral y el fortalecimiento de estrategias de prevención y salud pública.

El quinto y último capítulo de este libro describe el uso del ensayo *Allium cepa* en la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad, destacando como un enfoque valioso la investigación toxicológica y genotoxicológica. Se subraya la importancia de este modelo vegetal en la identificación de riesgos potenciales para la salud humana, animal, vegetal y ambiental, así como su relevancia en la evaluación de la seguridad de diversos compuestos.

El modelo *Allium cepa* presenta características biológicas que lo hacen especialmente adecuado para estos fines, como su fácil manipulación, bajo costo, elevada tasa mitótica y sensibilidad a agentes citogenotóxicos. Estas propiedades contribuyen significativamente a la sensibilidad y especificidad del ensayo.

El fundamento del ensayo radica en la capacidad de las células del meristemo radicular de la cebolla para reflejar efectos genotóxicos y citotóxicos mediante alteraciones observables en el ciclo celular y en la morfología celular. Se detalla la metodología para llevar a cabo este ensayo, incluyendo la preparación de las muestras, el tratamiento con la

sustancia de interés y la observación de los efectos en las células de la raíz. Se presenta la descripción de los principales biomarcadores utilizados, enfatizando su utilidad para detectar y cuantificar efectos adversos en células vegetales.

Entre los biomarcadores más relevantes se encuentra: el índice mitótico (IM), que proporciona una medida cuantitativa de la actividad mitótica celular. También se analizan otras anormalidades nucleares durante distintas fases del ciclo celular, como la presencia de micronúcleos, puentes anafásicos y brotes nucleares (NBuds), que permiten una evaluación precisa de los efectos de las sustancias en estudio.

En resumen, el ensayo *Allium cepa* es una herramienta invaluable para la evaluación de la genotoxicidad y la citotoxicidad, aportando información crucial para la estimación del riesgo y la protección de la salud humana, animal, vegetal y ambiental.

Este libro es el resultado de la colaboración de más de 20 años entre las autoras, quienes han trabajado conjuntamente en la implementación y validación de las metodologías aquí presentadas en sus respectivos laboratorios. Este esfuerzo ha inspirado la realización de aproximadamente treinta tesis de licenciatura y más de cuarenta en niveles de especialidad, maestría y doctorado, además de múltiples publicaciones científicas en coautoría.

La elaboración del libro se realizó en el marco del proyecto de investigación “Genotoxicidad y citotoxicidad de nanomateriales”, apoyado por la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California bajo la clave 400/2849, con vigencia de 2021-2 a 2023-1. Además del apoyo del Programa Estancias Posdoctorales por México 2023, Modalidad Académica, con apoyo del posdoctorante con número de registro 19104. Se espera que esta obra contribuya significativamente a la formación de nuevas generaciones de profesores-investigadores y especialistas en genotoxicología, con un enfoque integrador hacia la salud pública humana, animal, vegetal y ambiental.



CAPITULO I

MICRONÚCLEOS: FUNDAMENTO, RELEVANCIA BIOLÓGICA E IMPLICACIONES EN LA SALUD

La fragilidad del genoma y su expresión en micronúcleos

El ADN, como principal portador de la información genética, se encuentra confinado en el núcleo celular, en las mitocondrias y, en los cloroplastos de los organismos vegetales. Su transmisión y la conservación precisa de cada segmento a lo largo de la vida celular, así como de generación en generación desde las células progenitoras hasta las células hijas, son fundamentales para el desarrollo embrionario y fetal. Esto garantiza la formación adecuada de tejidos y órganos, así como el correcto funcionamiento a nivel molecular y celular. Además, es esencial en procesos clave como la replicación, la transcripción y la traducción, y resulta indispensable para la continuidad de las especies.

Un genoma íntegro no solo permite respuestas más eficaces frente a factores ambientales, sino que también favorece la adaptación a cambios en el entorno. Para preservar esta integridad, las células disponen de sistemas complejos y altamente eficientes capaces de detectar, reparar o eliminar errores en el ADN. Sin embargo, estos mecanismos no son completamente infalibles. En ocasiones pueden fallar y permitir la supervivencia de células dañadas, o bien resultar insuficientes frente a agentes que inducen daño genómico a velocidad mayor que la capacidad de reparación celular. Esta situación puede conducir, eventualmente, al desarrollo de neoplasias u otras patologías.



En este contexto, un genotóxico se define como un agente capaz de interactuar con el ADN, ya sea de forma directa, afectando las bases nitrogenadas o las hebras del ADN, o de manera indirecta, mediante alteraciones en las histonas o en los complejos enzimáticos responsables de su expresión o replicación. Estas interacciones pueden inducir modificaciones estructurales o funcionales tanto en células germinales (óvulos y espermatozoides) como en células somáticas. Las alteraciones en el genoma de las células germinales pueden heredarse y dar lugar a enfermedades genéticas de tipo monogénico, cromosómico o multifactorial. Por otro lado, el daño en el ADN de células somáticas se asocia con el envejecimiento prematuro, enfermedades crónicas degenerativas, como el cáncer y diversos trastornos autoinmunes.

Por ello, uno de los grandes retos de la toxicología genética es la identificación de biomarcadores capaces de detectar células malignizadas en etapas tempranas, antes de la aparición de síntomas o del desarrollo irreversible de la enfermedad.

Perspectiva histórica de la investigación en micronúcleos

En las últimas décadas, la integridad del material genético de los organismos ha estado cada vez más expuesta a riesgos derivados tanto de actividades antropogénicas como de procesos naturales. La presencia creciente de agentes capaces de inducir daño genético hace evidente la necesidad de contar con métodos eficaces, rápidos, relativamente sencillos y no costosos, que permitan evaluar distintos tipos de organismos, independientemente de su hábitat; así como estudiar poblaciones humanas potencialmente expuestas a agentes tóxicos.

Entre estos métodos destaca la prueba de micronúcleos, aplicable a cualquier linaje celular con alta tasa de división. Esta técnica fue propuesta por Heddle en 1973 y, desde entonces, su uso va en aumento en diversos modelos biológicos, tejidos y tipos de ensayo, gracias a sus ventajas clave: precisión, rapidez y simplicidad metodológica (Fig. 1).

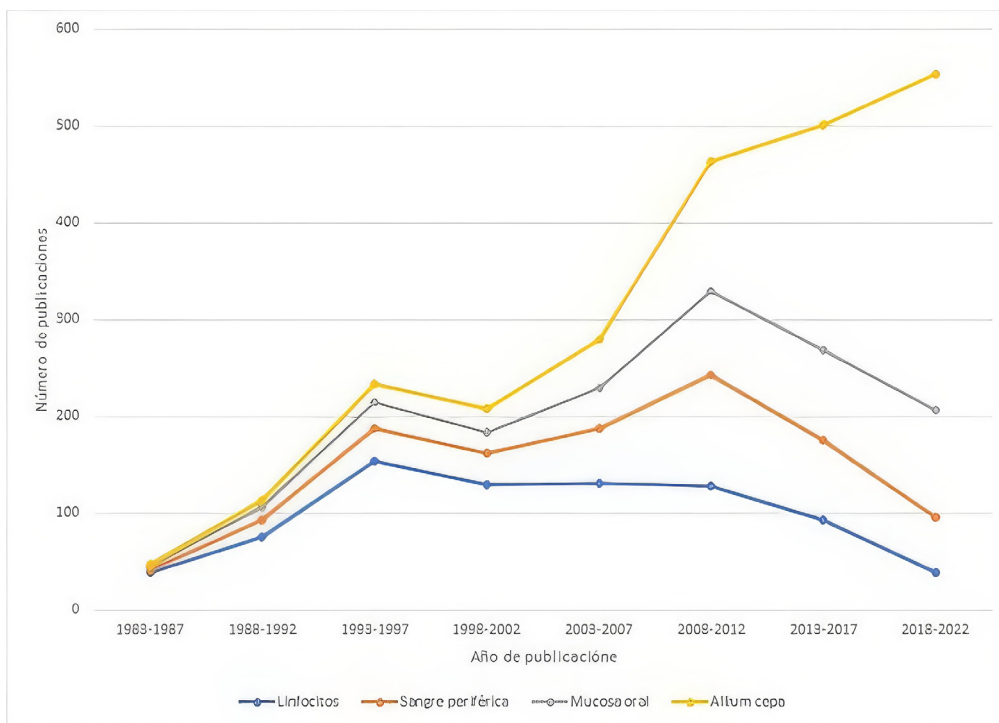


Figura 1. Tendencia del número de publicaciones científicas que emplean el ensayo de micronúcleos en los modelos más utilizados: linfocitos humanos, sangre periférica, mucosa oral y *Allium cepa*. Los datos comprenden el período 1983–2022, agrupados por lustros. La búsqueda bibliográfica se realizó con las palabras clave “Micronuclei” y “Model”. La disminución en el uso de modelos animales podría estar asociada a restricciones éticas, complejidad metodológica y altos costos. Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García.

En la actualidad, la evaluación de la frecuencia de micronúcleos en modelos *in vivo* forma parte esencial del conjunto estandarizado de ensayos para determinar genotoxicidad, y es recomendada por agencias regulatorias a nivel internacional como herramienta fundamental en la evaluación de la seguridad de compuestos y productos farmacéuticos (Heddle, 1973; Krishna, 2000).

El hallazgo de los micronúcleos se remonta alrededor del año 1890, cuando los hematólogos William Howell y Justin Jolly los identificaron por primera vez en eritrocitos de sangre periférica (Howell, 1890; Jolly,

1907; Ye et al., 2019). En honor a estos investigadores, estas estructuras fueron denominadas cuerpos de “Howell-Jolly”. Sin embargo, Howell interpretó erróneamente su origen, los consideró fragmentos de cromatina que quedaban al margen tras la extrusión nuclear, y no como restos de un núcleo reabsorbido, como algunos contemporáneos habían sugerido (Sears y Udden, 2012).

A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento, los micronúcleos continúan despertando interés en el campo de la mutagénesis y la toxicología genética. Fue hasta 1937 que Brenneke los asoció con los efectos de la radiación en roedores, y más adelante Evans y colaboradores (1959) lo confirmaron en meristemos de *Vicia faba*, estableciendo así la correlación entre su aparición y el daño genético (Brenneke, 1937; Evans et al., 1959).

Posteriormente, Dawson y Bury describieron la presencia de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea en condiciones patológicas y en la deficiencia de folatos y vitamina B12 (Dawson y Bury, 1961). No obstante, la verdadera relevancia de estas estructuras se reconoció a finales de los años sesenta y principios de los setenta, cuando Schmid y Heddle desarrollaron un ensayo *in vivo* en eritrocitos policromáticos (EPC) de médula ósea. Este método demostró ser una alternativa más rápida y sensible que el conteo de metafases o el intercambio de cromátides hermanas, y permitió establecer criterios formales para identificar un cuerpo intracelular como micronúcleo (Heddle et al., 1973; Schmid, 1973, 1975).

Durante la década de los ochenta, MacGregor y colaboradores, demostraron que la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica a las 24 horas era comparable con la observada en médula ósea, lo que validó su uso como método de cribado genético. Esta alternativa es menos invasiva, permite el muestreo múltiple de los mismos animales, facilita el análisis automatizado y amplía su aplicabilidad en biomonitorio humano (MacGregor et al., 1980).

Complementariamente, Wyrobek y Bruce (1975) propusieron que los efectos de los mutágenos ambientales también podían evaluarse a través de anomalías en la morfología de espermatozoides, ampliando el espectro de biomarcadores de daño genético (Wyrobek y Bruce, 1975).

En 1976, Countryman y Heddle adaptaron la prueba de micronúcleos para evaluar daño cromosómico en linfocitos de sangre periférica (Countryman y Heddle, 1976; Bonassi et al., 2001). Años más tarde, en 1985, Fenech y Morley perfeccionaron esta metodología mediante la incorporación de citocalasina B, una sustancia que bloquea la citocinesis. Esta innovación dio origen al ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN), el cual permitió identificar micronúcleos exclusivamente en células que habían completado la división nuclear, aumentando así la precisión del análisis (Fenech y Morley, 1985; Ye et al., 2019).

El método CBMN también redujo significativamente los requerimientos de muestra y reactivos, y estableció criterios morfológicos rigurosos para la inclusión de micronúcleos, con el objetivo de minimizar falsos positivos. Además de cuantificar micronúcleos, este ensayo permite detectar otras alteraciones nucleares como yemas nucleares — biomarcadores de amplificación génica — y puentes nucleoplásmicos, indicadores de cromosomas dicéntricos (Jiang et al., 2019).

Fenech y Morley demostraron que la formación de micronúcleos en linfocitos humanos cultivados *in vitro* es dosis-dependiente frente a la radiación, estableciendo la relación lineal entre la dosis administrada y la frecuencia de micronúcleos. Por otra parte, confirmaron que este método es confiable para detectar daño cromosómico inducido por agentes citotóxicos *in vivo*, lo que consolidó su valor como técnica estándar en genotoxicología y biodosimetría (Fenech y Morley, 1985).

A medida que el ensayo va ganando popularidad; han surgido desafíos relacionados con la estandarización de protocolos de cultivo, criterios de análisis y descripción de frecuencias. Las diferencias entre laboratorios dificultan las comparaciones a gran escala y la obtención de conclusiones sólidas en estudios multicéntricos.

Entre las organizaciones internacionales que reconocen al ensayo de micronúcleos como un método fiable de biodosimetría son el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), la Red Europea de Dosimetría Biológica y Física Retrospectiva (RENEB), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y la Organización Internacional de Normalización (ISO), las que establecieron directrices para su aplicación en genotoxicología y dosimetría biológica.

En 1997, surgió la iniciativa internacional Human MicroNucleus (HUMN), cuyo propósito fue estandarizar el uso del ensayo CBMN en linfocitos y células de mucosa oral. Actualmente, HUMN constituye la base de datos más grande del mundo sobre frecuencia de células micronucleadas en estudios poblacionales (Fenech et al., 2003).

¿Qué son los micronúcleos?

Los micronúcleos, también conocidos como cuerpos de Howell-Jolly, son pequeños fragmentos de ADN nuclear formados por segmentos de cromosomas sin centrómero o por cromosomas completos que no lograron incorporarse a los núcleos hijos durante la mitosis. Estos fragmentos pueden quedar envueltos por una membrana nuclear independiente, sin conexión con el núcleo principal, frágil e inestable, lo que conduce a rupturas irreparables que pueden tener consecuencias biológicas significativas.

La presencia de micronúcleos es un biomarcador sensible de efectos genotóxicos y mutagénicos, catástrofes mitóticas, inestabilidad cromosómica (ya sea heredada o inducida), y caos genético, entendido como un proceso de reorganización compleja y rápida del genoma que puede dar lugar a configuraciones caóticas, algunas de las cuales se estabilizan y perpetúan. Además, estudios recientes vinculan la formación de micronúcleos con la activación de rutas inmunitarias como respuesta al daño genómico (Mackenzie et al., 2017; Ye et al., 2019; Krupina et al., 2021).

Bajo el microscopio óptico, los micronúcleos se visualizan como cuerpos redondeados de menor tamaño —usualmente inferiores a 1/5 del núcleo principal—, pero con características similares en cuanto a textura, plano focal y afinidad tintorial (Fig. 2) (Ye et al., 2019; Krupina et al., 2021).

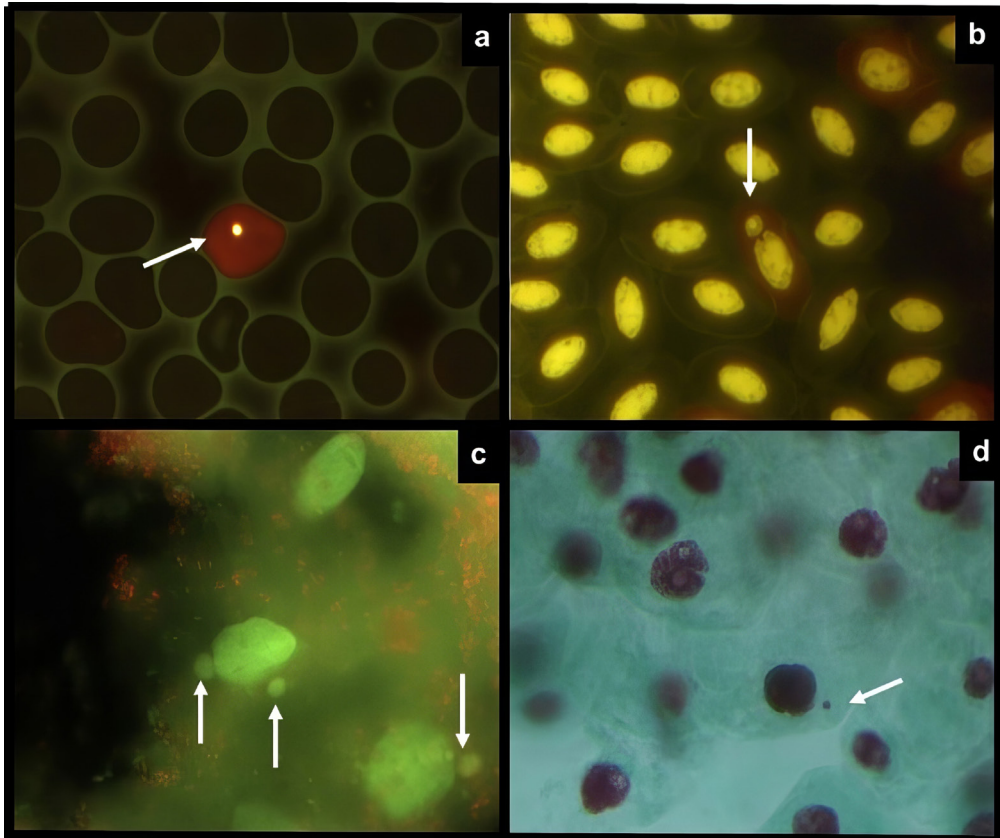


Figura 2. Células con micronúcleos: a) eritrocito policromático micronucleado de ratón, b) eritrocito policromático micronucleado de ave, c) célula epitelial exfoliada de mucosa oral y d) células meristemáticas de *Allium cepa*. Las flechas indican la presencia de micronúcleos. Se utilizó tinción con naranja de acridina para las imágenes a, b y c, y tinción con orceína y verde rápido para la imagen d; observadas a 100× con un microscopio Carl Zeiss IVFL Axiostar Plus, filtro de fluorescencia de 450–490 nm. Cortesía de la Dra. en C. Olivia Torres Bugarín.

Mecanismos de formación

Los micronúcleos se originan durante la división celular como resultado de múltiples mecanismos moleculares, entre los que destacan la pérdida mitótica de fragmentos acéntricos y errores en la segregación cromosómica. Las roturas del ADN de doble cadena, de cromátides,

cromosomas o isocromátides, así como la formación de puentes nucleoplásmicos y los intercambios cromosómicos asimétricos o incompletos, generan fragmentos acéntricos que pueden ser excluidos del núcleo principal durante la mitosis. Estos fragmentos, al no ser incorporados en los núcleos hijos, permanecen libres en el citoplasma y se observan como micronúcleos durante la siguiente interfase (Krupina et al., 2021; Ye et al., 2019; Fenech et al., 2011).

Otro mecanismo importante es la pérdida mitótica de cromosomas completos, habitualmente causada por alteraciones en el huso mitótico. Estos defectos pueden originarse por inhibición de la polimerización o ensamblaje de los microtúbulos, por mutaciones en proteínas como la tubulina, o bien por alteraciones estructurales o funcionales en el centrómero o el cinetocoro. Además, la hipometilación centromérica, fallas en el control del ciclo celular y respuesta deficiente a la reparación del ADN también pueden contribuir a este fenómeno.

Existen, además, mecanismos adicionales como la replicación tardía o defectuosa del ADN, la apoptosis, modificaciones epigenéticas de las histonas, amplificación génica y efectos derivados del tratamiento con agentes químicos que inducen aductos de ADN o reticulación entre cadenas (Heddle et al., 1983, 1991).

Por otra parte, en células cancerosas está descrita la presencia de dobles minutos —fragmentos extracromosómicos de ADN que contienen genes amplificados—, los cuales se asocian con la formación de brotes nucleares y micronúcleos durante la interfase, y se relacionan con procesos de tumorigenicidad (Shimizu et al., 2011). Finalmente, los micronúcleos pueden generarse de manera espontánea como parte de la eliminación de ADN sobrante, durante el desarrollo normal a partir de células progenitoras, o bien como resultado de la exposición a agentes clastogénicos y aneugénicos, tanto endógenos como exógenos.

Relevancia en la función celular e implicaciones biológicas

A pesar de ser estructuras comparativamente pequeñas —por lo general menores a un tercio del tamaño del núcleo principal—, los micronúcleos ejercen un impacto biológico de gran magnitud en las células y los tejidos. Desde que Schmid implementó la frecuencia de micro-

núcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) de médula ósea como una prueba (1973), estos se han convertido en un biomarcador confiable de daño citogenético y, quizá hasta la fecha, son de los más utilizados, tanto por el bajo costo de la técnica como por su relativa sencillez para obtener, procesar y evaluar los tejidos.

En el inicio, los micronúcleos se consideraban estructuras inactivas, reflejo pasivo de fracturas de doble hebra del ADN o en su defecto del daño al huso mitótico. Sin embargo, hoy se sabe que nada está más alejado de esa idea. Los micronúcleos son estructuras dinámicas, en continuo cambio, que desempeñan un papel sumamente complejo en procesos biológicos clave como la senescencia, muerte celular, la carcinogénesis, la degeneración tisular y la activación inmunitaria. Además, su presencia se relaciona con la aparición, progresión y agravamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas.

No obstante, aún no es sencillo determinar si los micronúcleos tienen función biológica específica, si son causa o consecuencia del daño celular, ni cuáles son los mecanismos exactos de su formación, eliminación y repercusiones fisiológicas. Estos procesos permanecen en gran medida desconocidos, lo que continúa suscitando interés científico constante y creciente por comprender más sobre ellos (Zhao et al., 2021; Ye et al., 2019; Torres-Bugarín y Arias-Ruíz, 2023).

Algunos elementos que contribuyen a la complejidad de este fenómeno se centran en cuatro aspectos: en primer lugar, el reordenamiento masivo del ADN contenido en el micronúcleo y su destino; en segundo lugar, la fragilidad de la membrana que lo rodea y su inevitable ruptura, lo que conduce a la liberación del ADN micronuclear al citoplasma; en tercer lugar, la posibilidad de que este material sea reincorporado al núcleo principal durante la siguiente división celular, con reorganizaciones genómicas amplias y potencialmente disruptivas.

En cuanto a su posible función biológica, se ha propuesto que los micronúcleos son un mecanismo de eliminación de material genético amplificado aberrante, como ocurre con las múltiples copias del gen MYCN en células de neuroblastoma, condición asociada a mal pronóstico clínico. También se cree que los micronúcleos podrían desempeñar un papel central en la evolución somática de las poblaciones celulares

cancerosas, y que su presencia constituye la base de enfermedades comunes y complejas (Ye et al., 2021).

Desde el punto de vista estructural, y por definición, un micronúcleo carece de conexión con el núcleo principal. Esta característica conlleva profundas implicaciones biológicas, entre las cuales destaca la desincronización del ciclo celular y de los mecanismos de reparación del ADN con respecto al núcleo original. En consecuencia, los micronúcleos están sometidos a diferentes puntos de control del ciclo celular, donde pueden producirse errores significativos en cada etapa.

Algunos micronúcleos pueden contener proteosomas — complejos proteicos responsables de degradar proteínas dañadas mediante el sistema ubiquitina-proteasoma —, sin embargo, si los poseen estos proteosomas carecen de los componentes necesarios para la ubiquitinación, lo cual limita severamente su capacidad para mantener la homeostasis proteica intracelular. Además, su membrana es notablemente inestable y deficiente en estructura y componentes funcionales. A diferencia de la envoltura nuclear principal, la membrana del micronúcleo no regula adecuadamente el transporte bidireccional de sustancias y carece del soporte estructural del retículo endoplásmico rugoso (Torres-Bugarín y Arias-Ruíz, 2023; Krupina et al., 2021).

Las características físicas de los micronúcleos varían ampliamente: su tamaño depende de la cantidad de ADN contenido, la presencia o ausencia del centrómero, y el grado de condensación de la cromatina. Cuanto más condensado esté el ADN, menor será la probabilidad de que se exprese (Krupina et al., 2021). Si el micronúcleo posee lámina nuclear —estructura clave en la regulación de la replicación, división, organización y expresión del ADN—, puede mantenerse funcional. No obstante, si esta lámina es imperfecta o está ausente, la membrana micronuclear se rompe fácilmente y libera el ADN al citoplasma. Esto ocurre porque los mecanismos de reparación son deficientes o inexistentes, lo que conlleva errores adicionales en vez de corregir los existentes (Shimizu et al., 2011; Krupina et al., 2021).

La ruptura de la membrana del micronúcleo se considera un punto de inflexión en la determinación del destino celular. Su disrupción puede interrumpir o retrasar procesos clave como la replicación y re-

paración del ADN nuclear, y está directamente implicada en múltiples consecuencias catastróficas para la célula que lo alberga (Gauthier et al., 2021; Maciejowski et al., 2020).

El desenlace biológico de un micronúcleo depende de lo que ocurre con él tras su formación. En la siguiente mitosis, puede ser retenido, eliminado, incorporado a exosomas o reincorporado al genoma del núcleo principal. Si la célula micronucleada no sobrevive o no completa la división celular, su efecto es limitado. Sin embargo, si sobrevive, pueden ocurrir diferentes escenarios con consecuencias adversas (Zhao et al., 2021; Shimizu et al., 2011; Hintzsche et al., 2017; Kirsch-Volders et al., 2020; Terradas et al., 2016).

Por ejemplo, el micronúcleo puede permanecer en el citoplasma, deteniendo el ciclo celular o induciendo muerte prematura. También puede ser expulsado, como ocurre con los núcleos eritrocitarios en mamíferos, o sufrir apoptosis. Si la membrana micronuclear se rompe, el ADN se libera al citoplasma, donde puede ser degradado por la vía lisosomal. Alternativamente, si persiste en el citoplasma, puede activar vías de señalización aberrantes, desencadenando procesos de inflamación crónica, senescencia o muerte celular.

Las células senescentes no solo detienen su proliferación, sino que también inducen senescencia en las células vecinas, promoviendo así un microambiente proinflamatorio mediante el reclutamiento de células inmunitarias. Una alternativa no menos relevante es la reincorporación del ADN micronuclear al genoma del núcleo principal. En este escenario, el material genético reincorporado podría estar inactivado, sin provocar consecuencias funcionales, lo que permitiría que la célula continúe su ciclo normal o permanezca en interfase hasta morir de forma prematura.

Sin embargo, también es posible que este ADN actúe como regulador de la muerte celular prematura y desencadene procesos como la apoptosis, la autofagia o la senescencia. Otra posibilidad es que el ADN micronuclear reincorporado sufra reordenamientos genómicos masivos mediante mecanismos como la cromolexia (translocaciones simultáneas en varios cromosomas), la cromotripsis (ruptura y reensamblaje caótico de fragmentos cromosómicos), o la cromoanagénesis (generación

de configuraciones genómicas completamente nuevas), fenómenos comúnmente observados en los cánceres más agresivos (Krupina et al., 2021).

En consecuencia, la reincorporación del ADN micronuclear puede inducir inestabilidad e incluso caos genético, procesos estrechamente asociados con el desarrollo de cáncer, enfermedades autoinmunes y trastornos crónico-degenerativos complejos (Shimizu et al., 2011; Kirsch-Volders et al., 2020; Torres-Bugarín et al., 2013; Bonassi y Fenech, 2021). Estos hallazgos contrastan marcadamente con la visión clásica de la oncología, que postulaba que las mutaciones necesarias para la transformación maligna se acumulaban de manera gradual. Hoy se reconoce que existen mecanismos “explosivos” capaces de desestabilizar el genoma en una sola etapa, modificando profundamente la comprensión de los orígenes del cáncer.

Micronúcleos y respuesta inmune

La localización natural del ADN en las células eucariotas se restringe al núcleo, las mitocondrias y, en el caso de organismos fotosintéticos, a los cloroplastos. Sin embargo, en condiciones extraordinarias, pueden encontrarse fragmentos de ADN o de doble cadena en el citoplasma. Esto puede ocurrir, por ejemplo, como resultado de una infección por patógenos (virus, bacterias u otros parásitos), o por la disrupción irreversible de la membrana micronuclear o mitocondrial.

Cuando se detecta ADN en el citoplasma, el sistema inmunitario activa mecanismos para eliminarlo y evitar la respuesta autoinmune. Una de las principales vías de defensa incluye la acción de exonucleasas citoplasmáticas, encargadas de degradar el ADN extraño o mal localizado antes de que se active la vía cGAS-STING, responsable de iniciar una potente respuesta inflamatoria. No obstante, si la cantidad de ADN citosólico excede la capacidad de las nucleasas para eliminarlo, se supera el umbral y se activa la vía cGAS-STING (Shen et al., 2024).

La activación de esta vía conduce a la producción de citocinas proinflamatorias, entre ellas los interferones tipo I (IFN-I) y las interleucinas 6 y 8. El estado proinflamatorio inducido por la liberación del ADN micronuclear al citoplasma incrementa el estrés oxidativo sobre el genoma

celular, lo que a su vez favorece la formación de nuevos micronúcleos. Se genera así un círculo vicioso: inflamación persistente, formación de micronúcleos, reordenamiento genómico e intensificación de la respuesta inmunitaria aberrante (Krishna et al., 1992; Shen et al., 2024).

Este reconocimiento inapropiado del ADN propio por parte del sistema inmunológico desencadena inflamación crónica, senescencia celular —la cual promueve aún más la infiltración de células inflamatorias—, inestabilidad genómica y caos genético. Tales alteraciones están relacionadas con diversas condiciones patológicas, entre ellas enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias, envejecimiento acelerado y diversos tipos de cáncer (Torres-Bugarín et al., 2015).

Además, con la edad, este proceso se intensifica, lo cual sugiere contribución importante al desarrollo de enfermedades autoinmunes asociadas al envejecimiento. Esto se debe, en parte, a la pérdida progresiva de la capacidad del sistema inmunitario para distinguir entre el ADN propio liberado y los antígenos foráneos (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013a; Gauthier y Comaills, 2021; Maciejowski et al., 2020; Terradas et al., 2016; Zhou et al., 2020; Mohr et al., 2021; Krupina et al., 2021).

Cabe destacar que la vía cGAS-STING desempeña un papel crucial en diversas patologías inflamatorias, incluidas enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, enfermedades inflamatorias intestinales, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 1, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y psoriasis (Chen et al., 2016).

Usos y aplicaciones

Los micronúcleos son estructuras poco frecuentes en células sanas, pero su presencia aumenta significativamente en contextos de senescencia, estrés genotóxico y enfermedades benignas o malignas (Krupina et al., 2021). Por ello, están consolidados como biomarcadores confiables no solo de efecto, sino también de exposición y susceptibilidad al daño genético.

Este biomarcador destaca por su eficacia, simplicidad, rapidez y bajo costo, lo que permite su aplicación tanto en laboratorio como en campo, con resultados consistentes incluso en condiciones operativas limitadas (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013; Torres-Bugarín et al., 2014). El



ensayo de micronúcleos se emplea ampliamente en estudios *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* para detectar el efecto de xenobióticos, metabolitos con potencial genotóxico, mutagénico o teratogénico, así como alteraciones derivadas de desequilibrios nutricionales o estilos de vida que afectan la estabilidad del ADN.

Actualmente, existen múltiples aplicaciones del ensayo en diversos tejidos, organismos y modelos biológicos (Torres-Bugarín y Arias-Ruíz, 2023; Ramos-Ibarra et al., 2020). La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) estableció lineamientos específicos para su uso en estudios de genotoxicidad (OECD, 2016a; 2016b). Este ensayo es utilizado exitosamente para evaluar daño cromosómico en plantas como *Allium cepa* (Casillas-Figueroa et al., 2020; Youssef et al., 2020), invertebrados como moluscos y crustáceos (El-Samad et al., 2021; Vernon y Jha, 2019), vertebrados no humanos como peces, anfibios, reptiles y mamíferos (Zúñiga et al., 1996b, 1998; Zúñiga-González et al., 2000, 2001; Arellano-García et al., 2020; Flores-Galván et al., 2020; Zamora-Pérez et al., 2021), así como en seres humanos, particularmente en trabajadores expuestos en contextos ocupacionales (Bonassi et al., 2001; Castañeda-Yslas et al., 2016; Jara-Ettinger et al., 2015; Ruíz-Ruiz et al., 2023), personas expuestas a contaminantes ambientales (Arnaoutoglou et al., 2022), con estilos de vida específicos (Torres-Bugarín et al., 2007), enfermedades crónicas (Torres-Bugarín et al., 2014; Flores-García et al., 2014) e incluso en el seguimiento de tratamientos terapéuticos (Carrillo-Novia et al., 2023).

En tejidos como la mucosa oral y los linfocitos, la frecuencia de micronúcleos es un biomarcador clínico eficiente para predecir el riesgo, evolución y pronóstico de diversas enfermedades. Esta frecuencia es sensible tanto a factores endógenos, como inflamación, estrés oxidativo, progresión tumoral o envejecimiento, como a factores exógenos, entre ellos radiación, fármacos, contaminantes ambientales o dieta. Por esto, el ensayo de micronúcleos es una herramienta valiosa para identificar riesgos genéticos en personas sanas pero vulnerables, así como para evaluar el estado de daño genómico en individuos enfermos (Arellano-García et al., 2012).

Además de su utilidad diagnóstica y pronóstica, esta prueba ofrece

oportunidades relevantes en salud pública, al permitir la identificación de poblaciones en riesgo, la evaluación de agentes protectores o nocivos y el diseño de políticas preventivas más efectivas. También puede aplicarse para valorar la eficacia de intervenciones terapéuticas y nutricionales encaminadas a mejorar la estabilidad del genoma. Por ejemplo, se ha demostrado que la deficiencia o el exceso de micronutrientes — como el ácido fólico o ciertos antioxidantes — puede modificar la frecuencia de micronúcleos, actuando como factores protectores o moduladores del daño genético (Fenech, 2021; Zúñiga-González et al., 2007).

Ventajas y limitaciones de la prueba de micronúcleos

La prueba de micronúcleos además de su rapidez y simplicidad, ofrece múltiples ventajas (Heddle et al., 1983) tales como: que los micronúcleos pueden observarse en cualquier fase del ciclo celular, lo que permite una ventana amplia para su detección. El número de células analizables es prácticamente ilimitado y el punto final del análisis (la presencia del micronúcleo) es fácilmente reconocible, incluso por personal con formación limitada en citogenética. No se requiere cariotipo, ya que el análisis se basa en morfología celular básica y tinciones convencionales (Heddle et al., 1983).

Otra ventaja importante es que los micronúcleos formados durante la mitosis persisten al menos durante la siguiente interfase. El daño inducido en cualquier fase del ciclo celular puede observarse en cuanto transcurre un ciclo completo, por lo que un punto de fijación puede ser suficiente. Su interpretación es relativamente clara, se evitan los problemas de otras pruebas citogenéticas, como la ambigüedad en el significado de las lagunas cromosómicas o los intercambios de cromátidas hermanas. También permite detectar con facilidad alteraciones en el aparato mitótico, como la exclusión de cromosomas rezagados en anafase (Arellano-García et al., 2021).

Sin embargo, el ensayo de micronúcleos también presenta limitaciones. Su principal desventaja es que no detecta agentes que no rompen cromosomas o que no provocan retraso en anafase. Por ejemplo, las aberraciones cromosómicas debidas a mecanismos de no disyunción, donde los cromosomas se asocian normalmente con el huso mitótico,



pero se segregan de forma desigual, no generan micronúcleos detectables. Tampoco permite identificar reordenamientos cromosómicos que no impliquen fragmentos acéntricos, como translocaciones recíprocas o inversiones. Si bien, esto no representa una limitación severa para estudios de cribado, es importante señalar que el ensayo proporciona información mecanicista limitada en comparación con el análisis metafásico, ya que no permite conocer el tipo exacto de aberración que originó el micronúcleo (FEbech et al., 2021).

De manera similar, es difícil distinguir, basándose solo en la frecuencia de micronúcleos, entre eventos aneuploidógeno y pérdidas cromosómicas inducidas por anomalías en el huso mitótico. Esta distinción puede lograrse mediante la evaluación del tamaño y contenido de ADN del micronúcleo, con ayuda de sondas específicas que detecten la presencia o ausencia de centrómeros (Ye et al., 2019; Heddle et al., 1983). Otras limitaciones no están directamente relacionadas con el tipo de daño genético, sino con factores experimentales, como el acceso del compuesto a la población celular diana, la farmacocinética del agente en estudio, la dosificación seleccionada y los tiempos de muestreo. Estas variables dependen del diseño experimental y del sistema de ensayo particular utilizado (Heddle et al., 1983).

CAPITULO II

MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS: EVALUACIÓN GENOTOXICOLÓGICA EN MÉDULA ÓSEA Y SANGRE PERIFÉRICA

Micronúcleos en eritrocitos: de Howell-Jolly a la genotoxicología actual

En hematología, los micronúcleos se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, en honor al estadounidense William Henry Howell, quien a finales del siglo XIX los describió por primera vez en eritroblastos. Una década después, el francés Justin Marie Jolly los caracterizó como restos nucleares presentes en eritrocitos circulantes, especialmente en condiciones patológicas. Posteriormente, Schmid (1975) desarrolló un ensayo *in vivo* para detectar micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) de médula ósea, este ensayo, más tarde se adaptó para su aplicación en sangre periférica de animales, ya que no requiere del sacrificio de éstos y es más sencilla de realizarse. Se fundamenta en la maduración eritrocitaria que implica la pérdida del núcleo principal, facilitando así la identificación de micronúcleos.

Actualmente, el ensayo de micronúcleos en médula ósea y sangre periférica son un método de referencia dentro del conjunto estándar de pruebas empleadas en la evaluación genotoxicológica. A nivel mundial, su uso es generalizado, como un método para estudios *in vivo* tanto agudos como crónicos, especialmente en mamíferos pequeños de laboratorio. Esta técnica ofrece ventajas considerables frente al análisis convencional de cromosomas en metafase, como la simplicidad metodológica, menor invasividad y mayor viabilidad para estudios longitu-

dinales (Heddle et al., 1973; MacGregor et al., 1980; Morita et al., 2011; Udriou, 2006).

En los últimos años, el ensayo de micronúcleos *in vivo* se enfoca en perfeccionar la detección de micronúcleos y su asociación con agentes genotóxicos, tomando como base el protocolo estándar inicial. Estas mejoras incluyen la optimización de los tiempos de muestreo, la recolección adecuada de muestras y datos, la inclusión de ambos sexos, la evaluación de rango amplio de dosis —incluidas las dosis límite—, el uso de colorantes altamente específicos para ácidos nucleicos, el análisis de micronúcleos en múltiples tejidos, la integración del ensayo en estudios toxicológicos de rutina y su progresiva automatización (Krishna y Hayashi, 2000).

Sin embargo, como se observa en la figura 1, en años recientes el número de publicaciones en que emplean organismos ha ido disminuyendo, posiblemente debido a las crecientes restricciones éticas y normativas en torno al uso de animales de laboratorio, lo cual limita su aplicación. A ello se suman los elevados costos asociados al mantenimiento y manejo de estos organismos, lo que representa un desafío adicional para su implementación en investigaciones experimentales.

Eritrocitos como biomarcadores de salud-enfermedad

Las anomalías hematológicas se utilizan como indicadores del estado de salud-enfermedad y facilitan evaluaciones toxicológicas, debido a que múltiples condiciones alteran la función, estructura, morfología, permeabilidad y metabolismo de los distintos linajes celulares hematológicos (Frag y Alagawany, 2018). En particular, los eritrocitos (del griego *erythrós*, ‘rojo’, y *kytos*, ‘bolsa’), también conocidos como glóbulos rojos o hematíes, poseen características que los convierten en herramientas valiosas para el biomonitoreo y el desarrollo de bioensayos, se reconocen como indicadores celulares sensibles del estado de salud tanto en humanos como en otras especies (D’Alessandro et al., 2019; Frag y Alagawany, 2018; Guirola et al., 2019; Harabawy y Mosleh, 2014; Heitland y Köster, 2021; Podsiedlik et al., 2020; Stevenson et al., 2017).

Entre sus propiedades destacadas, se encuentran su predominancia como el principal componente celular en circulación (aproximadamen-

te el 80%), la carencia de endomembranas, y la facilidad con la que pueden obtenerse, aislarse y manipularse, características que los posiciona como un modelo poco invasivo frente a otros tejidos o fluidos biológicos. Además, desempeñan funciones críticas en el transporte de gases como oxígeno y dióxido de carbono desde los pulmones hacia los tejidos, en la preservación tisular y mantenimiento de la homeostasis cardiovascular mediante el metabolismo del óxido nítrico, y en el control de la reología sanguínea y del equilibrio ácido-base sistémico (Frag y Alagawany, 2018).

Los eritrocitos representan un modelo ideal para estudiar los daños inducidos por estrés oxidativo, ya que son particularmente susceptibles a la peroxidación lipídica y a alteraciones en la integridad de su membrana. Al ser vehículos de oxígeno, están expuestos a concentraciones elevadas de radicales libres generados por las reacciones de Fenton y Haber-Weiss; esta exposición, combinada con su incapacidad para sintetizar nuevas proteínas por la ausencia de organelos, los convierte en excelentes biomarcadores de estrés oxidativo (D'Alessandro et al., 2019).

Por otro lado, los estudios de hemólisis resultan técnicamente accesibles, ya que la ausencia de endomembranas facilita técnicas fotométricas para cuantificar hemoglobina libre y detectar cambios morfológicos o funcionales en la membrana, como elasticidad, flexibilidad, deformabilidad y alteraciones osmóticas asociadas al envejecimiento, enfermedad o exposición a xenobióticos (Frag y Alagawany, 2018).

Desde una perspectiva citotóxica, la mielosupresión constituye un biomarcador importante, y los EPC actúan como referencia directa de la actividad medular (Frag y Alagawany, 2018).

En cuanto a la genotoxicidad, la presencia de micronúcleos en eritrocitos se utiliza como biomarcador clave: en exposiciones agudas se observan en eritrocitos inmaduros (reticulocitos o policromáticos), mientras que en exposiciones crónicas pueden detectarse en eritrocitos maduros o normocromáticos. En algunas especies es posible distinguir claramente entre ambos tipos, lo cual permite diseñar estudios tanto transversales como longitudinales, según se evalúe el efecto a corto o largo plazo. En humanos, la vida media de los hematíes es de aproxi-

madamente 120 días, lo que permite inferir el tiempo de exposición a agentes tóxicos durante ese periodo y observar posibles cambios morfológicos acumulativos (Zuñiga González et al., 2001).

Incluso, los eritrocitos tienen la capacidad de bioacumular metales pesados y otros tóxicos en concentraciones elevadas, lo que facilita su uso como herramienta para evaluar bioacumulación de sustancias químicas. En toxicología, estos parámetros permiten evaluar tanto la apoptosis eritrocitaria (eriptosis) como la frecuencia de micronúcleos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Harabawy y Mosleh, 2014; Guirola et al., 2019).

Micronúcleos en eritrocitos de médula ósea

La prueba de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea es un ensayo citogenético que se aplica principalmente en pequeños roedores de laboratorio. No obstante, también se ha empleado en muestras humanas recuperadas de frotis elaborados con médula ósea obtenida por indicación médica. Una vez que dichas muestras han cumplido su propósito diagnóstico, pueden ser reutilizadas por los laboratorios para evaluar la frecuencia de micronúcleos (Torres-Bugarín et al., 1999; Zúñiga-González et al., 1996a).

En la médula ósea, los eritroblastos expulsan su núcleo como parte del proceso de maduración hacia eritrocitos policromáticos, los cuales representan aproximadamente el 50 % de los eritrocitos en esta matriz hematopoyética (en contraste con menos del 5 % en sangre periférica). Si durante este proceso se forman micronúcleos, estos permanecen en el citoplasma, donde pueden visualizarse mediante tinciones específicas (Fig. 3) (Antoniou et al., 2023; MacGregor et al., 1980).

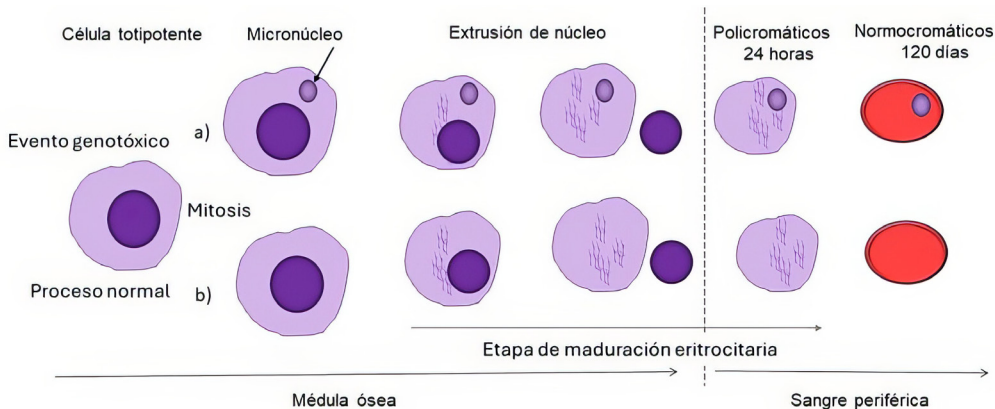


Figura 3. Eritropoyesis y formación de eritrocitos micronucleados. Esquema del proceso de maduración eritrocitaria desde células madre hematopoyéticas en médula ósea hasta eritrocitos maduros en sangre periférica. a) Bajo exposición a agentes genotóxicos (clastógenos o aneugénicos), pueden originarse micronúcleos —fragmentos o cromosomas completos excluidos del núcleo principal— durante la mitosis. Aunque el núcleo se elimina durante la maduración eritroide, el micronúcleo puede persistir en el citoplasma del eritrocito policromático (reticulocito, se observan de color diferente por la presencia de RNA), siendo aún detectable en eritrocitos normocromáticos. b) En condiciones fisiológicas, la extrusión nuclear ocurre sin formación de micronúcleos. Los eritrocitos policromáticos, visibles hasta 24 horas, maduran a normocromáticos, en humanos con vida media de 120 días en sangre periférica. Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, con la ayuda de Biorender®.

Los micronúcleos son estructuras citoplasmáticas delimitadas por una membrana nuclear, que contienen fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas completos que no lograron incorporarse al núcleo principal tras la división celular. Morfológicamente, presentan una forma esférica u ovalada, contornos regulares y se localizan en las proximidades del núcleo. En eritrocitos, los micronúcleos podrían confundirse con los cuerpos de Heinz (también denominados cuerpos de Heinz-Ehrlich), estos corresponden a agregados intracelulares de hemoglobina desnaturalizada usualmente adheridos a la membrana eritrocitaria, y se pueden detectar mediante tinciones supravitales. Son frecuentes en pacientes con hemoglobinopatías, talasemias, enzimopatías (como deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) o esplenectomizados (Krishna y Hayashi, 2000; Torres-Bugarín et al., 1999).

Eritropoyesis y la prueba de micronúcleos en médula ósea

En roedores adultos, tanto la médula ósea como el bazo actúan como órganos hematopoyéticos, donde las células madre dan origen a la eritropoyesis mediante fases secuenciales de proliferación y maduración. No obstante, en algunas especies de peces, este proceso puede ocurrir en órganos distintos, como la cabeza del riñón, el intestino, el bazo, el timo o el endotelio del corazón.

Durante la fase proliferativa, las células progenitoras eritroides se dividen activamente, momento en el cual son altamente vulnerables a los efectos de algunos xenobióticos, los cuales podrían fragmentar el ADN o alterar el uso mitótico, daño que podría originar la formación de micronúcleos.

En la etapa de maduración eritroide, el eritroblasto evoluciona hacia eritrocito policromático (EPC), una célula inmadura que conserva ARN citoplasmático y presenta afinidad por colorantes basófilos, tiñéndose de azul claro o gris azulado con tinción de Giemsa. Durante este proceso, el núcleo principal es expulsado, pero los micronúcleos pueden permanecer en el citoplasma del eritrocito enucleado. Posteriormente, los EPC maduran en circulación, perdiendo su contenido de ARN, y se convierten en eritrocitos normocromáticos (EMN). Estos últimos, más pequeños y acidófilos, se tiñen de naranja claro o rosado con Giemsa, y están compuestos predominantemente por hemoglobina, razón por la cual también se les denomina hematíes o glóbulos rojos.

Ambos tipos celulares —policromáticos y normocromáticos— pueden observarse en médula ósea, bazo, compartimentos vasculares y sangre periférica. En el ensayo de micronúcleos en médula ósea, los eritrocitos deben clasificarse y contabilizarse por separado según su grado de maduración. La frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN), así como la proporción entre EPC totales y EMN, permite estimar el índice de citotoxicidad comparando animales tratados con aquellos del grupo control vehicular.

Este ensayo fue propuesto originalmente por Schmid (1975) y refinado en décadas posteriores (Sommer et al., 2020); se utiliza principalmente para evaluar el potencial de una sustancia para inducir daño cromosómico estructural o numérico. Ambos tipos de alteraciones están

implicados en la carcinogénesis, así como en efectos adversos sobre la reproducción y el desarrollo embrionario.

En la mayoría de las evaluaciones *in vivo*, el agente de ensayo se administra de forma aguda — generalmente en una sola dosis — a ratones o ratas. Posteriormente, se determina la frecuencia de EPCMN en frotis de médula ósea recolectados a las 24 y 48 horas postratamiento. Alternativamente, también pueden utilizarse frotis de sangre periférica para el análisis de eritrocitos maduros e inmaduros con micronúcleos, lo cual es una opción menos invasiva y más accesible en ciertos contextos experimentales.

El ensayo de micronúcleos en eritrocitos ofrece ventajas significativas en comparación con el análisis de metafase en médula ósea. Es técnicamente más sencillo, el criterio de valoración es más objetivo y susceptible de automatización, requiere menor tiempo de ejecución y permite la detección de efectos tanto clastogénicos como aneugénicos. Además, puede integrarse fácilmente en estudios toxicológicos generales. No obstante, aunque el ensayo de aberraciones cromosómicas en metafase permite la evaluación más detallada del daño estructural en el ADN, su uso es menos frecuente en la evaluación de seguridad de sustancias químicas (Hayashi, 1994).

Durante el Taller Internacional sobre Procedimientos de Ensayo de Genotoxicidad (IWGTP), celebrado en Melbourne, Australia, en 1993, se discutieron aspectos metodológicos clave que sirvieron como base para el desarrollo de las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) (Müller, 1999), así como para la revisión del método estandarizado de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), específicamente la Directriz N.º 474: Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos (OECD, 1997).

Como seguimiento a estas iniciativas, en el segundo taller del IWGTP, llevado a cabo en Washington, D.C., los días 25 y 26 de marzo de 1999, se abordaron nuevas recomendaciones. Entre ellas destacaron: la integración del ensayo de micronúcleos con esquemas de administración a dosis repetidas en estudios toxicológicos de largo plazo, el uso de

sistemas automatizados para el conteo de micronúcleos, la posibilidad de aplicar el ensayo en tejidos distintos de la médula ósea o sangre periférica, y el desarrollo de métodos que permitan diferenciar entre micronúcleos derivados de fragmentos acéntricos y aquellos provenientes de cromosomas completos con centrómero (Hayashi et al., 1992; Romagna, 1989; Sommer et al., 2020).

Procedimiento del ensayo de micronúcleos en médula ósea

Registro de datos experimentales

Desde el inicio del estudio, es indispensable llevar un registro detallado de todos los procedimientos, observaciones y eventos ocurridos durante el experimento. Para tal fin, se debe utilizar una bitácora estructurada en la que se consignen parámetros como la talla y el peso de los organismos experimentales, medidos antes, durante y al finalizar el ensayo. Estos datos son fundamentales para la correcta interpretación de los resultados biológicos y estadísticos.

Selección, identificación y alojamiento de los animales de experimentación

Se recomienda el uso de animales jóvenes, sanos y sexualmente maduros, en los que se espera alta actividad mitótica en la médula ósea. La población seleccionada debe ser lo más homogénea posible, preferentemente de la misma cepa, procedencia y sexo, con diferencia de edad, no mayor a una semana entre individuos del mismo grupo. Se deben registrar por separado los datos correspondientes a cada sexo en el caso de trabajar con machos y hembras.

Antes del inicio del experimento, los animales deben aclimatarse a las condiciones del bioterio por mínimo siete días. Durante este tiempo, deben someterse a evaluación para asegurar su estado de salud. La asignación a los distintos grupos experimentales debe realizarse mediante un procedimiento de aleatorización, y cada individuo debe contar con un sistema de identificación confiable.

La identificación puede ser permanente, mediante muescas o perforaciones auriculares (en roedores) o tatuajes (en otras especies), o temporal, utilizando marcadores indelebles, tarjetas en jaulas, o caracterís-

ticas morfológicas distintivas. Para estudios más avanzados, se pueden implementar dispositivos electrónicos de identificación (microchips), siempre que las condiciones del entorno y los recursos institucionales lo permitan (NOM-062-1999).

El alojamiento de los animales debe ajustarse al diseño experimental. En el caso de roedores, el número máximo recomendado por jaula es de seis individuos del mismo sexo y tratamiento, utilizando unidades con dimensiones y materiales apropiados. Además, se deben cumplir los lineamientos de cría, manejo y bienestar animal establecidos por las normas nacionales e internacionales vigentes, controlando variables ambientales como la temperatura, humedad relativa, fotoperiodo, tipo de dieta y acceso continuo a agua potable.

Consideraciones éticas: Principio de las tres “R”

Todo experimento con organismos vivos debe cumplir con el principio de las tres “R”, que orienta el uso ético de animales en investigación biomédica:

Reemplazo (Replacement): Aplicación de métodos alternativos que eviten o sustituyan el uso de animales, ya sea de forma absoluta (por modelos computacionales o cultivos celulares) o relativa (por organismos con menor capacidad de sufrimiento, como ciertos invertebrados).

Reducción (Reduction): Implementación de estrategias que permitan obtener resultados estadísticamente válidos con el menor número posible de animales, optimizando el diseño experimental y evitando el uso innecesario de organismos.

Refinamiento (Refinement): Modificación de técnicas de manipulación, condiciones de alojamiento y protocolos experimentales para minimizar el dolor, el estrés y el sufrimiento de los animales, mejorando su bienestar general durante el estudio.

Administración de la dosis del agente de prueba

La selección de la vía de administración del agente de prueba debe estar debidamente justificada en función de la naturaleza del compuesto, su biodisponibilidad, el objetivo del estudio y su relevancia en térmi-



nos de exposición humana. Las rutas más frecuentemente empleadas en estudios con roedores son la oral, intramuscular e intraperitoneal; esta última requiere precaución especial debido al riesgo de administración accidental en el ciego.

También pueden considerarse otras vías utilizadas en humanos o aquellas empleadas para estudios de toxicidad aguda en ratas y ratones, siempre que se sustente su pertinencia metodológica. En algunos diseños experimentales, puede emplearse una ruta de administración diferente para los grupos control y tratado, aunque esta decisión debe justificarse claramente para evitar sesgos en la interpretación de resultados.

El cálculo de la dosis del agente de prueba se basa en su fracción activa y se expresa generalmente en miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg), utilizando un volumen de administración entre 10 y 20 mL/kg, de acuerdo con el tipo de vehículo y la vía seleccionada. Por ejemplo, la ciclofosfamida, uno de los controles positivos más ampliamente utilizados en ensayos de micronúcleos, se disuelve en agua destilada a concentración de 2 mg/mL. Su dosificación estándar es de 20 mg/kg para ratas y 40 mg/kg para ratones.

De acuerdo con las recomendaciones internacionales, en estudios con roedores, la dosis alta debe corresponder a la dosis máxima tolerada (DMT), definida como la mayor dosis administrable sin inducir mortalidad ni toxicidad excesiva que justifique la eutanasia del animal. En caso de no tener datos específicos, se puede utilizar como referencia la dosis de 2,000 mg/kg. La dosis intermedia debe establecerse como el 50 % de la dosis alta, y la dosis baja, a su vez, como el 50 % de la dosis intermedia (Hayashi et al., 2000; Krishna y Hayashi, 2000).

Grupos experimentales

Para cada compuesto en evaluación, es indispensable incluir al menos dos grupos control. Un control negativo, al que se administra el vehículo inocuo correspondiente (por ejemplo, agua destilada o solución salina), y un control positivo, tratado con un agente de genotoxicidad conocida, como la ciclofosfamida. En este último caso, suele ser suficiente programar la eutanasia únicamente a las 24 horas postratamiento

(Hayashi, 1994; Krishna y Hayashi, 2000).

Diseño experimental (dosis, tiempo de muestreo y número de animales)

El diseño experimental debe ajustarse a los lineamientos internacionales vigentes para estudios de genotoxicidad *in vivo*. Se puede optar por un esquema de dosis única o de tres niveles de dosis. En caso de utilizar una única dosis, se recomienda programar dos tiempos de eutanasia: a 24 y 48 horas posteriores a la administración del agente de prueba. Alternativamente, se pueden aplicar tres dosis escalonadas (alta, intermedia y baja), cubriendo un rango amplio que abarque desde el nivel de uso hasta la dosis máxima tolerada (DMT).

Por cada grupo de tratamiento, se deben incluir cinco a seis animales por sexo y por punto de sacrificio. En caso de prever letalidad inesperada en la dosis alta, o si se requieren datos adicionales — como la concentración plasmática del compuesto —, puede justificarse la inclusión de animales extra.

Es fundamental resolver, antes del ensayo, posibles inconvenientes relacionados con la solubilidad del compuesto, el modo de aplicación y el cálculo preciso de la dosis, idealmente con asesoría de un experto en toxicología (Heddle, 1973; Mavournin et al., 1990).

Tiempos de administración y ciclos celulares

Cuando se evalúan compuestos de actividad genotóxica desconocida, se recomienda administrar el agente de prueba a 6, 24 y 30 horas antes del sacrificio, de modo que la población eritroide sea expuesta al compuesto durante al menos dos ciclos celulares. No obstante, estos intervalos pueden ajustarse según las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del agente evaluado (Krishna y Hayashi, 2000).

En los casos donde se prevea baja toxicidad sistémica (por ejemplo, en sustancias con dosis límite $\geq 2,000$ mg/kg y sin evidencia estructural de genotoxicidad), puede considerarse suficiente una única dosis límite de 2,000 mg/kg, prescindiendo de un diseño completo con tres niveles de dosificación. En todo caso, los animales deben ser observados clínicamente durante todo el estudio para detectar signos de toxicidad (Hayashi, 1994; Krishna y Hayashi, 2000).



Selección por sexo y edad

Se recomienda emplear machos jóvenes, por ejemplo, ratones de 8 a 10 semanas de edad, debido a la ausencia de fluctuaciones hormonales que puedan interferir con la interpretación de los resultados. Sin embargo, si existe evidencia de toxicidad diferencial entre sexos, se debe incluir un grupo de cinco machos y cinco hembras programados para eutanasia a las 24 y 48 horas, a fin de evaluar posibles variaciones sexo-dependientes (Hayashi, 1994; Krishna y Hayashi, 2000).

Extracción de médula ósea y preparación de frotis celulares

Una vez realizada la eutanasia del organismo experimental, se prepara una jeringa estéril de 3 a 5 mL cargada con suero fetal bovino (SFB). A pesar de su costo elevado, el SFB constituye el medio de lavado más adecuado para la recuperación de células viables, debido a que soluciones alternativas más económicas pueden inducir daño celular o aglutinación, lo cual compromete la calidad morfológica de los frotis y dificulta su análisis microscópico. Posteriormente, se extraen ambos fémures, eliminando cuidadosamente los tejidos blandos adheridos sin provocar fracturas. Se seccionan los extremos proximal y distal de cada fémur hasta exponer el canal medular. La irrigación de la médula se efectúa mediante la inserción de una aguja en uno de los extremos, permitiendo la salida de las células hacia un tubo de recolección. Esta operación puede repetirse desde el extremo opuesto para maximizar la recuperación celular. Alternativamente, pueden realizarse aspiraciones controladas desde ambos extremos, asegurándose en todo momento de utilizar SFB como medio de suspensión.

La médula debe liberarse como una suspensión celular fina y homogénea, evitando la formación de agregados o masas celulares. El contenido colectado se transfiere a un tubo de centrifuga y se somete a centrifugación a 1,000 rpm durante 5 minutos. Una vez finalizado este paso, el sobrenadante se retira cuidadosamente mediante una pipeta Pasteur, preferentemente siliconada para minimizar la pérdida celular. El sedimento resultante (botón celular), se resuspende con precaución hasta obtener una mezcla uniforme. Con la misma pipeta, se colocan pequeñas alícuotas de la suspensión sobre portaobjetos limpios. Las

muestras se extienden utilizando un segundo portaobjetos, sostenido a 45° de inclinación, deslizando suavemente para generar una monocapa celular de espesor uniforme. De cada organismo se recomienda obtener al menos tres frotis independientes, a fin de garantizar la representatividad de la muestra.

Las preparaciones se dejan secar a temperatura ambiente, en un entorno protegido de la contaminación ambiental, y se conservan hasta su posterior procesamiento mediante tinción y análisis microscópico (Figura 4).

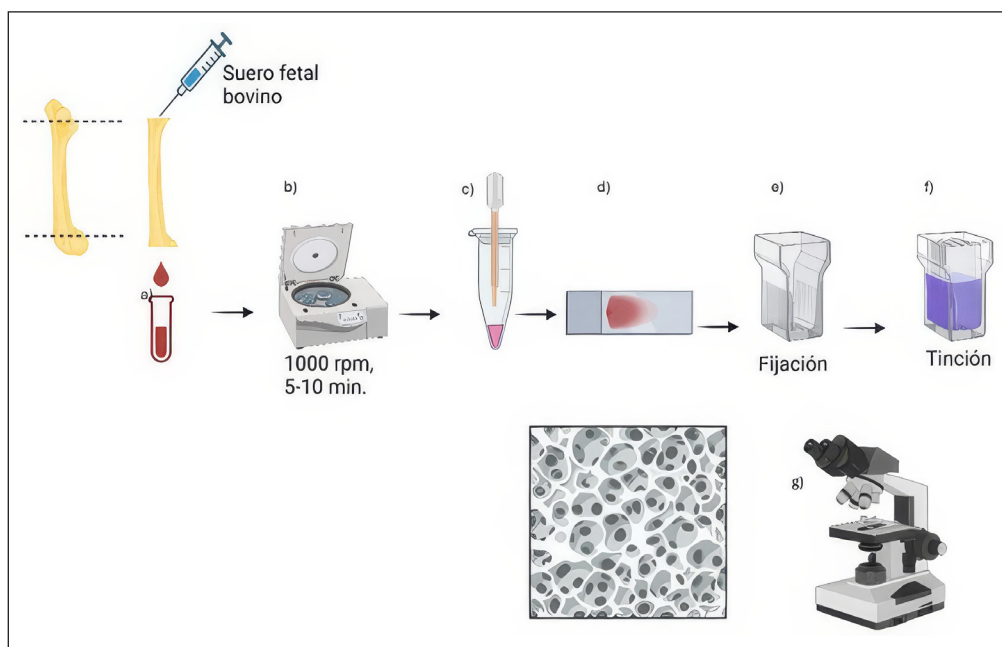


Figura 4. Frotis de médula ósea (procedimiento). a) Extracción de la médula ósea; b) centrifugar; c) Eliminar sobrenadante y resuspender el botón; d) hacer el extendido; e) Fijar los frotis (etanol al 80%); f) Tinción (Wright-Giemsa); g) análisis (100X). Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, con la ayuda de Biorender®.

Fijación y tinción de los frotis celulares

La fijación de las preparaciones se realiza mediante inmersión durante 10 minutos en una de las siguientes soluciones: etanol al 80 % o la mezcla de alcohol etílico con ácido acético glacial en proporción 3:1, según disponibilidad y protocolo del laboratorio.

Para la tinción, se recomienda el uso de colorantes con alta afinidad por el material genético. No obstante, por su accesibilidad, costo reducido y eficacia cromática, uno de los métodos más empleados es la tinción May-Grünwald-Giemsa. En este procedimiento, el portaobjetos con la muestra, se sumerge inicialmente en solución sin diluir durante 3 minutos. Luego, se transfiere a la solución May-Grünwald diluida 1:1 en agua destilada durante 2 minutos. Posteriormente, se realiza la tinción con Giemsa diluido 1:6 en agua destilada durante 10 minutos. Finalizada la tinción, los portaobjetos se enjuagan suavemente con agua destilada, se secan con papel filtro libre de partículas, y se limpia la cara posterior con metanol para facilitar su observación al microscopio (Krishna y Hayashi, 2000).

Análisis microscópico de las laminillas

Las láminas se examinan inicialmente bajo el objetivo de 40X con el fin de identificar regiones técnicamente óptimas, donde las células presentan contornos nítidos, adecuada distribución, ausencia de superposición y una tinción uniforme. Estas zonas, comúnmente localizadas hacia el extremo del frotis, deben contener células intactas y bien conservadas. Aunque las células nucleadas no forman parte de la cuantificación, su morfología puede emplearse como referencia de calidad para evaluar la integridad del preparado.

La tinción diferencial permite distinguir eritrocitos normocromáticos (anulocitos), que adquieren una coloración rojo intenso, de los eritrocitos policromáticos, los cuales presentan un tinte azulado intenso debido a su contenido de ARN residual. En condiciones de control, se espera que aproximadamente 8% de los eritrocitos en las zonas óptimas del frotis correspondan a células policromáticas, y cerca de la mitad de ellos se encuentren en transición madurativa.

El conteo se realiza bajo el objetivo de inmersión 100X, examinan-



do 1,000 EPC por lámina para detectar la presencia de micronúcleos. La unidad de conteo es la célula micronucleada, no el número total de micronúcleos presentes. Como control de calidad, también se debe registrar por separado el número de eritrocitos maduros micronucleados (normocromáticos). Si su frecuencia excede cinco campos con mil EPC evaluados, se considera que la preparación podría contener artefactos morfológicos que simulan micronúcleos, lo que requiere verificación adicional.

Aunque una sola preparación puede contener miles de eritrocitos analizables, desde el punto de vista estadístico y biológico es preferible aumentar el número de animales evaluados en lugar de incrementar el número de células analizadas por individuo (Krishna y Hayashi, 2000).

Interpretación de datos

La prueba de micronúcleos no se limita a la observación directa de la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN), sino que se centra en el análisis de las variaciones en dicha frecuencia entre grupos comparativos. Por lo general, se contrasta un grupo control o de referencia con un grupo expuesto. Esta comparación puede establecerse, por ejemplo, entre organismos que recibieron un agente químico en condiciones controladas frente a otros que no fueron expuestos, o entre individuos provenientes de zonas contaminadas y aquellos de regiones no afectadas. En estudios ambientales, es común comparar organismos recolectados aguas abajo de una fuente de contaminación con los capturados aguas arriba. Por ello, es fundamental definir con precisión qué se está comparando y en qué condiciones experimentales (Udroiu, 2006).

En el ensayo de micronúcleos, la proporción de EPC sobre el total de eritrocitos (EPC/ET), constituye el criterio de valoración secundario, útil para inferir la actividad proliferativa de la médula ósea y detectar efectos citotóxicos del agente de prueba. En cambio, la frecuencia de ECCMN es el criterio principal, ya que refleja directamente el potencial genotóxico del compuesto bajo prueba de forma aguda (aproximadamente 24 h después de la exposición). Es recomendable que el análisis de las muestras, sea “ciego” para el que las observa al microscopio; es decir, sin que el lector conozca la identidad de los tratamientos, para



evitar sesgos en la interpretación.

Por cada animal, se deben evaluar entre 1,000 y 2,000 EPC, con el fin de establecer con precisión tanto su proporción relativa como la frecuencia de micronucleación. La unidad de análisis es el EPCMN, no el número de micronúcleos por célula, ya que un eritrocito puede contener más de un micronúcleo.

En caso de observar citotoxicidad medular, se deben evaluar al menos 200 eritrocitos totales por animal para calcular la proporción de EPC, y al menos 1,000 eritrocitos en sangre periférica, si esta se utiliza como matriz alternativa. Cuando se emplean métodos automatizados, como la citometría de flujo, el número de células analizadas puede ascender a 100,000 por muestra; esto permite la evaluación simultánea de EPC, normocromáticos, EPCMN y EMN, según los objetivos del estudio (Krishna y Hayashi, 2000).

Análisis estadístico y criterios de interpretación

Los datos obtenidos deben analizarse mediante pruebas estadísticas unilaterales (de una sola cola), seleccionadas de acuerdo con la naturaleza de las variables evaluadas. La frecuencia de EPCMN se somete a una prueba unilateral orientada al aumento, ya que se anticipa una elevación en presencia de un agente genotóxico. En contraste, la proporción de EPC se analiza mediante una prueba unilateral orientada a la disminución, al considerarse un biomarcador de citotoxicidad.

Cuando no se identifican diferencias estadísticamente significativas entre sexos, los datos pueden agruparse para su análisis conjunto, a fin de aumentar la potencia estadística. Se considera resultado positivo cuando se observa incremento significativo, dependiente de la dosis, en la frecuencia de EPCMN, y al menos uno de los valores obtenidos excede el rango histórico de los controles negativos. En caso de resultados equívocos o marginales, se recomienda su verificación mediante ensayos adicionales, preferentemente ajustando las condiciones experimentales.

Un resultado positivo indica que el agente evaluado promueve la formación de micronúcleos, lo cual puede reflejar daño cromosómico de tipo estructural (clastogénico) o numérico (aneugénico). Por otro lado,

un resultado negativo sugiere la ausencia de efectos genotóxicos bajo las condiciones específicas del experimento; sin embargo, no descarta el potencial genotóxico del compuesto en otros sistemas biológicos o condiciones experimentales distintas.

En términos mecanísticos, los micronúcleos derivados de daño clastogénico carecen de cinetocoro, mientras que los asociados a daño aneugénico lo contienen. La detección del cinetocoro puede realizarse mediante anticuerpos específicos, disponibles comercialmente; sin embargo, esta técnica es costosa y poco práctica para su uso rutinario (Krishna y Hayashi, 2000).

Procedimiento del ensayo de micronúcleos en sangre periférica

Los micronúcleos inducidos en eritroblastos de la médula ósea, como consecuencia de la exposición a agentes clastogénicos, pueden detectarse posteriormente en eritrocitos circulantes en sangre periférica. Aunque el ensayo de micronúcleos fue originalmente diseñado para su aplicación en médula ósea, su implementación en este tejido presenta carácter invasivo, es técnicamente más complejo e implica la eutanasia del animal. Como respuesta a estas limitaciones, se desarrolló y estandarizó una variante del método que permite detectar EPC obtenidos de sangre periférica, sin necesidad de sacrificar al organismo.

Este enfoque presenta múltiples ventajas adicionales: la obtención de muestras es sencilla, lo que permite realizar estudios longitudinales en los mismos individuos a lo largo del tiempo; además, es un método menos costoso y de ejecución más rápida, manteniendo la sensibilidad adecuada para la detección de daño genético agudo y acumulativo.

Posteriormente, la técnica también fue adaptada para su aplicación en linfocitos de sangre periférica cultivados, ampliando su utilidad en bioensayos de genotoxicidad, tanto para exposiciones únicas como crónicas (Antoniou et al., 2023; MacGregor et al., 1980).

Otro aspecto relevante del modelo hematopoyético es su utilidad en la evaluación de sensibilidad a radionúclidos. La médula ósea es el órgano limitante en tratamientos con radionúclidos dirigidos, ya que su capacidad de tolerancia define la dosis máxima permisible. Por ello, resulta crítico estimar la dosis absorbida por médula ósea a partir de

radionúclidos incorporados al organismo. En este contexto, la prueba de EPC de sangre periférica es un dosímetro biológico no invasivo, útil para estimar la tasa de absorción de radiación en médula ósea, y por esta razón, como herramienta auxiliar en la planificación de tratamientos radioterapéuticos (Lenarczyk et al., 2001).

Fundamento biológico de los eritrocitos micronucleados en sangre periférica

En cualquier especie y ensayo es fundamental considerar la duración del ciclo celular de los eritroblastos, el tiempo de maduración eritrocitaria, su aparición en la circulación periférica y la vida media del eritrocito, ya que estos factores condicionan la correcta interpretación de los resultados (Udroiu, 2006b).

Los micronúcleos se originan durante la división celular, específicamente durante la eritropoyesis en médula ósea, en la etapa de eritroblasto, la cual dura aproximadamente 5 a 7 días (Figura 4). Gran parte de este periodo ocurre en forma de EPC, el cual migra a sangre periférica, donde persiste alrededor de 24 horas. En humanos, los EPC o reticulocitos representan aproximadamente 1 a 1.5 % de los eritrocitos circulantes. Posteriormente, maduran a eritrocitos normocromáticos con una vida media que varía según la especie: en ratones, entre 30 y 40 días; en humanos, alrededor de 120 días; en aves, entre 20 y 45 días; y en peces, desde 105 hasta 310 días, dependiendo de la especie (Albertini y Kaden, 2020; Salamone y Heddle, 1983).

Aproximadamente seis horas después de la última mitosis, el eritroblasto expulsa el núcleo principal, permaneciendo en el citoplasma cualquier micronúcleo que se haya formado. Durante esta fase, el eritrocito contiene ARN ribosómico residual, lo que le confiere coloración distinta en tinciones vitales, y se le identifica como EPC.

En condiciones de estrés hematopoyético (por ejemplo, anemia o toxicidad), se estimula la eritropoyesis, lo que se traduce al aumento de reticulocitos en sangre periférica. Por el contrario, en casos de citotoxicidad o mielosupresión, se reduce su frecuencia, reflejando inhibición de la médula ósea (Albertini y Kaden, 2020).

Durante un ensayo genotoxicológico, los EPCMN observados a las 24 horas posteriores a la administración del agente de prueba reflejan

eventos mitóticos recientes ocurridos en médula ósea. En ratón, estos EPCMN inducidos comienzan a aparecer en circulación periférica aproximadamente 24 horas después de su formación. En la mayoría de las especies, el pico de frecuencia de micronúcleos se produce entre 1 y 3 días posteriores a la exposición, aunque puede extenderse hasta los 5 días, dependiendo de la cinética del compuesto y la especie utilizada (MacGregor *et al.*, 1980; Udrouiu, 2006b).

Sin embargo, la dinámica temporal de aparición de micronúcleos en sangre periférica es una función compleja que depende de múltiples factores, y el momento exacto del pico de frecuencia máxima no puede predecirse con certeza para cada sustancia (MacGregor *et al.*, 1980).

Paradoja de la citotoxicidad en médula ósea

En células que no se dividen activamente, la inducción de micronúcleos no es posible. Cuando un agente de prueba presenta alta citotoxicidad medular, puede inhibir la mitosis, reduciendo drásticamente la producción de EPC. En tal caso, la frecuencia de estos eritrocitos disminuye notablemente, y los pocos presentes pueden ser atípicos, proceder de un subgrupo resistente o representar células cuya última mitosis ocurrió antes de la exposición. Bajo estas condiciones, la obtención de una muestra representativa de 1,000 EPC puede requerir esfuerzo considerable.

Este fenómeno puede llevar a falsa interpretación negativa, ya que no solo se reduce la producción total de eritrocitos, sino también la de eritrocitos micronucleados, enmascarando el verdadero efecto genotóxico del compuesto. Por ello, es esencial considerar la relación entre EPC y normocromáticos como biomarcador funcional de la actividad proliferativa de la médula ósea. La disminución significativa de EPC se interpreta como indicador de citotoxicidad medular (Mavournin *et al.*, 1990; Schlegel y MacGregor, 1983).

Aunque se espera que un agente genotóxico provoque cierto nivel de toxicidad, una toxicidad excesiva es indeseable, ya que impide evaluar adecuadamente la genotoxicidad.

Adicionalmente, cuando se realizan muestreos repetidos de sangre en animales de laboratorio, se puede inducir artificialmente aumento



de eritropoyesis. Esto produce “inundación” de reticulocitos en la circulación, que diluye la proporción de eritrocitos micronucleados previamente formados, reduciendo así su frecuencia aparente (Udroiu, 2006a).

Eritrocitos micronucleados en sangre periférica de vertebrados mamíferos y no mamíferos

En los mamíferos, los eritrocitos maduros carecen de núcleo, por lo que la detección de micronúcleos se limita a etapas inmaduras del eritrocito, como los reticulocitos. En contraste, los eritrocitos de vertebrados no mamíferos —incluyendo aves, reptiles, anfibios y peces— retienen su núcleo, lo que permite evaluar tanto citotoxicidad como

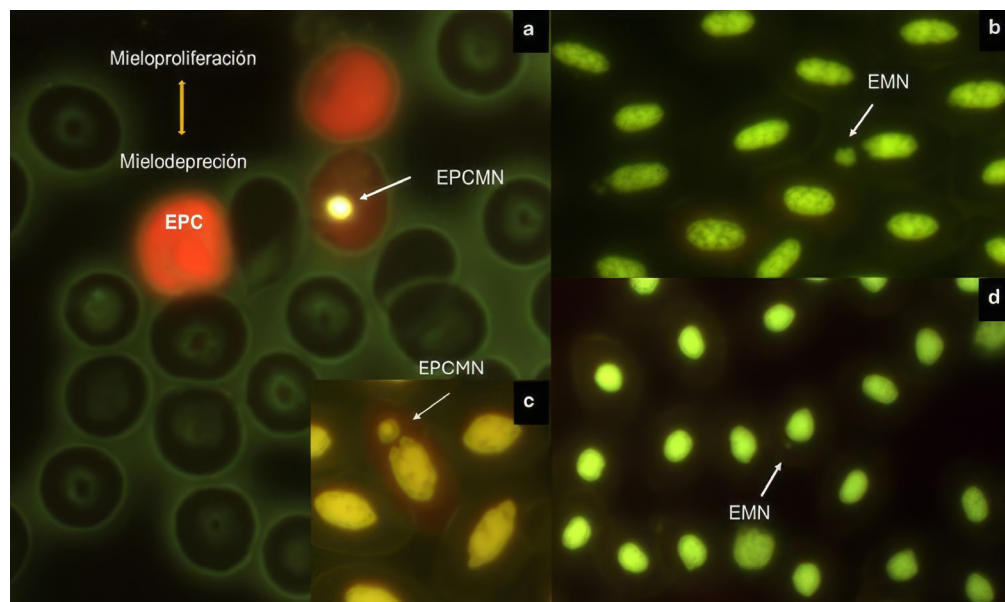


Figura 5. Eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos micronucleados (EMN) en sangre periférica de distintos modelos. a) Eritrocito policromático micronucleado (EPCMN) en médula ósea de ratón. La mayor frecuencia se asocia a mieloproliferación y a la disminución de citotoxicidad medular o mielodepresión. b) EMN en ave. c) EPCMN en embrión de pelícano pardo (*Pelecanus occidentalis*), con morfología alargada característica. d) EMN en pez. Las flechas indican micronúcleos. Tinción: Naranja de acridina. Microscopio Carl Zeiss IVFL Axiostar Plus (100x), filtro de fluorescencia de 450–490 nm. Cortesía de la Dra. en C. Olivia Torres Bugarín.

genotoxicidad directamente en sangre periférica. En estas especies, además de la prueba de micronúcleos, pueden aplicarse técnicas complementarias como la prueba cometa, la detección de fragmentación del ADN y la evaluación de anormalidades nucleares (Fig. 5).

Anormalidades nucleares como biomarcadores de daño genético y citotoxicidad

Las anormalidades o protuberancias nucleares eritrocitarias son malformaciones del núcleo asociadas a errores durante el desarrollo de los eritrocitos y se consideran indicativas de exposición reciente a agentes contaminantes (Santos et al., 2017). Han sido propuestas como biomarcadores potenciales de genotoxicidad en diversos modelos experimentales (Gómez-Meda et al., 2016; Zamora-Pérez et al., 2023). Entre estas alteraciones se incluyen células binucleadas, lóbulos nucleares, muescas, yemas nucleares y vacuolas (véase Fig. 6); todas ellas asociadas a

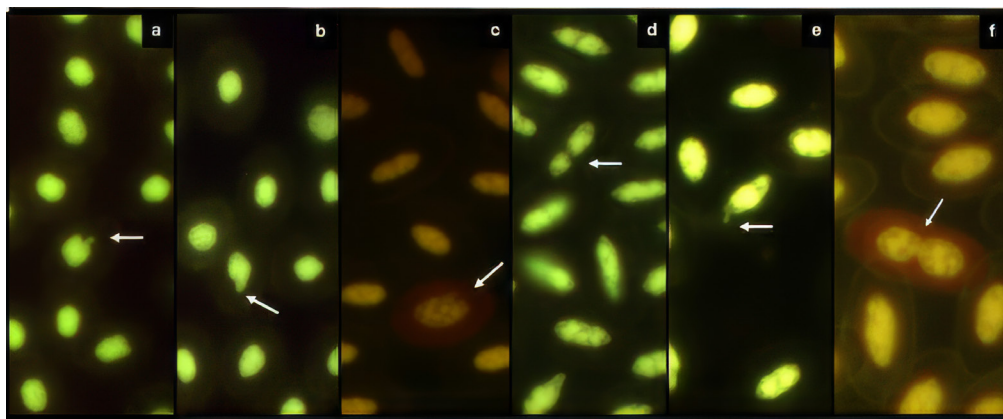


Figura 6. Anormalidades nucleares en eritrocitos de vertebrados no mamíferos. a-b) brotes nucleares (nuclear buds) en eritrocitos del pato cuchara (*Anas clypeata*). c) muesca nuclear en eritrocito policromático (EPC) de *A. clypeata*; d) puente nucleoplásmico en eritrocito de reinita amarilla (*Setophaga petechia*); e) cola nuclear en eritrocito de charal (*Chirostoma lucius*); f) célula binucleada en embrión de gaviota reidora americana (*Leucophaeus atricilla*). Las flechas señalan las anormalidades observadas. Tinción: Naranja de acridina. Observación a 100x con microscopio Carl Zeiss IVFL Axiostar Plus, utilizando filtros de fluorescencia de 450–490 nm. Cortesía de la Dra. en C. Olivia Torres Bugarín.

daño estructural en el ADN. A nivel citológico, también pueden observarse anomalías morfológicas que actúan como indicadores de citotoxicidad, tales como alteraciones en el tamaño (macroцитos, microцитos), forma (esquistocitos, acantocitos, equinocitos), y cambios citoplasmáticos (presencia de vacuolas o muescas).

Estudios en cultivos de linfocitos humanos y porcinos demostraron aumento en la frecuencia de anormalidades nucleares tras la exposición a mitomicina-C, lo cual respalda su utilidad como marcadores de exposición a agentes genotóxicos (Serrano-García et al., 2001). En este contexto, la evaluación de anormalidades nucleares es una medida complementaria para la detección de genotoxicidad *in vivo* e *in situ*, especialmente en especies con eritrocitos nucleados (Zamora-Perez et al., 2023).

Aunque los eritrocitos maduros de mamíferos no tienen núcleo, es posible evaluar genotoxicidad y citotoxicidad a partir de EMN y EPC, respectivamente como evidencia de eventos ocurridos entre 24 y 48 horas posteriores a exposición aguda, o tras exposición crónica a compuestos genotóxicos (Farag y Alagawany, 2018).

El ensayo de micronúcleos en sangre periférica: el papel del bazo

En 1913, Aschoff y Kiyono introdujeron el término “sistema retículo-endotelial”, actualmente conocido como “sistema fagocítico mononuclear”. Este sistema se conforma por una red de células y tejidos distribuidos en todo el organismo, cuya función principal es participar en la respuesta inmunitaria, actuar como filtro sanguíneo y eliminar partículas extrañas, microorganismos, así como células envejecidas o con daño estructural, incluidas aquellas que contienen inclusiones citoplasmáticas como los micronúcleos.

Aunque este sistema se encuentra en múltiples tejidos y órganos, la pulpa roja del bazo destaca como la estructura principal responsable de eliminar restos celulares y eritrocitos con inclusiones (Arellano-García et al., 2021).

El bazo es un órgano impar, no vital, ubicado en el epigastrio izquierdo, por debajo del diafragma. Su color es rojo vino oscuro y presenta una superficie convexa y otra cóncava denominada hilio, por donde

ingresan las arterias y salen las venas y vasos linfáticos. Su morfología, tamaño y grado de distensión varían entre especies. En animales como perros, gatos y caballos, también actúa como reservorio de sangre y plaquetas. Durante el desarrollo fetal, el bazo tiene funciones hematopoyéticas hasta que la médula ósea asume esta labor (Cesta, 2006).

Está recubierto por una cápsula fibroelástica rica en células mioepiteliales, que le permite expandirse significativamente cuando se requiere. El parénquima se divide en dos regiones funcionales: la pulpa blanca y la pulpa roja. La pulpa blanca, que representa entre el 5 y el 20 % de la masa esplénica, región del bazo es el principal tejido linfático del órgano. Está formada por vainas periarteriales que incluyen una arteria central y agregados linfoides esenciales para la captura y presentación de antígenos a las células inmunitarias.

La pulpa roja, de tonalidad más oscura debido a su contenido eritrocitario, es el principal filtro sanguíneo. Elimina eritrocitos envejecidos o con alteraciones morfológicas, incluidos los que contienen micronúcleos, así como restos celulares y agentes extraños. También cumple funciones de almacenamiento de eritrocitos, plaquetas y hierro. Está conformada por senos venosos de flujo lento y una red tridimensional de cordones esplénicos recubiertos de células reticulares y macrófagos altamente fagocíticos, responsables de la depuración sanguínea (Cesta, 2006; Schmid, 1975).

Para que las células alteradas sean eliminadas eficientemente en la pulpa roja del bazo, la sangre debe ingresar a través de la arteria esplénica. Esta se ramifica en arterias trabeculares, las cuales dan origen a arterias centrales rodeadas por linfocitos T dentro de la pulpa blanca. Posteriormente, la sangre fluye hacia la pulpa roja a través de vasos especializados que desembocan en los cordones esplénicos del parénquima. En esta región, los eritrocitos deben atravesar las fenestras estrechas de las células reticulares que conforman los cordones esplénicos para ingresar en los senos venosos.

Los eritrocitos sanos poseen una membrana flexible que les permite deformarse y pasar a través de estas estructuras sin ser destruidos. Sin embargo, a medida que envejecen o presentan daño estructural, pierden flexibilidad, lo que dificulta su tránsito por la microcirculación espléni-

ca. Eventualmente, estos eritrocitos quedan atrapados, sufren lisis y son fagocitados en la pulpa roja por macrófagos especializados (Montalvo-Arenas, 2021).

Existen diferencias histológicas significativas entre especies en la arquitectura de la pulpa roja, lo que permite clasificarla como sinusal o no sinusal (Fig. 7). La pulpa roja sinusal, característica de los humanos, contiene senos venosos (senos pulpaes) recubiertos por células endoteliales en forma de bastón, dispuestas con fenestras delgadas y organizadas regularmente. Esta disposición permite que la filtración sea altamente eficaz, eliminando hasta el 100 % de los eritrocitos envejecidos, anómalos o con inclusiones, incluidos los micronucleados, siempre que el bazo esté funcionalmente íntegro y no haya sido extirpado (Schlegel et al., 1986; Udriou, 2006a).

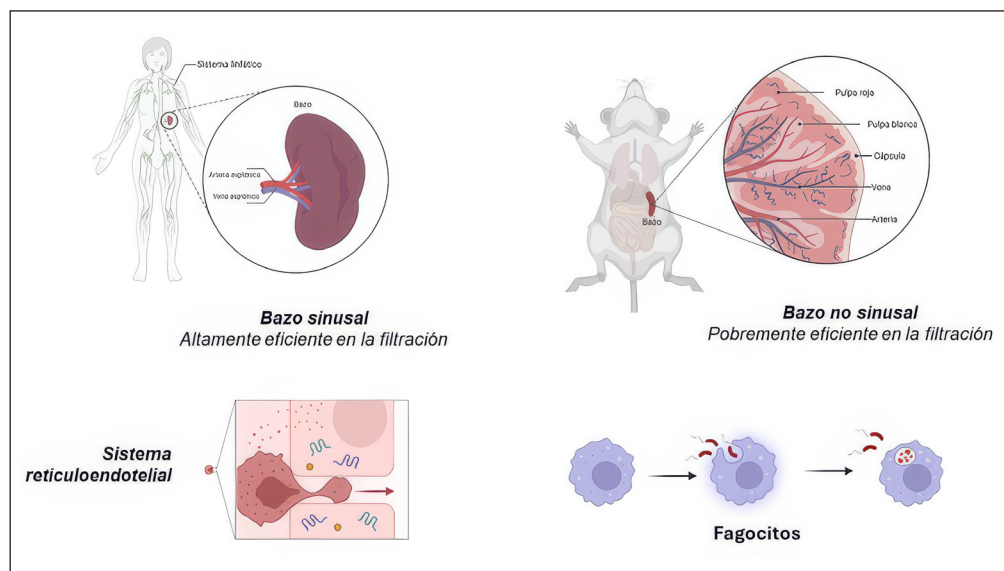


Figura 7. Eficiencia del bazo para eliminar eritrocitos anómalos. El sistema fagocítico mononuclear, especialmente activo en la pulpa roja del bazo, elimina células alteradas como los eritrocitos micronucleados. En bazos sinusales, como en el humano, la filtración es altamente eficiente gracias a senos venosos con fenestras estrechas. En bazos no sinusales, como el de los murinos, su estructura es más abierta, lo cual reduce significativamente la capacidad de depuración. Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, con la ayuda de Biorender®.

En contraste, el bazo no sinusal de algunos mamíferos, como el ratón, contiene vénulas pulpares que no filtran de forma eficiente. Esto permite que los eritrocitos micronucleados circulen libremente, lo que se traduce en frecuencias espontáneamente elevadas en sangre periférica. Esta limitada eficiencia se debe a la prevalencia de vénulas sin anastomosis, formadas por endotelio plano, irregular y con fenestraciones amplias que permiten el paso de células con inclusiones (Montalvo-Arenas, 2021; Udrioiu, 2006a, 2006b).

Adicionalmente, en individuos juveniles de diversas especies, el bazo aún inmaduro presenta baja capacidad de filtración, lo que también se refleja en mayor frecuencia de EMN. A medida que el órgano madura, su función depurativa se optimiza, lo cual reduce significativamente la presencia de estas células en la circulación (Batista-González et al., 2006; Ramírez-Muñoz et al., 1999; Ramos-Ibarra et al., 2020; Zúñiga-González et al., 2001).

En la pulpa roja de vertebrados no mamíferos, como peces, anfibios, cetáceos, sirenios y pinnípedos, los senos venosos están ausentes y sus eritrocitos nucleados no pueden atravesar las hendiduras interendoteliales (Udrioiu, 2006a, 2006b), por ello no ocurre la depuración esplénica de eritrocitos con inclusiones, esto favorece la aplicación de la prueba de micronúcleos en sangre periférica en las especies con estas características.

El conocimiento del papel que desempeña el bazo en la eliminación de EMN en las especies, es esencial para interpretar adecuadamente los resultados obtenidos tanto en estudios de laboratorio como en campo. Por esta razón, la OCDE (1997) recomendó que para la prueba de micronúcleos se utilicen especies de mamíferos cuya actividad esplénica no interfiera con la detección de EMN en sangre periférica.

Ventajas, limitaciones y consideraciones de la prueba de micronúcleos en médula ósea y sangre periférica

La prueba de micronúcleos aplicada en médula ósea y sangre periférica presenta numerosas ventajas metodológicas y biológicas que favorecen su adopción en estudios toxicológicos *in vivo* (Arellano-García et al., 2021; Batista-González et al., 2006; Heddle, 1973; MacGregor et al.,

1980; Markert et al., 2003; Morita et al., 2011; Torres-Bugarín et al., 2019; Schmid, 1975).

Entre sus principales atributos, destaca que no requiere de equipo sofisticado: el instrumento esencial es un microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x), y en caso de utilizar fluorocromos, basta con equiparlo con filtros de fluorescencia adecuados. Además, el análisis de EMN es relativamente sencillo, especialmente en mamíferos, donde los eritrocitos son anucleados, lo que facilita su identificación.

La preparación y análisis de los extendidos celulares son procedimientos rápidos, económicos y técnicamente accesibles. Solo se requieren unas pequeñas gotas de sangre, que pueden obtenerse mediante una punción leve en alguna extremidad del animal. No hay diferencias significativas entre cepas de roedores, lo que amplía la aplicabilidad del modelo (Morita et al., 2011).

Un aspecto fundamental es la persistencia de las células micronucleadas en circulación, lo que permite evaluar efectos genotóxicos agudos y crónicos. Además, es posible diferenciar eritrocitos jóvenes (policromáticos o reticulocitos) de maduros (normocromáticos). La detección de un EPCMN indica un evento ocurrido aproximadamente 24 horas antes, reflejando el momento del daño inducido por la sustancia en estudio (Batista-González et al., 2006; Ramos-Ibarra et al., 2020; Schmid, 1975). La mayor incidencia de EMN en sangre periférica se observa 24 horas después del pico máximo en médula ósea (MacGregor et al., 1980).

Desde el punto de vista citotóxico, la disminución en la frecuencia de EPC sugiere mielosupresión. En cambio, el incremento en los EPCMN indica genotoxicidad aguda, mientras que mayor frecuencia de EMN puede reflejar genotoxicidad crónica (Torres-Bugarín et al., 1999; Arelano-García et al., 2021). La sensibilidad del ensayo es comparable a la de métodos metafásicos para la detección de roturas cromosómicas, y su utilidad no se ve comprometida por inhibidores de la mitosis (MacGregor et al., 1980; Markert et al., 2003).

Con dos puntos de muestreo, generalmente a las 24 y 48 horas, es posible obtener información suficiente sobre la inducción de daño genético (Morita et al., 2011). El seguimiento cada 24 horas permite iden-

tificar el pico de EMN, usualmente entre 30 y 60 horas postexposición (Batista-González et al., 2006). Incluso una única muestra puede evidenciar eventos en cualquier fase mitótica. Al predominar las células en interfase, se optimiza el análisis al evitar la búsqueda de metafases, asegurando que los micronúcleos reflejan divisiones celulares posteriores a la exposición (MacGregor et al., 1980; Torres-Bugarín et al., 2019).

Debido a que no es ético realizar pruebas de toxicidad en humanos, es que se emplea el uso de modelos *in vivo* en mamíferos como los roedores, con gran éxito (Heddle, 1973). Sin duda, el análisis de EMN en sangre periférica representa una alternativa menos invasiva que la médula ósea, con ventajas como el muestreo seriado, la simplicidad técnica y su aplicabilidad en estudios citogenéticos automatizados (Markert et al., 2003; Arellano-García et al., 2021).

Cabe destacar que, la prueba de micronúcleos resulta particularmente útil en especies cuyos cromosomas son numerosos y de pequeño tamaño, como en ratas y ratones, que dificulta el análisis cariológico convencional (Schmid, 1975; Batista-González et al., 2006). No obstante, una limitante relevante es que en mamíferos con un bazo funcional altamente eficiente — como en humanos con bazo sinusal — los eritrocitos micronucleados son eliminados rápidamente de la circulación, lo cual reduce la sensibilidad del ensayo. Por esta razón, solo es aplicable en humanos esplenectomizados o en recién nacidos, cuyo bazo aún no ha madurado completamente (Arellano-García et al., 2021; Batista-González et al., 2006 ; Torres-Bugarín et al., 2019).

Finalmente, aunque existen múltiples modelos experimentales adaptables tanto a condiciones de laboratorio como de campo, es importante considerar que esta técnica no permite detectar mutaciones puntuales, rearrreglos cromosómicos ni daño indirecto al ADN. En este sentido, aquellas sustancias que no alcanzan la médula ósea podrían no inducir respuesta observable, dando lugar a falsos negativos a pesar de su potencial genotóxico (MacGregor et al., 1980; Torres-Bugarín et al., 1999).

Procedimientos metodológicos de la prueba de micronúcleos en sangre periférica

Toma de muestras y procesamiento de frotis: la preparación del frotis para el análisis de micronúcleos en sangre periférica requiere solo dos gotas, las cuales pueden obtenerse mediante una punción o corte leve. En roedores, se emplea comúnmente la punta de la cola; en otras especies, se utilizan venas accesibles según su anatomía (venas yugulares, braquiales, radiales, digitales o metatarsales). Se recomienda preparar dos frotis por individuo (uno de trabajo y otro de respaldo) y punto de muestreo, para ello, se coloca una gota de sangre sobre un portaobjetos limpio previamente codificado, y se realiza el extendido utilizando otro portaobjetos inclinado a 45 grados. Tras el secado, el frotis se fija en etanol al 80 % durante 10 minutos y se almacena hasta su análisis. Los procedimientos de tinción son equivalentes a los de médula ósea. Para mayor precisión en la identificación de micronúcleos, se recomienda naranja de acridina, que tiñe el ARN en rojo/naranja y el ADN en verde-amarillo, lo que facilita la distinción entre núcleos y micronúcleos, así como RNA (se tiñe de color rojo-naranja) y ADN (de color verde-amarillo). Este método reduce errores de lectura e interpretación (CSGMT, 1995; Zúñiga-González et al., 2000)

Conteo celular: el análisis se realiza a 100× con aceite de inmersión. Por organismo, se contabilizan 1,000 eritrocitos totales (eritrocitos normocromáticos + EPC) para determinar la proporción de policromáticos, seguidos de 1,000 EPC para evaluar la frecuencia de EPCMN, y finalmente 10,000 eritrocitos totales para identificar micronúcleos en normocromáticos (EMN). Este enfoque permite discriminar los efectos genotóxicos según la etapa de maduración eritrocitaria (Schmid, 1975; Zúñiga-González et al., 1996a).

Modelos biológicos como biomonitores genotoxicológicos en sangre periférica

La literatura científica documenta amplia variedad de organismos empleados en la detección de agentes micronucleogénicos mediante el

análisis de sangre periférica (Zúñiga-González et al., 1996b, 2000, 2001; Udroi, 2006a). Entre ellos, destacan los pequeños roedores de laboratorio, de ellos el ratón es el modelo por excelencia por su alta sensibilidad, disponibilidad y estandarización metodológica (Heddle, 1973; Krishna y Hayashi, 2000). Aunque las ratas también pueden ser utilizadas, su aplicación requiere considerar ciertas particularidades fisiológicas y hematológicas (Zúñiga-González et al., 1996b).

Otros modelos menos frecuentes incluyen al hámster (Heddle et al., 1983) y algunos primates no humanos, como la marmoseta o tití común (*Callithrix jacchus*) (Lemus-Varela et al., 2006) y el mono rhesus (*Macaca mulatta*) (Zúñiga-González et al., 2005). En aves, hay estudios en especies como el perico atolero (*Aratinga canicularis*) (Gómez-Meda et al., 2006), el tecolote llanero (*Athene cunicularia*) (Martínez Haro et al., 2017) y el ganso nevado (*Chen caerulescens*) (Martínez Quintanilla et al., 2017), incluso embriones aviares (Ceyca et al., 2014).

En reptiles, los modelos incluyen al cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) (Zamora-Pérez et al., 2022), la tortuga verde (*Chelonia mydas*) (Labrada-Martagón et al., 2019), la lagartija partenogenética (*Darevskia armeniaca*) (Simonyan et al., 2020), la culebra lisa de Irán (*Coronella austriaca*) (Hayrettaş et al., 2014) y el alicante (*Pituophis deppei*) (Zúñiga-González et al., 2000). Entre los anfibios, están los sapos, ranas y salamandras (Fernández et al., 1993) y algunos peces (Flores-Galván et al., 2020; Zavala-Aguirre et al., 2010). Cada uno de estos modelos presenta características biológicas, ecológicas y fisiológicas específicas que deben considerarse cuidadosamente al seleccionar el organismo más adecuado para un estudio determinado.

Cabe señalar que la simple cuantificación de contaminantes en matrices abióticas —como agua, suelo o aire— no permite inferir directamente procesos como la biotransformación, la biodisponibilidad o los efectos biológicos, como el daño al ADN. Por ello, la biomonitorización es un enfoque complementario fundamental, ya que permite medir de manera cualitativa o cuantitativa la presencia de agentes exógenos o sus metabolitos en los organismos vivos o en sus entornos.

Los biomonitores se definen como organismos vivos que muestran sensibilidad ante cambios ambientales o que son capaces de acumular

contaminantes en niveles detectables antes de que estos sean evidentes en el ambiente físico. Para ser considerado un buen biomonitor, el organismo debe presentar representatividad espacial y ecológica, amplia disponibilidad, accesibilidad, sensibilidad a los agentes tóxicos, longevidad suficiente y reproducibilidad de los resultados obtenidos (Martínez Quintanilla et al., 2017). En este sentido, cada grupo taxonómico aporta atributos particulares que lo hacen valioso en la evaluación del riesgo ambiental mediante ensayos genotoxicológicos.

Aves como organismos centinela para la evaluación de genotoxicidad ambiental

Las aves es un grupo altamente diverso que habita amplia gama de ecosistemas y ocupa distintos niveles tróficos. Esta diversidad ecológica, junto con su sensibilidad fisiológica, las convierte en excelentes bioindicadores de alteraciones ambientales (Solgi et al., 2020). Su capacidad de responder rápidamente a estresores tanto naturales como antropogénicos permite detectar con eficacia cambios ambientales emergentes. Además, la obtención de muestras biológicas, como plumas o sangre resulta mínimamente invasiva, facilita su uso en programas de monitoreo (Tomazelli et al., 2022; Mallory et al., 2010).

Las plumas, en particular, se emplean como matrices de evaluación a largo plazo debido a su capacidad de bioacumulación de metales pesados y plaguicidas, tanto por deposición externa como por transporte sistémico a través del torrente sanguíneo (Solgi et al., 2020; Souto et al., 2018). Por otro lado, la sangre permite evaluar biomarcadores de daño genético, como la frecuencia de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en eritrocitos (Tomazelli et al., 2022).

Factores como el comportamiento, la dieta y la disponibilidad de alimento influyen notablemente en la exposición a contaminantes y, por ende, en las variaciones observadas en la frecuencia de micronúcleos y aberraciones nucleares. Está documentado que las aves de niveles tróficos superiores, las aves adultas, así como las especies terrestres insectívoras —en comparación con las acuáticas— tienden a acumular mayor concentración de metales, lo que se traduce en incremento del proceso de biomagnificación y en mayor frecuencia de alteraciones eritrocitarias

(Quirós et al., 2008; Santos et al., 2017; Tomazelli et al., 2022).

Anfibios

Los anfibios son elementos clave tanto en los ecosistemas naturales como en los agrícolas; no obstante, su cercanía a actividades antropogénicas —como la agricultura y la ganadería— ha contribuido de manera significativa a su marcado descenso poblacional en las últimas décadas.”

Debido a su alta sensibilidad a los cambios ambientales y a la exposición a contaminantes, se consideran excelentes biomonitores. Esta vulnerabilidad se explica por características fisiológicas particulares, como su piel húmeda y altamente permeable, su escasa movilidad, y su ciclo de vida complejo, que incluye fases acuáticas y terrestres.

En este contexto, los eritrocitos de los anfibios constituyen un tejido diana ideal para detectar daño genético a través del ensayo de micronúcleos. Estas células, grandes y nucleadas, se dividen directamente en la circulación, lo que permite detectar con precisión la exposición a agentes genotóxicos. Diversos estudios evaluaron la sensibilidad de diferentes especies y fases del desarrollo, incluidos periodos como la muda, mostrando consistentemente alta susceptibilidad a genotóxicos.

Particularmente, las fases larvarias son utilizadas de forma extensiva para probar las propiedades genotóxicas de diversas sustancias químicas. En la década de 1980, Jaylet y colaboradores desarrollaron un modelo basado en eritrocitos de sangre periférica de larvas de tritón (*Pleurodeles waltl*), al observar que eran más sensibles que los ejemplares adultos. Esta metodología, posteriormente conocida como la “prueba de Jaylet”, ha sido aplicada a numerosas especies, incluyendo renacuajos de *Xenopus laevis* y *Ambystoma mexicanum*, así como en Rana temporaria, adultos de *Lithobates catesbeianus*, *Fejervarya limnocharis* y *Pelophylax ridibundus*, entre otras. Zamora-Pérez et al., (2004), demostraron la utilidad de la piel desprendida como tejido de análisis al determinar la frecuencia de células micronucleadas en ambistomas expuestas a ciclofosfamida y colchicina. Por otro lado, Udriou (2008), describió la presencia de micronúcleos en diversos tejidos de *Triturus carnifex*, incluidos eritrocitos adultos, branquias larvarias y piel de-

sprendida, en ejemplares recolectados de estanques con altas concentraciones de radón.

Estos hallazgos confirman la versatilidad y sensibilidad de los anfibios como modelos experimentales en estudios de genotoxicidad ambiental, particularmente en fases juveniles, donde las respuestas celulares a los agentes químicos son más evidentes.

Peces

Las masas de agua dulce y marina reciben gran carga de contaminantes químicos de origen antropogénico. Ante esta problemática, los ensayos ecotoxicológicos están consolidados como herramientas útiles para evaluar el potencial genotóxico acumulativo de estos agentes. En este contexto, los peces son un modelo de interés, ya que responden a agentes tóxicos de manera similar a los vertebrados superiores, y permiten inferir riesgos potenciales para la salud humana (Udroiu, 2006b).

En muchas especies de peces, el análisis citogenético tradicional mediante metafases o intercambio de cromátidas hermanas se ve limitado por la abundancia de cromosomas pequeños y por la baja actividad mitótica. Como alternativa, el ensayo de micronúcleos está posicionado como una técnica eficaz y versátil, aplicable independientemente del cariotipo, tanto en estudios de laboratorio como en condiciones de campo para evaluar la actividad genotóxica de sustancias y mezclas ambientales complejas.

Para optimizar la aplicación de esta técnica, se ha ensayado en diversos tipos de tejidos, como branquias, aletas, células renales, hepáticas y eritrocitos periféricos. El epitelio branquial, por ejemplo, es altamente sensible a los efectos genotóxicos inducidos por contaminantes transportados por el agua. Sin embargo, su uso implica el sacrificio del organismo y requiere protocolos complejos para el aislamiento celular. Las células de las aletas, que están en contacto directo con el entorno, pueden obtenerse mediante un pequeño corte, cultivarse, inducirse a mitosis y analizarse posteriormente, aunque este enfoque también requiere de más recursos; además que conlleva cierta complejidad técnica para su realización.

Por su parte, los hepatocitos son un tejido diana adecuado para la

evaluación de sustancias químicas que requieren de biotransformación, ya que el metabolismo hepático de los peces es comparable al de los mamíferos. No obstante, esta alternativa también es invasiva y presenta baja tasa mitótica.

Los eritrocitos de sangre periférica, al ser nucleados, son las células más comúnmente utilizadas para el ensayo de micronúcleos y anomalías nucleares en peces. Sus ventajas incluyen la sencillez de los procedimientos metodológicos y la posibilidad de evitar el sacrificio del animal, especialmente en especies de mayor tamaño. Además, es conveniente analizar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos nucleados provenientes de la cabeza del riñón, órgano que en peces funciona como principal sitio hematopoyético, análogo a la médula ósea en mamíferos. Los eritrocitos formados en estos órganos reflejan eventos genotóxicos ocurridos durante el ciclo celular, mientras que aquellos presentes en la circulación periférica informan sobre exposiciones ocurridas a lo largo de la vida útil del eritrocito.

En este sentido, las frecuencias de eritrocitos policromáticos micronucleados en sangre periférica ofrecen información comparable a la obtenida a partir de la cabeza del riñón. Por otro lado, la frecuencia de eritrocitos normocromáticos micronucleados permite inferir eventos ocurridos durante todo el ciclo de vida de estas células, el cual es considerablemente más largo en peces que en mamíferos: se estima en aproximadamente 105 días para *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) y hasta 310 días en *Cyprinus carpio* (carpa espejo) (Udroiu, 2006b).

Dada esta longevidad eritrocitaria, la prueba de micronúcleos en sangre periférica resulta especialmente útil en estudios de exposición crónica in situ, tanto en especies marinas como de agua dulce, particularmente si la especie en cuestión no presenta eritrocitos policromáticos en circulación.

La técnica fue desarrollada originalmente en *Umbra pygmaea* y posteriormente validada en diversas especies expuestas a múltiples agentes genotóxicos. Diversos estudios encontraron correlaciones entre la frecuencia de micronúcleos y otras alteraciones nucleares, como yemas nucleares, núcleos lobulados y muescas, las cuales se asocian principalmente con efectos citotóxicos y deben registrarse por separado.

Cabe señalar que la frecuencia basal de EMN varía considerablemente entre especies, con valores reportados que oscilan entre 0 y 13 por cada 1,000 células, aunque la mayoría de los estudios informan rangos entre 0 y 1 (Udroiu, 2006b; Bolognesi y Hayashi, 2011). Esta variabilidad puede atribuirse a factores intra e interespecíficos, tales como edad, tamaño, sexo, eficiencia esplénica, dieta, metabolismo, capacidad de reparación del ADN, tasa proliferativa del tejido analizados, así como a las condiciones ambientales y del tratamiento experimental. Incluso dentro de la misma especie, hay diferencias de hasta uno o dos órdenes de magnitud.

Selección de biomonitores genotoxicológicos: criterios morfológicos y citogenéticos

La selección de un modelo experimental para la prueba de micronúcleos requiere considerar características fisiológicas, citogenéticas e histológicas. El organismo debe ser de tamaño adecuado, fácil de mantener en condiciones controladas y no estar en peligro de extinción, todo esto asegura la viabilidad del estudio (Zúñiga et al., 1996b; Udroiu, 2006a).

Desde el enfoque citogenético, se recomienda que la especie posea pocos cromosomas y de gran tamaño, esto facilita su análisis y minimiza errores en la evaluación del daño nuclear. Además, la arquitectura histológica del bazo, en particular la morfología de la pulpa roja; los bazos con pulpa roja no sinusal son ineficaces en la eliminación de EMN o inclusiones, lo que favorece su detección. En ausencia de datos histológicos, esta condición puede inferirse si se observan ≥ 3 eritrocitos micronucleados por cada 10,000 eritrocitos totales, incluso policromáticos y normocromáticos (Udroiu, 2006a; Zúñiga et al., 1996; Zúñiga-González et al., 2000, 2001).

El tejido seleccionado debe contener células en división activa, lo que favorece la detección de alteraciones nucleares inducidas por agentes genotóxicos. Asimismo, se requiere alta densidad celular para garantizar la cuantificación estadísticamente robusta. Morfológicamente, las células deben tener relación núcleo-citoplasma amplia y núcleos de contorno regular, sin lóbulos ni extensiones, para evitar falsas identificaciones de micronúcleos y asegurar la precisión del análisis (Zúñiga et al., 1996b; Zúñiga-González et al., 2000, 2001).

CAPÍTULO III

CITOTOXICIDAD Y GENOTIXICIDAD EN LINFOCITOS

Panorama general del ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN) en linfocitos humanos

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN) — por sus siglas en inglés) — es una técnica *in vitro* basada en el cultivo *ex vivo* de linfocitos periféricos. Su enfoque integral permite evaluar múltiples biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad, lo que la hace útil en estudios experimentales, ambientales y de biomonitoreo poblacional para detectar efectos citogenotóxicos de agentes físicos, químicos o biológicos (Fenech, et al., 2003a, 2003b; Sommer et al., 2020).

La metodología del ensayo de micronúcleos se origina en las observaciones de Howell (1890) y Jolly (1907), quienes describieron fragmentos de cromatina fuera del núcleo principal (Howell, 1890; Jolly, 1907; Sears y Udden, 2012). Durante el siglo XX, estudios en células de cebolla, haba y trigo aportaron al entendimiento de su formación y significado biológico (Levan, 1938). Más tarde, Fiskesjö, propuso el modelo *Allium cepa* como estándar para ensayos citogenotóxicos en vegetales, ampliando su aplicación a múltiples especies y tejidos vegetales, animales y humanos (Fiskesjö et al., 1985).

En paralelo al desarrollo del ensayo en células vegetales, se establecieron protocolos en pequeños mamíferos, aplicados tanto en médula ósea (Schmid, 1975; Morita et al., 2011) como en eritrocitos de sangre periférica (Hayashi, 1992; Hayashi et al., 1994, 2007; Krishna y Hayashi, 2000; Sato et al., 1995; Tolbert et al., 1992). Y la adaptación en linfocitos

humanos, no fue la excepción, aunque inicialmente se aplicó en células, pero fue difícil detectar las alteraciones nucleares y se sobrestimaba la no proliferación celular (Countryman y Heddle, 1977).

Al descubrir que la citocalasina inhibe la actina durante la citocinesis en telofase, se propuso su uso para bloquear este proceso (Hoehn et al., 1973; Himes et al., 1976). El bloqueo genera células mono-, bi-, tri- o tetranucleadas, según la fase del ciclo celular al inicio del cultivo. Esta estrategia resolvió la sobreestimación de la no proliferación y permitió detectar otras anomalías como brotes nucleares (buds) y puentes de cromatina (Fenech y Morley, 1985, 1986).

El principio teórico-metodológico del CBMN en linfocitos periféricos consiste en interrumpir la citocinesis antes de completar la división celular. La citocalasina inhibe la actina, permitiendo la formación de células binucleadas en las que pueden identificarse anomalías nucleares asociadas a genotoxicidad. El bloqueo se aplica a las 44 horas del cultivo, asegurando que las células interfásicas hayan completado una sola división, lo que facilita la detección de eventos genotóxicos previos (Fenech et al., 2003a; 2003b; Kirsch-Volders et al., 2006).

Este capítulo describe los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad evaluables mediante el ensayo CBMN. Los primeros incluyen la proliferación celular *ex vivo*, necrosis y apoptosis. En cuanto a la genotoxicidad, se analizan micronúcleos (MNi) y brotes nucleares (NBud) en células mononucleadas, así como micronúcleos, brotes nucleares y puentes nucleoplásmicos (NPB) en binucleadas, todos son indicadores de inestabilidad genómica (Fenech, 2020).

Biomarcadores de proliferación celular y citotoxicidad en el CBMN

El ensayo CBMN permite identificar anomalías celulares asociadas a inestabilidad cromosómica (Fenech, 2020). La genotoxicidad se detecta mediante estructuras indicativas de daño al ADN, observables al microscopio tras el análisis de al menos 1000 células binucleadas y mononucleadas viables (Cheong et al., 2013; Lindberg et al., 2007). Además, de revelar los distintos desenlaces de la división celular (Fig. 8); el CBMN permite evaluar la proliferación y muerte celular, tanto en estudios de biomonitoreo como en ensayos toxicológicos controlados (Fenech et al.,

1999b; Kirsch-Volders y Fenech, 2001).

La proliferación celular se estima con base en el conteo de células mononucleadas (mono)-, bi (BN)-, tri (TriN) - y tetranucleadas (TetraN) en total de 500 células observadas al microscopio óptico (100X). Estos datos permiten calcular el índice mitótico (IM), también conocido como índice de duplicación celular (NDI por sus siglas en inglés), expresado como sigue:

$$\text{NDI} = \frac{(\# \text{MONO}) + 2(\# \text{bn}) + 3(\# \text{TriN}) + 4(\# \text{TetraN})}{500 \text{ células}}$$

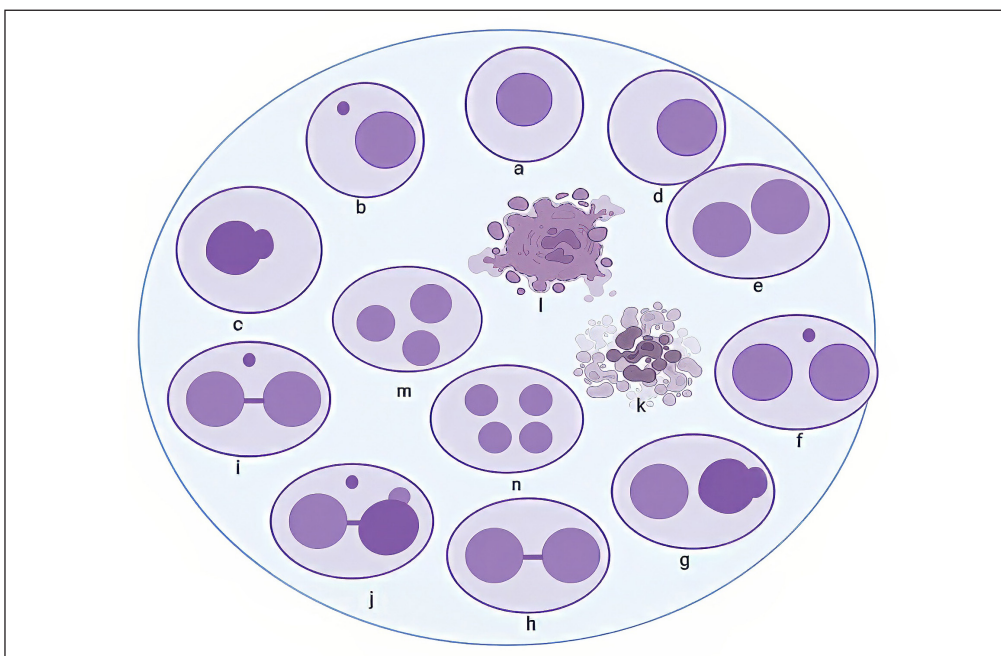


Figura 8. Campo representativo del ensayo CBMN en linfocitos, con distintas morfologías celulares: a) interfásica normal; b) mononucleada con micronúcleo; c) brote nuclear (NBud); d) interfásica temprana tras estimulación; e) binucleada normal; f) micronúcleo; g) puente nucleoplásmico (NPB); h) con NPB y micronúcleo; i) puente, gema y micronúcleo; j) necrosis; k) apoptosis; l) trinucleada y m) tetranucleada. Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, con la ayuda de *Biorender*®.

Muerte celular y citostasis

Aunque el NDI es útil para estimar la proliferación celular, Kirsch-Volders y Fenech (2001), destacaron la necesidad de incorporar indicadores adicionales para la interpretación más completa del ensayo CBMN. En particular; subrayaron que el análisis de citotoxicidad requiere cuantificar células en necrosis y apoptosis (Fig. 9), ya que estos eventos reflejan respuestas clave ante el daño inducido por agentes tóxicos.

La citotoxicidad implica alteraciones en procesos esenciales del ciclo celular, como la velocidad de reproducción, la tasa de proliferación, la viabilidad y el tipo de muerte celular. En el caso de apoptosis, la cual es caracterizada por mecanismos ordenados y no inflamatorios, o no programada (necrosis), es asociada a daño severo, desorganización celular e inflamación tisular. Estos procesos pueden verse afectados por agentes físicos, químicos o biológicos con capacidad citotóxica, comprometiendo la homeostasis y funcionalidad celular. El análisis de apoptosis y necrosis en el ensayo CBMN permite estimar la pérdida de viabilidad celular y evaluar el potencial tóxico integral de una sustancia, lo cual ofrece una herramienta más robusta para estudiar riesgos genotóxicos y citotóxicos.

Agentes físicos, químicos, biológicos y estresores —como hipoxia, estrés oxidativo o inflamación crónica— pueden activar rutas moleculares que involucran genes supresores tumorales como *TP53*, *RB1* y *ATM*. Estos genes, guardianes del genoma, regulan el destino celular según la fase del ciclo, la naturaleza y la severidad del daño. Su activación puede inducir respuestas adaptativas o terminales: (1) tolerancia transitoria al daño del ADN para mantener la replicación; (2) incorporación de secuencias anómalas como estrategia de supervivencia; (3) detención del ciclo celular en G1/S o G2/M para facilitar la reparación; y (4) muerte celular por apoptosis (programada) o necrosis (no controlada).

En el ensayo CBMN, sustancias citotóxicas o estresores que no dañan directamente el ADN —como aquellos que afectan el citoesqueleto, las membranas o la señalización mitótica— pueden inducir respuestas adversas. Estas incluyen la activación de rutas apoptóticas intrínsecas (mitocondriales) o extrínsecas (mediadas por receptores de muerte), así como necrosis por daño irreversible. Además, la alteración de la segre-

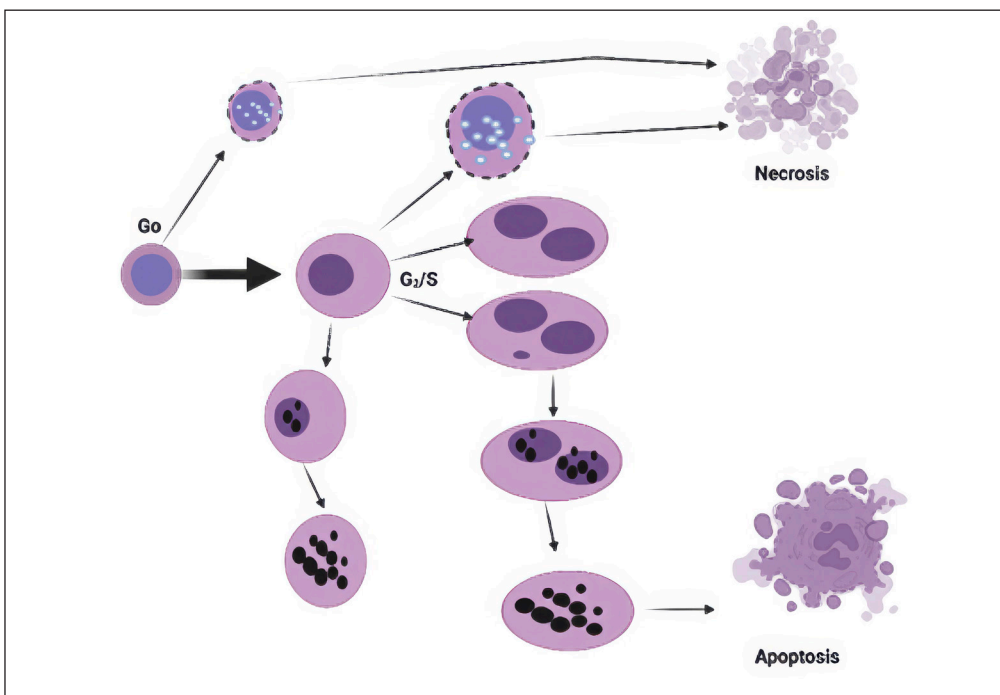


Figura 9. Vías de muerte celular (necrosis/apoptosis) en el CBMN. Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, *con la ayuda de Biorender®*.

gación cromosómica puede generar aneuploidía, puentes nucleoplásmicos o micronúcleos.

Estas múltiples respuestas celulares frente a agentes ambientales tóxicos tienen el potencial de modificar sustancialmente la proporción de células en fase mitótica durante el cultivo, afectando directamente la frecuencia de células sanas, dañadas o en proceso de muerte celular. Su análisis mediante el ensayo CBMN ofrece una visión integrada del impacto citotóxico y genotóxico de los compuestos evaluados (Fenech et al., 1999a; Kirsch-Volders y Fenech, 2001).

Biomarcadores de genotoxicidad en el ensayo CBMN

En el ensayo CBMN, en células binucleadas los biomarcadores de daño genético no reparado o mal reparado en distintas fases del ciclo celular (genotoxicidad) son los micronúcleos, los brotes nucleares y

puentes nucleoplásmicos, y en mononucleadas micronúcleos y brotes nucleares (Fig. 10). En linfocitos humanos estas anomalías son registradas al final del cultivo, cuando las células ya alcanzaron la fase G_0 a las 72 horas (Fenech, 2020).

Estas estructuras anómalas reflejan procesos bioquímicos asociados con inestabilidad genómica. Los micronúcleos pueden originarse por clastogénesis (fragmentación cromosómica) o aneugénesis (pérdida de cromosomas), debido a errores en la segregación o reparación del ADN. Esto genera aberraciones estructurales, intercambios entre cromátidas y fragmentos acéntricos que permanecen en el citoplasma al no integrarse al núcleo principal. La formación de micronúcleos puede estar relacionada con la hipometilación del ADN en regiones centro- y pericéntricas, lo que afecta el ensamblaje del cinetocoro y provoca segregación cromosómica defectuosa. También contribuyen a este proceso, las mutaciones en proteínas del cinetocoro y los microtúbulos. Otros factores incluyen alteraciones en el huso mitótico, fallas en los puntos de control del ciclo celular —especialmente en mitosis— y amplificación anormal

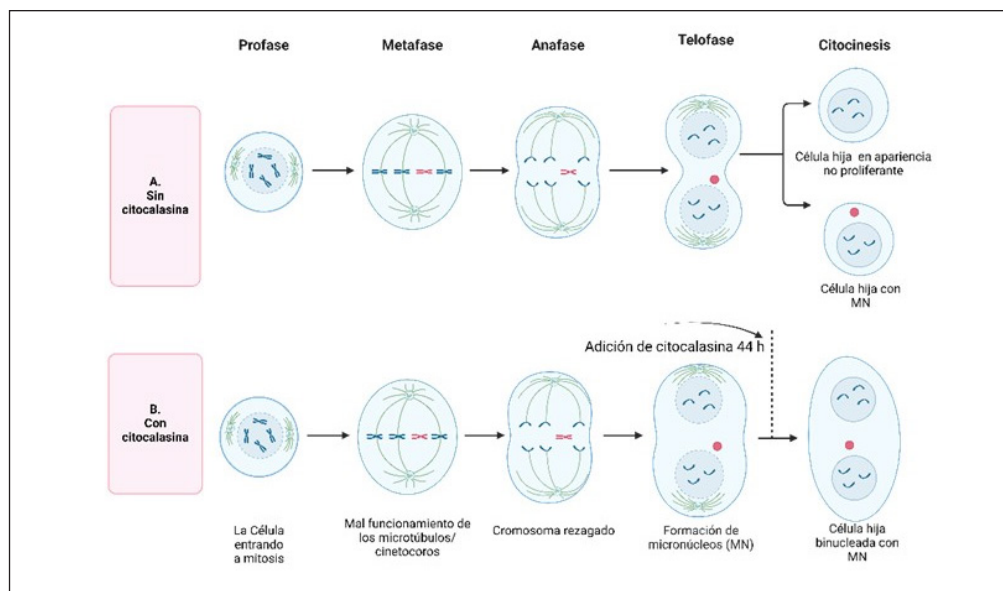


Figura 10. Anomalías nucleares en linfocitos micronucleados. a) sin uso de citocalasina; b) uso de citocalasina.

de centrosomas, que aumentan el riesgo de errores en la segregación cromosómica. También se ha propuesto que cromosomas dicéntricos, formados por fusiones telomérica, contribuyen a estos eventos (Fenech y Crott, 2002; Fenech et al., 2011, 2016).

La formación de micronúcleos en linfocitos cultivados puede explicarse por dos procesos principales: 1) la persistencia de cromosomas acéntricos o fragmentos rezagados durante la anafase, debido a daño en el ADN no reparado o mal reparado y 2) la pérdida de cromosomas completos en anafase, asociada a cinco mecanismos moleculares: a) hipometilación de ADN centro- y pericéntrico; b) defectos en proteínas o ensamblaje del cinetocoro; c) disfunción del huso mitótico; d) fallas en genes del punto de control de anafase y e) estrés replicativo no resuelto (Fenech et al., 2011; Russo y Degrossi, 2018).

La formación de puentes nucleoplásmicos (NPB) en células con citocinesis bloqueada se asocia a cromosomas dicéntricos, cuyos centrómeros son traccionados hacia polos opuestos durante la anafase. Al no completarse la división citoplasmática, estos cromosomas quedan atrapados entre núcleos hijos, rodeados por la membrana nuclear, lo que da lugar a un puente anafásico. En condiciones sin bloqueo, estos puentes suelen romperse, originando micronúcleos secundarios (Fenech et al., 2011).

Los cromosomas dicéntricos contienen dos centrómeros en lugar de uno, y se originan principalmente por mecanismos de reparación de rupturas cromosómicas o por fusiones de extremos teloméricos, fenómeno conocido como fusión telomérica. Este proceso está asociado con la alteración en la formación del telosoma, estructura proteica cuya función es proteger y estabilizar la región telomérica. La disfunción del telosoma puede ser causada por un acortamiento excesivo de los telómeros, por deleciones en sus secuencias o por daño estructural, lo que conduce a fusiones cromosómicas anómalas durante la mitosis, dando lugar a la formación de cromosomas dicéntricos y, en consecuencia, a puentes nucleoplásmicos observables en células binucleadas.

Estudios recientes proponen que la formación de puente nucleoplásmico (NPB) comparte mecanismos moleculares con la génesis de micronúcleos. En particular, se destaca el papel clave de los telómeros en estos eventos, al identificarse al menos cuatro mecanismos implicados:

1) reparación incorrecta de roturas de ADN; 2) fusiones de extremos teloméricos, asociadas a telómeros excesivamente cortos, disfuncionales o ausentes; 3) separación defectuosa de cromátidas hermanas durante la anafase, vinculada con errores en los mecanismos de desacoplamiento; y 4) estrés replicativo no resuelto, que interfiere con la correcta progresión del ciclo celular.

A partir de los estudios realizados por Shimizu y colaboradores a finales del siglo pasado e inicios del presente, se obtuvo evidencia que respalda el origen de los NBuds a partir de ADN amplificado, localizado selectivamente en regiones específicas de la periferia del núcleo. Este ADN es eliminado mediante la formación de brotes durante la fase S del ciclo celular, los cuales eventualmente pueden dar origen a micronúcleos (Shimizu et al., 1998, 2000). Sin embargo, a raíz del estudio emblemático de Lindberg y colaboradores (2007), se consolidó la hipótesis, de que los NBuds están asociados con procesos activos de eliminación de material genético desde el núcleo celular. Esto incluye la expulsión de ADN amplificado, potencialmente generado por múltiples rondas de rupturas cromosómicas, resultado de intentos fallidos de reparación y eliminación, así como la remoción de complejos ADN-proteína.

Otro mecanismo propuesto para la formación de NBuds es la eliminación de cromosomas excedentes, proceso que puede ocurrir en células poliploides como estrategia de rescate para corregir estados de aneuploidía. Además, los NBuds pueden originarse a partir de fragmentos residuales de un puente nucleoplásmico (NPB) roto entre dos núcleos, lo que genera una estructura temporal en forma de brote en uno o ambos núcleos (Fenech et al., 2011; Fenech y Crott, 2002; Lindberg et al., 2007).

En conjunto, la presencia de NBuds constituye la manifestación clara de alteraciones cromosómicas significativas, que pueden ser detectadas mediante el bloqueo de la citocinesis en linfocitos cultivados. En la siguiente sección se presentan los principios metodológicos del ensayo CBMN, con base en los protocolos más ampliamente utilizados en la literatura científica (Bonassi et al., 2001; Fenech, 2007).

Aspectos técnicos y materiales básicos para el ensayo CBMN

Para implementar el ensayo CBMN, se recomienda contar con una campana de flujo laminar. No obstante, en contextos con recursos limitados, es posible emplear una mesa con cubierta de vidrio o acero inoxidable, siempre que sea lo suficientemente amplia para trabajar en condiciones de esterilidad, utilizando un mechero durante la siembra de cultivos y la fase de bloqueo de la citocinesis.

Para asegurar la proliferación celular, es indispensable contar con una incubadora que mantenga la temperatura constante a 37 °C. En su ausencia, puede improvisarse una cámara térmica utilizando una caja de metal, madera o vidrio, aislada con espuma, fibra de vidrio o cartones de huevo vacíos, e iluminada con focos de bajo voltaje (20–30 W) para alcanzar la temperatura requerida. Es imprescindible disponer de una centrífuga para los procesos de lavado celular, así como un refrigerador para conservar los reactivos sensibles.

Uno de los reactivos esenciales se encuentra el medio de cultivo RPMI-1640. Si se desea reducir costos, se puede preparar a partir del concentrado en polvo SIGMA R-4130, añadiendo bicarbonato de sodio. Sin embargo, cuando se trabaja con pocas muestras (20–50), resulta más práctico utilizar el medio listo para usar SIGMA R-5886. Este debe complementarse con aminoácidos no esenciales (SIGMA M-7145) y L-glutamina (SIGMA G-6392).

Para estimular la proliferación linfocitaria, se requiere fitohemaglutinina-M (PHA-M). Puede utilizarse la versión líquida de GIBCO (10576-015) o la presentación liofilizada de SIGMA (L-8902), ambas aptas para cultivos celulares. La reconstitución puede hacerse con agua estéril o medio de cultivo.

El bloqueo de la citocinesis se logra mediante citocalasina B (SIGMA C-6762), un reactivo que debe conservarse a -4 °C. Esta se suministra en forma de polvo liofilizado y puede disolverse en dimetilsulfóxido (DMSO) o directamente en medio de cultivo. Otros reactivos indispensables incluyen metanol y ácido acético, utilizados en proporción 3:1 para preparar el fijador; en este caso, no es necesario que sean de grado analítico. Si al finalizar los lavados celulares, persisten residuos o agregados, estos pueden eliminarse mediante tripsina (SIGMA T-5266). La



solución madre (stock) al 0.05 % se prepara con los siguientes componentes: 0.1 g de tripsina, 1.6 g de NaCl, 0.08 g de KCl, 0.2 g de dextrosa, 0.116 g de NaHCO_3 y 0.04 g de EDTA disódico, todos en calidad de grado reactivo.

Para la tinción de las células, se requiere preparar un buffer de fosfatos utilizando agua estéril, cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) y carbonato de sodio monobásico (NaHCO_3 , Baker 3506-20). En caso de contar con mayor presupuesto, se recomienda utilizar el sistema de coloración rápida Hemacolor (Fisher Scientific 65044/93), que incluye eosina, azul de metileno y un fijador a base de metanol y ácido acético (3:1).

Antes de iniciar el cultivo, es importante verificar la disponibilidad de materiales y consumibles: tubos Vacutainer con heparina sódica (tapa verde, 6 mL), jeringas de 5 mL, agujas y demás insumos necesarios para la extracción de sangre venosa. Para el proceso de siembra, se requieren micropipetas de rangos 0–200 μL , 100–1000 μL y 1–5 mL, con sus respectivas puntas estériles y cajas de esterilización. También se necesitan tubos cónicos de 15 mL para cultivo celular, tubos para centrifuga de fondo redondo (15 mL), pipetas Pasteur, portaobjetos, aceite de inmersión y un microscopio óptico con objetivo de inmersión de 100X.

Procedimiento experimental del CBMN: etapas, evaluación y aplicaciones

Extracción de sangre: Para la implementación del ensayo CBMN, se requiere por tubo por individuo 1 mL sangre venosa completa, idealmente fresca. Se recomienda que la persona donadora esté en ayuno de al menos seis horas. En caso de realizarse una curva dosis-respuesta, se debe calcular la cantidad total de sangre considerando 0.5 mL por cada tubo de cultivo que se necesite. Si se planea utilizar la muestra también para otros análisis (por ejemplo, determinación de metales, biometría hemática u otras pruebas clínicas), es importante ajustar el volumen total requerido en función del número de ensayos previstos.

Antes de la extracción, la jeringa debe heparinizarse con heparina sódica (1000 U), recubriendo homogéneamente las paredes del cilin-

dro para prevenir la coagulación. Alternativamente, pueden emplearse tubos Vacutainer® previamente heparinizados (tapa verde). Es fundamental evitar el uso de anticoagulantes como el EDTA (presente en tubos de tapa lila), ya que este altera la integridad de las membranas celulares, comprometiendo la viabilidad del ensayo de micronúcleos.

La sangre debe mantenerse a temperatura ambiente y utilizarse preferentemente en las primeras horas tras la recolección; sin embargo, puede conservarse hasta máximo de 24 horas. Si es necesario su traslado, se debe evitar el contacto directo con hielo. Se recomienda transportarla en hielera protegidas con paquetes fríos o colchoncillos térmicos y papel periódico, y asegurando la estabilidad de los tubos en una gradilla.

Debe considerarse que, en mujeres, el ciclo menstrual puede afectar la tasa de proliferación linfocitaria. Durante el periodo menstrual, la actividad proliferativa puede disminuir, lo que podría generar resultados confusos o falsamente negativos. Por ello, cuando sea posible, se recomienda priorizar muestras de donadores varones para garantizar mayor estabilidad en los cultivos.

Siembra del cultivo: Para iniciar el cultivo, se requieren tubos cónicos estériles de plástico con tapa rosca tipo Falcon®. La mezcla de cultivo por tubo debe tener el volumen total de 7.0 mL, compuesto por 6.3 mL de medio de cultivo suplementado, 0.2 mL de fitohemaglutinina (PHA) y 0.5 mL de sangre entera.

En caso de que no se disponga de medio ya suplementado, este puede prepararse añadiendo 1 % de L-glutamina y 1 % de aminoácidos no esenciales al medio RPMI-1640. Antes de realizar la suplementación, se recomienda calentar tanto el medio como los suplementos en baño maría a 37 °C para facilitar su homogeneización.

Una vez suplementado el medio, se preparan los tubos de cultivo de acuerdo con el número de muestras sanguíneas disponibles, procurando ajustar las cantidades para evitar desperdicio de reactivos. Cada tubo se prepara con las proporciones indicadas: 6.3 mL de medio suplementado, 0.2 mL de fitohemaglutinina y 0.5 mL de sangre entera, (Fig. 11).

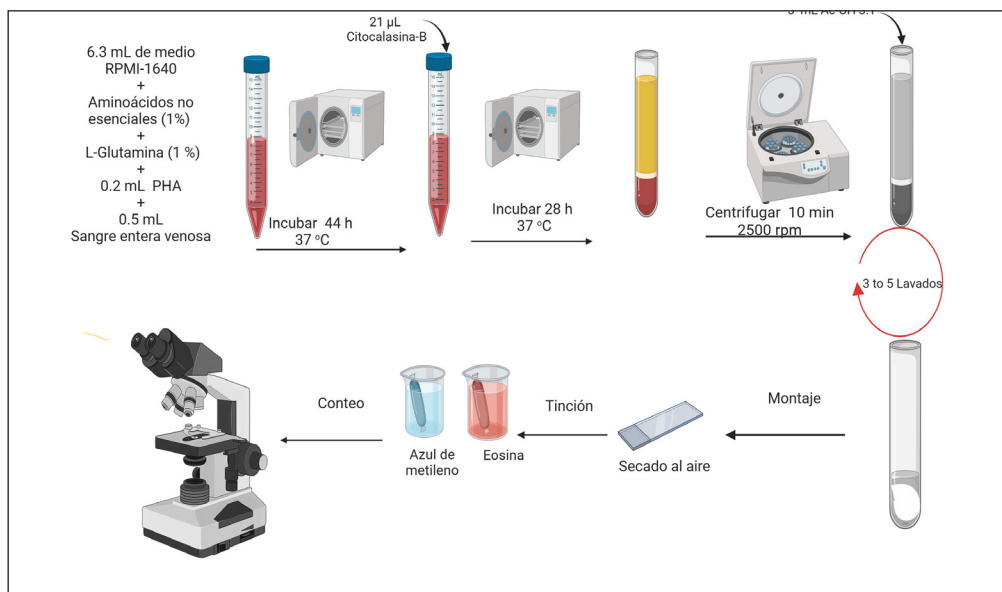


Figura 11. Procedimiento para el ensayo CBMN en linfocitos humanos. La sangre se cultiva con medio RPMI-1640 suplementado, fitohemaglutinina y se incuba 44 h a 37 °C. Luego se añade citocalasina B y se continúa la incubación por 28 h. Las células se centrifugan, fijan con metanol:ácido acético (3:1) y se lavan de 3 a 5 veces. Finalmente, se preparan los frotis, se tiñen con eosina y azul de metileno, y se realiza el conteo al microscopio con el objetivo de 100X. Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, con la ayuda de Biorender®.

Bloqueo de la citocinesis. A las 44 horas de iniciado el cultivo, una vez completada la división nuclear de los linfocitos, se bloquea la citocinesis para conservar los núcleos en un mismo citoplasma. Para ello, se añade citocalasina B a concentración de 3 µL/mL. Dado que cada tubo contiene 7 mL, se agregan 21 µL por tubo, mezclando suavemente para asegurar una distribución homogénea. La citocalasina B inhibe la polimerización de actina, impidiendo la división citoplasmática, debido a su toxicidad, debe manipularse con precaución. Tras la adición, los tubos se incuban 28 horas a 37 °C.

Cosecha celular. La cosecha celular consiste en fijar las células y eliminar restos citoplasmáticos y organelos mediante una solución fría de metanol: ácido acético glacial (3:1). Se recomienda preparar al menos

400 mL de fijador (300 mL de metanol + 100 mL de ácido acético), colocarlo en congelación durante una hora y mantenerlo sobre hielo durante su uso. Los portaobjetos deben mantenerse refrigerados en agua destilada para favorecer la adherencia celular durante el montaje.

Los cultivos se retiran de la incubadora, se colocan dentro de la campana de flujo laminar, y se resuspenden suavemente con una pipeta automática de 1 mL. Luego, se añaden 1 mL de fijador frío por las paredes del tubo, evitando agitación brusca. Se transfiere el contenido a tubos de centrifuga de fondo redondo previamente rotulados. Este paso no requiere condiciones estériles.

Los tubos se centrifugan 10 minutos a 1200 rpm (prefijación). Posteriormente, se elimina el sobrenadante, dejando aproximadamente 2 mL. Se resuspenden las células con fijador fresco, y se repite el lavado por centrifugación entre 3 y 4 veces más. En el último lavado, se deja un pequeño volumen de fijador. Si la muestra aún se ve turbia, se puede utilizar tripsina (0.0012 %) para remover proteínas residuales. Para ello, se resuspende suavemente el botón celular con 1 mL de tripsina, se mezcla cuidadosamente, y se detiene la reacción añadiendo rápidamente fijador. Se realiza una última centrifugación a 1200 rpm por 10 minutos, se retira el sobrenadante y se deja el botón celular (Fenech, 2007).

Preparación de laminillas y tinción

Con una pipeta Pasteur, se resuspende el botón celular y se aplica el contenido sobre un portaobjetos rotulado y frío. La preparación consiste en extender uniformemente las células sobre la superficie del portaobjetos. Las laminillas se colocan en posición horizontal durante 30 minutos para favorecer la adhesión celular, y luego se dejan escurrir en posición inclinada sobre papel absorbente por al menos 24 horas, hasta secarse completamente.

Para la tinción, se utilizan tres vasos de precipitado: uno con eosina, otro con azul de metileno y otro con agua fría. Cada laminilla se sumerge 20 segundos en eosina, se escurre verticalmente sobre una toalla absorbente, y se transfiere de inmediato al azul de metileno por otros 20 segundos. Finalmente, se enjuaga suavemente con agua fría y se deja secar al ambiente. Las laminillas están entonces listas para su observación



al microscopio óptico.

Observación de las laminillas

La observación se realiza con un microscopio óptico compuesto. Se inicia con el objetivo de 20X para enfocar y localizar la muestra, y luego se aplica aceite de inmersión para emplear el objetivo de 100X, con el que se realiza el análisis detallado.

Los principales registros incluyen el conteo de células mono-, bi-, tri- y multinucleadas, con el fin de calcular el índice de duplicación celular (NDI), evaluando al menos 500 células viables. Además, se cuantifican células en necrosis y apoptosis como indicadores de citotoxicidad.

Para la evaluación de genotoxicidad, se identifican células mononucleadas con MNi y NBuds, los cuales reflejan daño al ADN que ocurrió antes del cultivo, en médula ósea. También se analizan al menos 1,000 células binucleadas para registrar la frecuencia de MNi, NBuds y NPB, así como la presencia simultánea de dos o más anomalías nucleares en una misma célula. Estos datos permiten estimar el grado de inestabilidad genómica inducido por la exposición a agentes citotóxicos o genotóxicos (Fig. 12).

Los criterios de conteo fueron establecidos por Fenech y colaboradores, quienes desarrollaron una guía fotográfica detallada que documenta con precisión las anomalías citológicas observables en linfocitos mediante microscopía óptica con objetivo de inmersión de 100X (Bonassi et al., 2001; Fenech et al., 2003a; 2003b).

Según los protocolos del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (Fenech, 2007; Kirsch-Volders et al., 2018), los valores de referencia de los biomarcadores varían en función de diversos factores, como las condiciones del cultivo, el tipo y grado de exposición a agentes genotóxicos o citotóxicos, el potencial micronucleogénico del compuesto, la composición del medio y las características del donante (edad, sexo y antecedentes genéticos).

En linfocitos humanos cultivados en condiciones óptimas, los rangos de referencia para biomarcadores de citotoxicidad son: 30–60 % de células binucleadas, índice de duplicación nuclear (NDI) entre 1.3 y 2.3, necrosis entre 0–9 %, y apoptosis entre 0–7 %. Para biomarcadores de

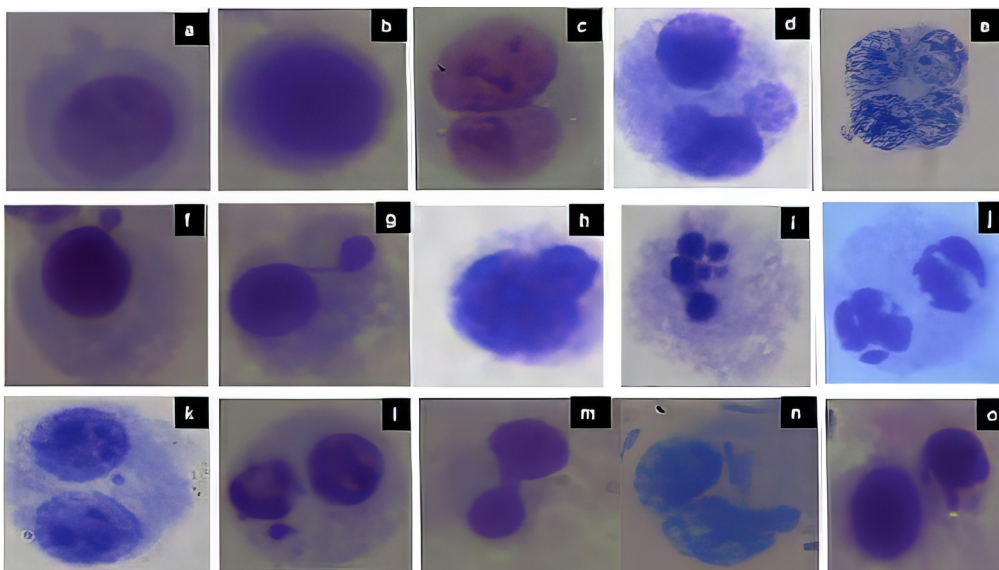


Figura 12. Linfocitos humanos analizados mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN). a-b) células mononucleadas; c) binucleada; d) trinucleada; e) tetranucleada; f) mononucleada con micronúcleo (MNi); g-h) mononucleadas con brote nuclear (NBud); i) célula en necrosis; j) célula en apoptosis; k-l) binucleadas con micronúcleo; m) binucleada con puente nucleoplásmico (NPB); n) binucleada con NBud; o) binucleada con micronúcleo y NBud. Observadas con microscopio compuesto Carl Zeiss, objetivo de inmersión 100X. Tinción con eosina y azul de metileno Cortesía del Dr. Balam Ruiz Ruiz y del Dr. Francisco Casillas.

genotoxicidad, se esperan 0-30 micronúcleos, 0-10 puente nucleoplásmico (NPB) y 0-5 brote nuclear (NBuds) por cada 1000 células binucleadas (Fenech, 2007; Thomas et al., 2009).

Aplicaciones del ensayo citogenético para la detección de CBMN

A casi cuatro décadas de su desarrollo, la técnica del ensayo de CBMN continúa vigente y ampliamente utilizada en numerosos campos de la investigación biomédica, ambiental y toxicológica. Esta metodología está consolidada como una herramienta confiable para estudios de biomonitorio en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos, tanto en entornos ambientales como laborales. Particularmente, ha sido empleada para evaluar la exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas y co-

munidades aledañas (Arellano-García et al., 2012; Bolognesi y Holland, 2016; Montaña-Soto et al., 2014; Ruiz-Ruiz et al., 2023).

Asimismo, existe amplia evidencia científica que respalda el uso del ensayo CBMN en el monitoreo de enfermedades crónico-degenerativas, particularmente en diversos tipos de cáncer (Arbogast y Gros, 2018; Kirsch-Volders et al., 2006), así como en estudios que analizan los efectos genotóxicos asociados al estilo de vida, incluyendo la dieta, la actividad física y el uso de suplementos nutricionales (Fenech, 2001; Fenech y Bonassi, 2011; Umegaki et al., 1998).

La técnica también se aplica de forma consistente en la evaluación de fármacos y agentes genotóxicos reconocidos, como la radiación ionizante y diversos compuestos químicos de uso médico e industrial (Fenech y Morley, 1986; Kim et al., 1997, 2003; Ostrosky-Wegman et al., 1991; Surrallés et al., 1995; Vijaya et al., 2014). En años recientes, el ensayo CBMN ha cobrado relevancia como un método sensible para el estudio de la citogenotoxicidad inducida por nanomateriales, incluyendo nanopartículas metálicas y poliméricas (Ruiz-Ruiz et al., 2020; Todorova et al., 2020; Vergallo et al., 2014; Zhornik et al., 2014).

Incluso esta técnica también se aplica exitosamente en otros vertebrados como bovinos, caprinos, perros, roedores y cerdos; la variabilidad entre especies refleja diferencias fisiológicas, metabólicas y experimentales, relevantes para la selección de modelos bioindicadores en estudios de citogenotoxicidad. Estos modelos animales ofrecen un campo amplio de aplicación tanto en biomonitoreo ambiental como en estudios farmacológicos y toxicológicos experimentales, lo que amplía el espectro de acción del CBMN en diversos contextos científicos (Figura 13).

El conocimiento de los niveles basales de micronúcleos (MNi) en distintas especies animales resulta esencial para la correcta interpretación de estudios de citogenotoxicidad, ya que permite establecer umbrales de referencia frente a los cuales comparar la respuesta a distintos agentes tóxicos. Como se observa en la figura 13, existe variabilidad significativa entre especies, atribuible a factores fisiológicos, metabólicos, edad, sexo, estado inmunológico y condiciones específicas del cultivo celular. Estas diferencias deben ser consideradas al seleccionar modelos

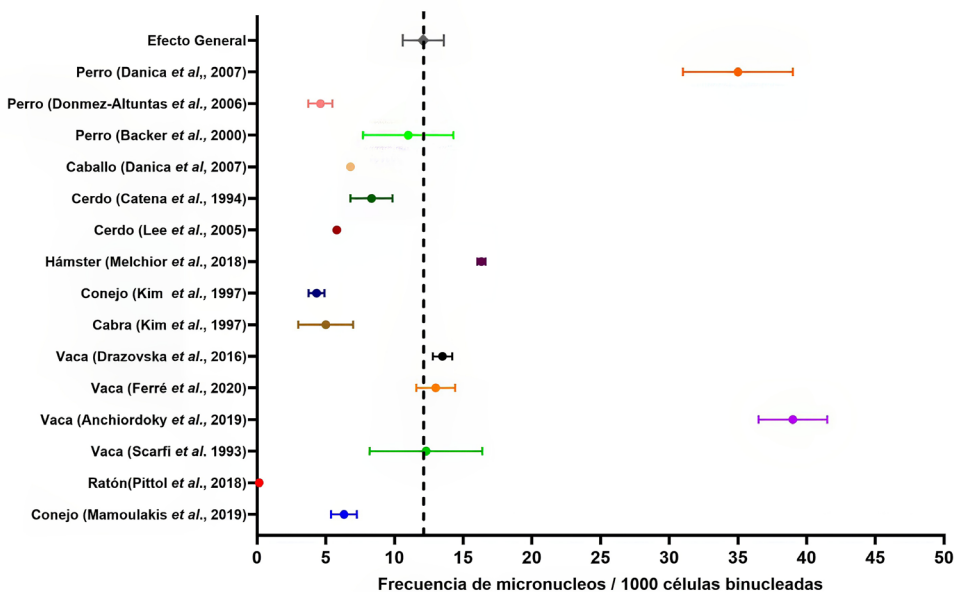


Figura 13. Frecuencia basal de micronúcleos (MNi) en células binucleadas de distintas especies animales, evaluada mediante el ensayo CBMN. Los valores se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar (Danica et al., 2007; Dönmez-Altuntas et al., 2006; Backer et al., 2000; Catena et al., 1994; Lee et al., 2005; Melchior et al., 2018; Kim, et al., 1997; Drážovská et al., 2016; Ferré et al., 2020; Anchidorky et al., 2019 Scarfi et al., 1993; Pittol et al., 2018; Mamoulakis et al., 2019). Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García.

animales para estudios experimentales o biomonitoreos, ya que una línea base elevada podría enmascarar efectos leves, mientras que un nivel basal bajo permitiría una detección más sensible de alteraciones inducidas por exposición. Por ello, describir los valores de referencia por especie, bajo condiciones controladas, representa un paso crucial en la estandarización y validez de los resultados obtenidos con el ensayo CBMN.

Entonces, el ensayo de CBMN es una herramienta estratégica en la evaluación de riesgos asociados con la exposición a agentes genotóxicos en ambientes agrícolas, clínicos y alimentarios. Su capacidad para detectar daño genético en células somáticas lo convierte en un método sensi-

ble y de amplio alcance para monitorear la presencia de contaminantes en alimentos, agua, aire o medicamentos de uso veterinario. Al establecer niveles basales de referencia por especie, el ensayo puede aplicarse de manera robusta en la vigilancia sanitaria, con el fin de asegurar la inocuidad de productos de origen animal, evaluar las condiciones de exposición ocupacional en trabajadores del sector agroalimentario y fomentar estrategias integradas en salud humana y animal dentro del enfoque de Una Salud (*One Health*).

Potencial del ensayo CBMN en humanos y animales: Reflexión final

El ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica es una metodología altamente estandarizada, eficaz y de uso extendido para evaluar la inestabilidad genómica y la citotoxicidad en múltiples contextos. Al igual que otros ensayos de micronúcleos, presenta ventajas relevantes: es relativamente rápido, de bajo costo y no requiere de equipo sofisticado ni de reactivos difíciles de adquirir. Esta técnica ha demostrado ser aplicable tanto en seres humanos como en diversos modelos animales, incluidos perros, bovinos, equinos, caprinos y porcinos.

Su versatilidad permite que el límite sea la creatividad del investigador, al diseñar experimentos para evaluar el potencial citogenotóxico de compuestos químicos, mezclas complejas, nanomateriales, fármacos, así como distintos agentes físicos o químicos. La principal desventaja de esta metodología radica en la necesidad de analizar al microscopio gran cantidad de células —al menos mil por muestra— y registrar detalladamente diversas anomalías nucleares, lo cual implica una inversión considerable de tiempo y esfuerzo. No obstante, esta exigencia se ve compensada por la riqueza interpretativa de los hallazgos, que permiten comprender procesos biológicos profundos relacionados con el daño y la reparación del ADN, así como con la dinámica proliferativa y de muerte celular. Por ello, el CBMN continúa siendo una herramienta invaluable en el estudio de la genotoxicidad y la citotoxicidad en salud humana, veterinaria y ambiental.

CAPÍTULO IV

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS Y ANORMALIDADES NUCLEARES EN EPITELIO DE LA MUCOSA ORAL

Orígenes y evolución del ensayo en mucosa oral

En 1980, Stich y colaboradores desarrollaron un protocolo para el ensayo de micronúcleos en células epiteliales exfoliadas de la mucosa oral, con el propósito de evaluar la exposición a estresores celulares vinculados con ocupaciones de riesgo y estilos de vida (Stich, 1982). Desde entonces, se ha posicionado como una de las más empleadas como para la detección de daño genético en poblaciones humanas (Fig. 14). Su uso se ha ampliado a otras mucosas — nasal, cervical, vesical, esofágica y bronquial —, aunque estas variantes, a pesar de compartir objetivos y metodología, aún no han alcanzado el mismo grado de aceptación (Nersesyan et al., 2006; Sommer et al., 2020).

Ventajas técnicas y biológicas del modelo oral

El incremento en la publicación de estudios que emplean la mucosa bucal como modelo se atribuye a sus características técnicas: sensibilidad del 94 %, especificidad del 100 % y precisión del 95 % (Bonassi et al., 2011; Benvindo-Souza et al., 2017; Palve et al., 2008). Permite la evaluación simultánea de otros biomarcadores toxicológicos, además de la frecuencia de células micronucleadas, también la de diversas anomalías nucleares. Sin duda, se trata de una técnica con múltiples ventajas: resulta relativamente económica, la obtención de muestras es

mínimamente invasiva e indolora, el procesamiento y análisis son sencillos, y los resultados pueden obtenerse en plazos relativamente cortos (Sommer et al., 2020; Torres-Bugarín et al., 2024).

Es factible aplicar la prueba de micronúcleos en cualquier vertebrado; sin embargo, aproximadamente el 1% de los estudios descritos se centran en diferentes organismos y el resto en poblaciones humanas (Benvindo-Souza et al., 2017). De este modo, la aplicación de la prueba de micronúcleos y otras anormalidades nucleares en mucosas ya es una herramienta básica para evaluar el daño al material genético inducido por contaminantes ambientales, metales pesados u otros agentes genotóxicos. En este sentido, su utilidad está documentada ampliamente en contextos de vigilancia en poblaciones con alto riesgo por exposición ocupacional, biomonitoreo de carcinógenos ambientales o terapéuticos (como fármacos antineoplásicos o vacunas), así como en estudios de pronóstico terapéutico, evaluación del estrés nutricional, estilos de vida, práctica deportiva, consumo de sustancias psicoactivas, estados patológicos y también en individuos sanos, en los que se exploró su asociación con riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos o procesos de envejecimiento, entre otros.

Esta técnica cobra relevancia especial en el contexto actual, donde se reconoce el valor de los biomarcadores como herramientas eficaces para monitorear poblaciones y detectar tempranamente a individuos con mayor susceptibilidad al cáncer. Esto es especialmente importante si se considera que más del 90 % de los cánceres humanos son de origen epitelial (Cairns et al., 1975; Sommer et al., 2020). En este sentido, la frecuencia de micronúcleos y de otras anormalidades nucleares puede interpretarse como un “dosímetro interno”, útil para estimar el daño cromosómico, identificar inestabilidad genómica, evaluar genotoxicidad y citotoxicidad, así como procesos de proliferación y muerte celular (Benvindo-Souza *et al.*, 2017).

La cavidad oral representa una zona particularmente vulnerable a múltiples agentes exógenos, ya sea por contacto directo, inhalación o ingestión. Con frecuencia, su mucosa refleja alteraciones indicativas del estado de salud, al evidenciar condiciones sistémicas, deficiencias nutricionales, efectos adversos de fármacos e incluso manifestaciones

asociadas al consumo de sustancias psicoactivas, muchas de las cuales constituyen problemas relevantes de salud pública.

El epitelio de la mucosa oral es de origen ectodérmico, está compuesto por queratinocitos planos no queratinizados dispuestos en capas. Su función como barrera primaria y su alta tasa de renovación celular, lo convierten en un tejido centinela, por ello es idóneo para la aplicación del ensayo de micronúcleos y anormalidades nucleares en estudios toxicológicos y epidemiológicos, especialmente en poblaciones vulnerables (Torres-Bugarin et al., 2013b; Holland et al., 2008; Tolbert et al., 1991).

Consideraciones morfológicas y funcionales del epitelio oral

Entre las principales ventajas de este modelo destacan diversas consideraciones biológicas y metodológicas. En primer lugar, su ubicación anatómica lo mantiene expuesto de manera constante a agentes potencialmente nocivos, como compuestos químicos ambientales, productos del tabaco, alcohol o contaminantes alimentarios, lo que permite detectar directamente el daño genético inducido por estas sustancias. Además, dado que la mucosa oral comparte irrigación con el sistema circulatorio, las células epiteliales pueden reflejar los efectos de genotóxicos sistémicos presentes en el torrente sanguíneo, lo que refuerza su valor como biomonitor celular.

El epitelio bucal presenta elevada tasa mitótica, lo que favorece la rápida expresión de eventos genotóxicos o citotóxicos. No obstante, esta alta proliferación también lo hace vulnerable a daños irreversibles en el ADN que, en caso de no ser reparados, pueden transmitirse a las células hijas. Este aspecto cobra especial relevancia al considerar que aproximadamente el 90 % de los cánceres humanos tienen origen epitelial. Por otra parte, los queratinocitos presentan un tamaño relativamente grande, citoplasma amplio y núcleo de contorno regular, lo que facilita su identificación y análisis microscópico.

Cabe destacar que la obtención de muestras mediante el raspado suave de la mucosa oral es un procedimiento sencillo, mínimamente invasivo e indoloro, lo que lo hace ideal para estudios en niños, adultos mayores o personas con condiciones bucales sensibles. Además, esta

técnica permite recolectar suficiente número de células exfoliadas para realizar análisis con el poder estadístico necesario, lo que la convierte en una herramienta robusta para estudios poblacionales.

Biomarcadores evaluables y su interpretación citogenotóxica

Entonces, el epitelio bucal, al tratarse de un tejido no queratinizado, facilita la penetración de los colorantes durante la tinción, lo que mejora significativamente la resolución del análisis microscópico y permite la visualización clara tanto del núcleo como de los contornos de la membrana celular. Esta propiedad técnica contribuye a la mayor precisión en la identificación de alteraciones morfológicas celulares asociadas con daño genético. La proliferación de los queratinocitos ocurre en la capa basal del epitelio de ahí migran a la superficie, y la presencia de micronúcleos o alteraciones nucleares, indica daño al ADN que no fue reparado.

Es así que paralelamente, las anormalidades nucleares —como células binucleadas (CBN), kariólisis (CL), núcleos picnóticos (PN), kariorréxicos (CR), núcleos lobulados (NL), cromatina condensada (CC)—; aportan información valiosa sobre alteraciones en procesos celulares clave, ya que son consecuencia de la proliferación desregulada, alteraciones en la citocinesis, muerte celular programada y disfunción mitótica; signos de citotoxicidad y daño genético, incluso antes de la aparición de síntomas clínicos. Estos cambios los describió por primera vez Stich y Rosin en la década de 1980 (Stich y Rosin, 1983; Stich et al., 1982; Sommer et al., 2020). Posteriormente, se asociaron a diferentes disturbios celulares como por ejemplo la CBN como producto de errores en la citocinesis; NL al igual que los MN, reflejan daño al ADN e inestabilidad genómica, las PN, CR, CC y CL, se consideran indicadores de muerte celular por apoptosis o necrosis (Sarto, et al., 1987; Tolbert et al., 1992; Torres-Bugarín et al., 2013a, 2013b, 2014, 2024).

Farhadi propuso utilizar el índice de reparación celular (IR), calculado mediante la fórmula: $IR = (CL + CR) / (MN + NL)$, como un posible marcador de la capacidad homeostática del epitelio frente a agresiones genotóxicas (Farhadi et al., 2017). No obstante, este parámetro aún carece de validación suficiente, y persisten dudas sobre su confiabilidad

como indicador efectivo de los mecanismos reales de reparación celular (Amini, 2023; Nersesyan et al., 2019).

Utilidad del modelo oral como herramienta de vigilancia genética

Gracias a su capacidad de evaluar múltiples procesos celulares de manera simultánea, la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en mucosa oral se considera una de las técnicas de biomonitoreo más útiles y versátiles a nivel mundial, como se resume en el cuadro 1. Como se aprecia en dicho cuadro, la prueba de micronúcleos en mucosa oral se ha aplicado exitosamente en poblaciones con ocupaciones de riesgo, en contextos clínicos y en individuos aparentemente sanos, lo que evidencia su valor como herramienta sensible de biomonitoreo genético. Los valores promedio de células micronucleadas y otras anormalidades nucleares varían según el tipo de exposición, el estado fisiopatológico o el uso de determinadas sustancias, como se observa en casos de exposición ocupacional (bomberos, tragafuegos), en fisicoculturistas que consumen esteroides anabólicos, o en mujeres con diagnóstico de cáncer de mama o displasia epitelial. Esta variabilidad refuerza la utilidad del modelo epitelial oral para detectar alteraciones tempranas asociadas con genotoxicidad, citotoxicidad y riesgo potencial de transformación maligna.

Características del epitelio oral

El epitelio oral está formado por células adyacentes unidas estrechamente entre sí, sin sustancia intercelular aparente. Al igual que otros epitelios, se caracteriza por ser un tejido avascular, sin embargo, en este caso es estratificado, no queratinizado. Generalmente, se describen cuatro estratos, considerando a la membrana basal como el primero de ellos (Figura 14). Desde la región más profunda hasta la superficie apical, el primer estrato corresponde a la membrana basal, una estructura extracelular que brinda soporte físico, inmunológico y nutricional al epitelio. Está compuesta por dos láminas: la lámina lúcida, secretada por las células epiteliales, y la lámina densa, producida por el tejido conectivo subyacente. Además de actuar como barrera funcional que separa el epitelio del tejido conectivo, esta membrana participa en la



Población (n)	Genotoxicidad		Citotoxicidad					Ref
	Daño al ADN		DC		Muerte celular			
	CMN	NL	BN	PN	CC	CR	CL	
Personas Sanas %	0.7	1.3	3.04	4.3	-	2.2	-	1
Control (13)	1.1 ± 0.9	0.7±0.8	2.7±1.7	0.7± 1.4	1.3±1.6	0.1±0.1	0	2
Tragafuegos (8)	0.8 ± 0.7	0.8±0.9	4.2±2.3*	1.1±0.7*	2.4±2.9*	0.4±0.6	0	
Control (40)	1.2 ± 0.1	1.7±0.2	-	-	-	6.4±0.7	21.5 ± 2.2	3
Bomberos (47)	3.9 ± 0.1*	5.6±0.4*	-	-	-	24.1±1.4*	152.6±10.1*	
Control (45)	0.07± 0.1	0.7±1.2	0.4±0.5	-	-	0.8±0.9	-	4
Recolectores (44)	0.5 ± 0.8*	1±1.2	2.5±2.8*	-	-	4.4±2.9*	-	
Control (60)	2.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1	-	-	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	5
Pintores (60)	5.5 ± 0.1*	5.7 ± 0.4*	7.1 ± 0.3*	-	-	6.9 ± 0.4*	7.2 ± 0.3*	
Control (25)	1.6	-	3.8	2.9	2.5	-	-	6
Ataxia tipo 2 (24)	3.4*	-	3.2	3.9	2.7	-	-	
Fisiculturistas Preanabólicos (5)	1.1 ± 0.1	-	-	-	-	-	-	7
Fisiculturistas + anabólicos (5)	5.9 ± 2.4*	-	-	-	-	-	-	
Mujeres sanas (20)	0.7 ± 0.3	0.5±0.3	3.7±1.3	-	4.1±1.9		2.8 ± 2.0	8
Ca. Mama (21)	1.4 ± 0.6*	1.6±1.0*	6.2±2.5*	-	7.2±2.2*		5.1 ± 3.2*	
Controles (30)	1.4 ± 0.51	-	-	-	-		-	9
DE (15)	4 ± 1.19	-	-	-	-		-	
Ca oral (15)	11.9 ± 1.8*	-	-	-	-		-	



regulación de la mitosis de las células basales, lo cual resulta esencial para mantener la integridad tisular y limitar la progresión de procesos metastásicos.

El siguiente estrato, conocido como basal o germinativo, está constituido por una sola capa de células firmemente adheridas a la membrana basal. Estas células son más pequeñas que las del resto del epitelio, presentan forma redondeada o cúbica, núcleos redondos u ovalados y un citoplasma intensamente basófilo, reflejo de su elevada actividad biosintética asociada con la abundancia de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas. En los epitelios estratificados, esta es la única capa con capacidad mitótica. Las células basales funcionan como células madre o progenitoras, con la capacidad de diferenciarse y regenerar de forma continua el epitelio.

A medida que migran hacia la superficie, algunas células ingresan al estrato espinoso, donde inician un proceso de diferenciación. Los queratinocitos se organizan en múltiples hileras, con membranas de forma hexagonal y una estructura intracelular más compleja. Sus núcleos son pequeños y redondos, y el citoplasma puede volverse vacuolado y basófilo. Este estrato se distingue por la presencia de tonofibrillas, que al microscopio óptico aparentan atravesar los espacios intercelulares.

Finalmente, las células alcanzan el estrato granuloso, donde completan su diferenciación terminal. En epitelios no queratinizados como el oral, esta capa puede estar poco desarrollada o ausente. Las células se aplanan, adquieren morfología escamosa y presentan núcleos pequeños. El citoplasma contiene gránulos de queratohialina con fuerte afinidad basófila. En comparación con las capas basal y espinosa, esta capa

← Cuadro I. Células micronucleadas y anormalidades nucleares en mucosa oral. Valores expresados en 1000 células; Media y desviación estándar; Ca oral: Carcinoma escamoso oral; DE: Displasia epitelial; DC: Daño a la citocinesis CMN: Célula micronucleada; NL: núcleo lobulado; BN: binucleada; PN: Picnosis; CC: Cromatina condensada; CR: Cariorrexis; CL: Cariólisis; (-) sin dato; * Diferencia estadística ($p < 0.05$). 1) Bonassi et al., 2011; 2) Torres et al., 1998; 3) Ray et al., 2005; 4) Brina et al., 2018; 5) Celik, et la., 2010, 6) Cuello-Almarales et al., 2017; 7) Torres et al., 2007; 8) Flores et al., 2014; 9) Kiran et al., 2018.



posee mayor cantidad de tonofilamentos de queratina en un estado más avanzado de fosforilación.

En la capa granulosa comienza la degeneración del núcleo y de otros organelos, lo que marca el inicio del proceso de muerte celular que conduce a la formación del estrato córneo. No obstante, en la mucosa oral este no constituye un estrato córneo verdadero. Aquí, las células se desprenden individualmente y no forman una barrera impermeable queratinizada, a diferencia del epitelio cutáneo. Sin embargo, puede desarrollarse un estrato paraqueratinizado como respuesta adaptativa al daño celular o a procesos patológicos. En estas condiciones, las células superficiales son aplanadas y aparentemente normales, pero conservan su núcleo y carecen de citoplasma acidófilo, lo que indica fase avanzada de muerte celular (Bolognesi et al., 2013).

Criterios para identificar células micronucleadas y anormalidades nucleares

En el biomonitoreo, es fundamental estandarizar los procedimientos de toma, procesamiento y análisis de células exfoliadas. Por ello,

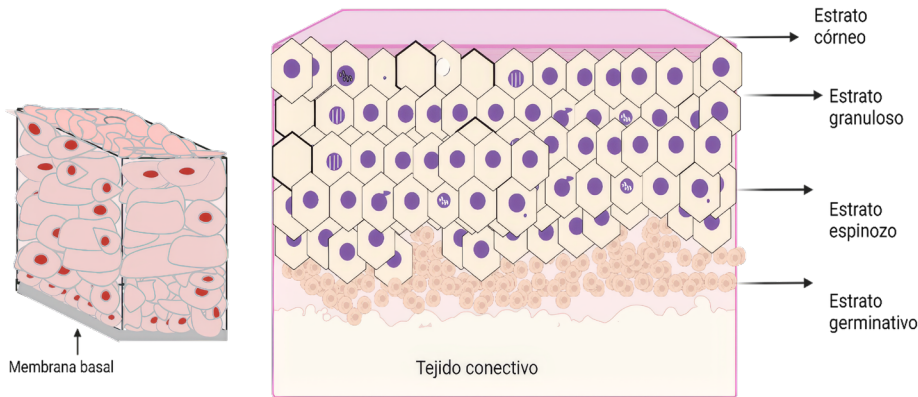


Figura 14. Epitelio oral: epitelio plano estratificado no queratinizado. Las células micronucleadas y con anormalidades nucleares se originan en el estrato germinativo, única capa con actividad mitótica. Las células exfoliadas analizadas provienen de las capas superficiales. Imagen modificada de Bolognesi et al. (2013). Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, *con la ayuda de Biorender®*.

diversos estudios internacionales han propuesto criterios uniformes para garantizar la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados (Bonassi et al., 2009; Bolognesi et al., 2015; Rohr et al., 2020).

Actualmente, se reconoce que la proporción de células basales y de células en muerte celular constituye un indicador relevante de la capacidad regenerativa y del potencial proliferativo del epitelio oral. Asimismo, existen criterios morfológicos para identificar distintos tipos celulares y alteraciones nucleares, entre los que se incluyen células basales, diferenciadas normales y micronucleadas (CMN) (Fig. 15b). También están descritas con precisión otras anomalías, como NL (Fig. 15c), BN (Fig. 15d), CR (Fig. 16a), CC (Fig. 16b), PN (Fig. 16c) y CL (Fig. 16d) (Bolognesi et al., 2013; Sarto et al., 1987; Thomas et al., 2009; Tolbert et al., 1992).

Las células basales no diferenciadas (CB): son propias del estrato basal, donde se localizan las células madre del epitelio. No deberían estar presentes en el estrato superficial, por lo que su detección en muestras exfoliadas se considera anómala. Se caracterizan por su forma redonda,

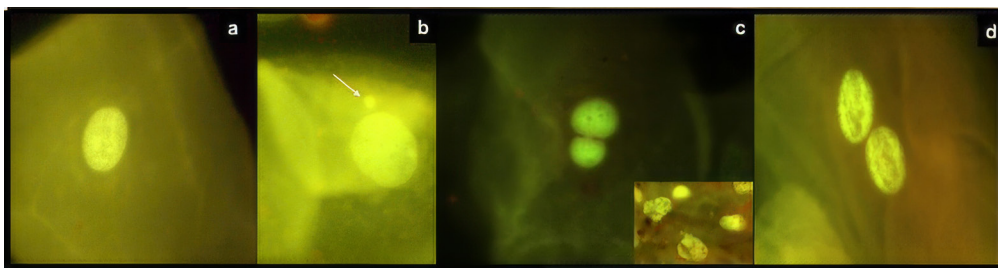


Figura 15. Células epiteliales exfoliadas de mucosa oral. **a)** Célula normal: completamente diferenciada, de gran tamaño, con núcleo bien definido, ovalado y de tinción uniforme; **b)** Célula micronucleada: presenta un núcleo principal y una o más estructuras menores (micronúcleos), cuyo tamaño oscila entre 1/3 y 1/6 del núcleo principal. Los micronúcleos muestran intensidad de tinción, textura y plano focal similares al núcleo, sin superposición ni conexión aparente; **c)** Célula con núcleo lobulado (“huevo roto”): presenta una constricción sin pérdida de continuidad; la intensidad de tinción entre los lóbulos es homogénea; **d)** Célula binucleada: contiene dos núcleos de morfología, tamaño, tinción y plano focal similares, generalmente en contacto, producto de alteración en la citocinesis. Microscopía de fluorescencia con naranja de acridina. Observación a 100× con microscopio compuesto Carl Zeiss IVFL Axiostar Plus, filtros de excitación de 450–490 nm. Cortesía de la Dra. en C. Olivia Torres Bugarín.

pequeño tamaño y un núcleo que ocupa casi todo el citoplasma. En algunos casos, presentan micronúcleos o núcleos lobulados. Su presencia se interpreta como un indicio de actividad proliferativa elevada o regeneración epitelial atípica.

Las células diferenciadas normales (Figura 15a) exhiben un citoplasma de tamaño habitual, morfología casi hexagonal y ausencia de alteraciones nucleares visibles. Representan el tipo celular predominante en el epitelio oral sano.

Las células micronucleadas (CMN) (Fig. 15b) se originan durante la mitosis de las células basales como resultado de errores en la segregación cromosómica. Presentan un núcleo principal acompañado de uno o más micronúcleos, estructuras redondas u ovaladas con un tamaño inferior al 20 % del diámetro nuclear. Para ser considerados micronúcleos verdaderos, deben cumplir criterios específicos: contorno liso y definido, mismo plano focal, textura, intensidad de coloración y refracción similares al núcleo principal; además, no deben estar conectados a este ni mostrar superposición o puentes de cromatina. Es importante no confundir con células en apoptosis avanzada, como aquellas con CC, CR o PN.

En sujetos sanos no expuestos a agentes genotóxicos, la frecuencia basal de células micronucleadas se encuentra generalmente en un rango de 0.3 a 1.7 por cada 1000 células evaluadas. Las células con múltiples micronúcleos son poco comunes en individuos sanos, aunque pueden presentarse ocasionalmente. Mayor frecuencia de micronúcleos refleja incremento en la tasa de mutación, lo cual se asocia con el desarrollo de lesiones precancerosas y carcinomas orales.

Las células con núcleos lobulados (NL), también denominadas brotes nucleares o gemas nucleares (NBuds) (Figura 15c), se consideran por algunos autores como indicadores de amplificación génica. Presentan uno o más cuerpos nucleares conectados al núcleo principal mediante un delgado puente nucleoplásmico. Estas estructuras accesorias muestran características similares al núcleo principal en cuanto a tinción, textura y plano focal. En casos poco frecuentes, los NL alcanzan tamaño cercano al del núcleo principal. Tolbert et al. (1992), se refirieron a los NBuds de mayor tamaño como “huevos rotos” (broken egg), aunque su

origen exacto aún no es dilucidado completamente.

Las células binucleadas (BN) (Figura 15d) presentan dos núcleos bien definidos, independientes, con forma, tamaño, textura e intensidad de tinción similares. Suelen encontrarse muy próximas, e incluso en contacto. Se considera que estas células resultan de la falla en la citocinesis, donde el núcleo se divide correctamente, pero no ocurre la separación citoplasmática. Este error se vincula con alteraciones en el ensamblaje o función del anillo contráctil de actina. La no disyunción cromosómica está documentada con mayor frecuencia en células binucleadas que no completan la citocinesis, en comparación con aquellas que se dividen en dos células mononucleadas. En células epiteliales con disfunción telomérica, este tipo de error puede inducir tetraploidía, especialmente cuando persisten puentes anafásicos. Además, en individuos con condiciones genéticas asociadas a alta tasa de aneuploidía, como el síndrome de Down, presentan el doble de frecuencia de células binucleadas que en individuos sanos.

Las células con cariorrexis (CR) (Figura 16a) se identifican por la fragmentación nuclear extensa, en la cual la membrana nuclear puede observarse rota o ausente. El patrón de tinción es densamente moteado, y refleja la desintegración progresiva del núcleo, característica de las fases finales del proceso apoptótico.

Las células con cromatina condensada (CC) (Figura 16b) se caracterizan por un núcleo intensamente teñido, con un patrón moteado o con estrías, y una membrana nuclear aparentemente intacta. La CC indica pérdida de actividad transcripcional y se asocia con procesos apoptóticos tempranos.

Las células picnóticas (PN) (Figura 16c) son células diferenciadas terminales con morfología aplanada y angular, cuyo núcleo, más pequeño de lo normal, presenta una tinción intensa y homogénea. El diámetro nuclear suele estar entre $1/5$ y $2/3$ del tamaño de un núcleo típico de célula terminal diferenciada. La picnosis representa una condensación extrema de la cromatina en células que atraviesan una fase irreversible de apoptosis, y suele considerarse una etapa posterior a la cariorrexis (CR). Aunque el mecanismo exacto de formación de las PN en epitelio oral

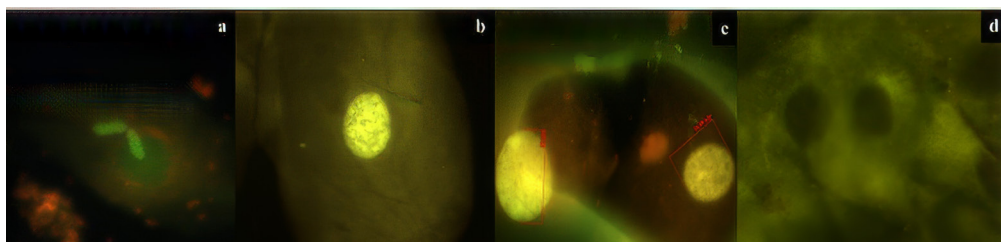


Figura 16. Células epiteliales exfoliadas de mucosa oral, representativas de anomalías nucleares asociadas con citotoxicidad y muerte celular. a) cariorrexis: el núcleo y la membrana aparecen fragmentados, con un patrón que recuerda a un rompecabezas cuyas piezas están dispersas; es indicativa de apoptosis en fase avanzada; b) cromatina condensada: el núcleo presenta agregados de cromatina intensamente teñidos, con membrana nuclear bien definida; refleja pérdida de actividad transcripcional. c) Núcleo picnótico: el núcleo es más pequeño que el normal y muestra tinción intensa y uniforme, típico de apoptosis irreversible; d) cariólisis: pérdida de material genético, con aspecto de núcleo fantasma, asociado a la fase terminal de muerte celular, especialmente por necrosis. Tinción con naranja de acridina. Observación a 100× con microscopio Carl Zeiss IVFL Axiostar Plus, filtros de fluorescencia de 450–490 nm. Cortesía de la Dra. en C. Olivia Torres Bugarín.

no está completamente esclarecido, su alta frecuencia ha mostrado correlación positiva con la de células CC y CR, lo que respalda su valor como biomarcador de muerte celular.

Las células cariolíticas (CL), también conocidas como “células fantasma” (Figura 16d), se observan principalmente en la capa apical del epitelio. Se caracterizan por presentar un núcleo ausente o de tinción negativa, lo que da la apariencia de una imagen desvanecida o transparente. Esta alteración se considera la etapa final del proceso necrótico o apoptótico. Aunque puede tener un origen fisiológico vinculado al desgaste epitelial por fricción masticatoria, su frecuencia se incrementa significativamente ante la presencia de agentes citotóxicos. Por ello, se reconoce como un biomarcador de citotoxicidad, especialmente útil para evaluar el impacto crónico de factores ambientales como el alcohol, el tabaco o la exposición continua a irritantes químicos (Ramírez y Saldanha, 2002; Tolbert et al., 1991).

Micronúcleos como factor predictivo de la carcinogénesis oral

El cáncer es una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. En particular, el cáncer oral se encuentra entre los diez tipos más comunes, y dentro de este grupo, el carcinoma oral de células escamosas es la neoplasia maligna más frecuente. Esta puede originarse de manera directa o estar precedida por lesiones benignas o por condiciones clínicas denominadas trastornos potencialmente malignos. Entre estos trastornos se incluyen la leucoplasia, la fibrosis submucosa oral y el liquen plano, los cuales presentan un riesgo de transformación maligna estimado entre el 6.6 % y el 36.4 %. Dada la variabilidad en su evolución clínica, resulta difícil predecir el comportamiento biológico de estas lesiones. Además, el diagnóstico tardío limita significativamente el éxito terapéutico y reduce las probabilidades de un pronóstico favorable. Por ello, es de vital importancia contar con biomarcadores que permitan no solo identificar a los individuos con mayor riesgo, sino también predecir si un trastorno potencialmente maligno podría evolucionar hacia un tumor agresivo (Juneja et al., 2019; Jois et al., 2010; Messadi et al., 2013).

En este contexto, el ensayo de micronúcleos se perfila como una herramienta prometedora para su uso como biomarcador temprano de inestabilidad genómica. Dado que los micronúcleos son consecuencia de la pérdida de cromosomas o del mal funcionamiento del huso mitótico durante la división celular, su presencia puede reflejar alteraciones citogenéticas tempranas características de los procesos de transformación maligna (Kashyap et al., 2012).

Aproximadamente la mitad de los casos de cáncer oral están asociados con la transformación maligna que incluye la pérdida de la capacidad celular para activar mecanismos de muerte programada ante eventos de genotoxicidad. Estos cambios precancerosos suelen estar acompañados por cariotipos complejos, caracterizados por deleciones cromosómicas, translocaciones y diversas anomalías estructurales. Este fenómeno, conocido como inestabilidad genómica, constituye un sello distintivo de los procesos de carcinogénesis (Kashyap et al., 2012).

Los riesgos genotóxicos pueden evaluarse mediante diversos indicadores de daño al ADN, tales como aberraciones cromosómicas, marcadores citogenéticos e intercambios de cromátidas hermanas (Fareed et

al., 2011). En células malignas, los errores en la segregación cromosómica durante la mitosis pueden originar cromosomas rezagados que no se incorporan a los núcleos hijos y quedan excluidos durante la anafase. Estas estructuras redondeadas u ovaladas, compuestas por cromatina y observables al microscopio tras tinción nuclear, quedan finalmente rodeadas por una membrana nuclear. A pesar de su menor tamaño, presentan características morfológicas similares a los núcleos principales y reciben el nombre de micronúcleos (Palaskara et al., 2010).

El recuento de micronúcleos es una técnica rápida, eficaz y económica para cuantificar el daño genético, ya que proporciona resultados fiables en la evaluación genotóxica (Dindgire et al., 2012). Esta demostrada la correlación directa entre el grado de lesión oral y la frecuencia de células micronucleadas (Cuadro I). Por ejemplo, la frecuencia de micronúcleos es significativamente mayor en personas con carcinoma escamoso oral (11.93 ± 1.83) en comparación con aquellas que presentan displasia epitelial (4.0 ± 1.19) o con los controles sanos (1.46 ± 0.51), con diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.000$). Además, a mayor severidad de la displasia, mayor es también la frecuencia de micronúcleos: en displasia severa se observa la media de 4.2 ± 1.3 frente a 3.2 ± 0.83 en displasia leve. Esta tendencia también se mantiene en el carcinoma escamoso oral, donde la frecuencia de CMN es mayor en tumores moderadamente diferenciados (13.2 ± 1.0) que en los bien diferenciados (10.8 ± 1.16).

Estos hallazgos refuerzan el potencial del ensayo de micronúcleos en células de mucosa oral como herramienta útil para la detección temprana de lesiones premalignas y malignas al contribuir a mejorar el pronóstico, aumentar la supervivencia y reducir la morbilidad asociada con tratamientos más avanzados (Kiran et al., 2018).

Diversos estudios concluyen que el recuento progresivo de células micronucleadas —de la mucosa oral normal hasta los trastornos potencialmente malignos y el carcinoma oral— sugiere una fuerte asociación entre este biomarcador y la progresión neoplásica. El análisis de micronúcleos puede utilizarse como herramienta sensible para identificar condiciones preneoplásicas en etapas tempranas, incluso antes de que aparezcan manifestaciones clínicas evidentes. Su aplicación resulta es-

pecialmente útil en poblaciones de alto riesgo, ya que permite no solo realizar un diagnóstico temprano, sino también establecer un pronóstico y promover intervenciones preventivas.

En este contexto, la detección de micronúcleos representa un campo prioritario dentro de la investigación oncológica orientada a la prevención y el tratamiento del cáncer. La presencia y frecuencia de estas estructuras actúan como indicadores de daño genómico y, si se identifican con precisión, pueden servir como biomarcadores de valor predictivo en personas con trastornos orales potencialmente malignos. Cabe destacar que, su utilidad se extiende al seguimiento terapéutico de pacientes con neoplasias invasivas, al facilitar la evaluación del riesgo.

El incremento en la frecuencia de células micronucleadas, desde tejido epitelial sano hasta lesiones malignas, respalda la utilidad del ensayo como un marcador fiable de transformación neoplásica. Por ello, la prueba de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral es una estrategia prometedora para detectar la exposición a diversos carcinógenos y anticipar la aparición del cáncer oral (Kiran et al., 2018).

El ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral es una herramienta científicamente sólida para evaluar el riesgo genético en personas expuestas a agentes carcinógenos. Esta demostrado su uso en contextos clínicos y epidemiológicos con alto potencial para detectar alteraciones genómicas tempranas, anticipar la transformación maligna y fortalecer la vigilancia en poblaciones vulnerables. Combinado con otros biomarcadores, el recuento de micronúcleos permite establecer un perfil de inestabilidad genómica útil para el diagnóstico precoz, la prevención del cáncer y el diseño de intervenciones terapéuticas más eficaces.

Importancia de la detección temprana

El cáncer oral suele diagnosticarse en etapas avanzadas, lo cual se asocia con complicaciones graves (Pakaravan et al., 2021), debido en parte a la ausencia de marcadores diagnósticos primarios (Rivera et al., 2017). En este contexto, el uso de técnicas no invasivas de diagnóstico en fases tempranas del desarrollo tumoral adquiere relevancia, ya que contribuye a frenar su progresión. La detección oportuna permite



al personal médico planificar un tratamiento farmacológico más eficaz, lo cual se traduce en mejoras significativas en la tasa de supervivencia.

A nivel mundial, el cáncer oral representa un problema de salud pública creciente, con una incidencia estimada de casi 390,000 nuevos casos en 2022, posicionándose entre los 20 tipos de cáncer más comunes. En México, aunque su incidencia es relativamente baja —con una tasa ajustada de 1.2 por cada 100,000 habitantes—, la mortalidad asociada y el diagnóstico tardío continúan siendo preocupantes. Este tipo de neoplasia afecta con mayor frecuencia a hombres mayores de 40 años, y en más del 90% de los casos corresponde a carcinomas de células escamosas. Factores como el consumo de tabaco y la exposición a compuestos carcinógenos son determinantes clave en su desarrollo, lo que refuerza la necesidad de métodos de detección temprana eficaces y accesibles (Jalili et al., 2022).

La prevención del cáncer oral y la reducción de su morbilidad y mortalidad dependen del diagnóstico temprano, que permite la evaluación histológica y la elección del tratamiento adecuado según la etapa clínica. La detección precoz de micronúcleos y otras alteraciones nucleares —cambios que surgen en las fases iniciales del proceso neoplásico— resulta esencial para estimar el riesgo derivado de la exposición a agentes genotóxicos y carcinogénicos, incluso antes de que aparezcan signos clínicos.

Detectar individuos con alto riesgo de transformación maligna es clave para implementar estrategias preventivas que eviten procedimientos terapéuticos invasivos, costosos y potencialmente dolorosos. Además, permite reducir la probabilidad de efectos secundarios tóxicos a corto o largo plazo. Cabe destacar que algunos tratamientos farmacológicos pueden, en ciertos casos, inducir nuevas neoplasias o generar metástasis en órganos previamente no afectados. Por ello, el ensayo de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas representa una herramienta prometedora como biomarcador de exposición a agentes genotóxicos y puede ser ofrecido como un método de detección pronóstica con potencial aplicación clínica.

Metodología para la evaluación citogenotóxica en mucosa oral

Consideraciones éticas

El biomonitoreo en grupos de individuos requiere atención rigurosa a los principios éticos establecidos en las legislaciones nacionales, internacionales e institucionales. Entre estos marcos normativos destaca la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 2019), la cual orienta la protección de los derechos humanos en investigaciones biomédicas.

En el caso de México, la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y su reglamento, así como la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, establecen lineamientos específicos para la ejecución ética de estudios en seres humanos, enfatizando la necesidad de minimizar los riesgos y maximizar los beneficios para los participantes.

En este contexto, es fundamental proporcionar a cada persona una explicación clara y detallada sobre los objetivos del estudio, los procedimientos involucrados, los posibles riesgos y beneficios, así como la forma en que se les comunicarán los resultados. Este proceso debe asegurar en todo momento el respeto a los derechos de los participantes y la confidencialidad de su información personal.

Sólo deben incluirse en el estudio aquellas personas que hayan manifestado explícitamente su voluntad de participar, mediante la firma del consentimiento informado. En el caso de menores de edad o personas con alguna discapacidad cognitiva, se requiere además del asentimiento del participante, la autorización por escrito del tutor legal. El protocolo de investigación debe describir con precisión los aspectos fundamentales del estudio —como los objetivos, procedimientos, tamaño de muestra, entre otros— y ser sometido a evaluación por revisores independientes. Además, deberá ser registrado y aprobado tanto por un comité de bioética como por un comité de investigación institucional (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013a).

Toma y procesamiento de muestras

Registro y conservación de datos relevantes: es recomendable aplicar un cuestionario estructurado que permita registrar la ficha de identificación



del participante, así como información sobre hábitos higiénico-dentales, alimentación, antecedentes patológicos y toxicológicos, entre otros datos relevantes para el estudio. En caso necesario, se deberá contar con la autorización correspondiente para consultar expedientes clínicos. Cada expediente debe ser individual, estrictamente confidencial, y conservarse por un periodo mínimo de cinco años posteriores a la conclusión oficial del proyecto o a la publicación de los resultados en una revista científica reconocida.

Asignación de folios: a cada participante se le debe asignar un folio único que se mantenga constante a lo largo de todo el proceso de investigación y que coincida con su expediente, cuestionario, muestras y resultados. Se recomienda utilizar números consecutivos, acompañados de fechas y/o iniciales, especialmente cuando el tamaño muestral es amplio. No se deben registrar nombres completos de los participantes, a fin de evitar sesgos en el análisis de los datos y proteger la confidencialidad. Es indispensable llevar un registro manual —preferentemente en libretas foliadas— así como un respaldo electrónico de dicha información.

Área de trabajo: el área destinada al procesamiento de muestras debe estar físicamente separada de otros espacios y contar con una ventilación adecuada hacia el exterior. Idealmente, debe disponer de una campana de extracción, dado el manejo de solventes y reactivos que representan un riesgo potencial. Resulta importante destacar que, deben establecerse protocolos de seguridad específicos, incluyendo la ubicación de extintores y regaderas de emergencia, y debe señalarse claramente el procedimiento a seguir en caso de siniestros, especialmente por el uso de sustancias inflamables.

Toma de muestras de mucosa oral: para cada participante se deben preparar al menos dos extendidos celulares —uno destinado al análisis y otro conservado como respaldo—. La recolección puede realizarse en regiones como la mucosa gingivolabial superior, labios o lengua. En tejido sano de estas zonas, especialmente en individuos control, no

se observan diferencias relevantes en la frecuencia de biomarcadores. No obstante, diversos estudios han documentado mayor frecuencia de micronúcleos en tejido tumoral, seguida de tejido con lesiones, y finalmente frecuencia más baja en tejido sano (Ramírez y Saldanha, 2002; Quintero-Ojeda et al., 2018). Además, esta descrito que en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos, la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares es menor en la mucosa de las mejillas en comparación con el epitelio de la lengua (Martins et al., 2009; Sadik et al., 2023).

Es importante considerar que la renovación celular en la mucosa bucal implica un periodo estimado de 5 a 7 días entre el daño genético ocurrido en células basales y la aparición de células exfoliadas micronucleadas en superficie. Por ello, el daño detectado refleja exposiciones ocurridas al menos cinco días antes de la toma de muestra. Antes de recolectar las células, se recomienda que el participante enjuague su boca con agua potable para eliminar residuos alimenticios que puedan interferir con el análisis y generar falsos positivos o negativos.

Recolección de la muestra: la frecuencia de células micronucleadas puede aumentar si la recolección se realiza de manera vigorosa en comparación con raspados suaves. Los instrumentos utilizados deben ser fáciles de manejar en diversos entornos y permitir la obtención de un número suficiente de células epiteliales. Entre las herramientas más utilizadas se encuentran portaobjetos estériles con bordes esmerilados, depresores linguales de madera humedecidos, espátulas metálicas, cepillos de dientes y los denominados Cytobrush. La mejor técnica será aquella que garantice la distribución uniforme y abundante de células sobre el portaobjeto, lo cual favorece la sensibilidad del ensayo.

Existen diferentes métodos para recolectar tejido epitelial oral, cada uno con sus propias ventajas y limitaciones. Uno de los más simples y económicos es el método directo, que ofrece extendidos libres de impurezas, lo que facilita el análisis citológico. Este método ha demostrado resultados comparables a técnicas más complejas, como la citología exfoliativa en base líquida, con frecuencias de células micronucleadas cercanas al 2.8% en ambos casos (2.83% *vs* 2.79%).

El método directo consiste en raspar la mucosa oral por el carrillo

interno de la mejilla derecha por medio de un portaobjetos limpio y desinfectado de bordes esmerilados y el material obtenido, se deposita en otro portaobjetos con las características ya señaladas y debidamente identificado, para llevar a cabo un barrido por toda la laminilla; evitando que el material quede aglomerado. Se asegura que el material se extiende ampliamente por toda la laminilla en un solo movimiento del barrido y evitar lo más posible que las células queden emplamadas. Este mismo procedimiento se repite, pero en el carrillo de la mejilla izquierda. Una vez que se obtienen las muestras; se dejan secar al aire libre y se guardan en una caja portalaminillas para su posterior fijación y tinción.

En el método por centrifugado, las células recolectadas se depositan en un tubo Falcon que se agita en vórtex y se centrifuga a 1000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en solución fijadora de metanol y ácido acético (3:1). Este procedimiento se repite tres veces. Las células concentradas se colocan en portaobjetos mediante gotas distribuidas a distancia de 15 cm para favorecer su extensión. Una vez secos, los portaobjetos se someten a hidrólisis en HCl 5 M a 37 °C durante 20 minutos, se enjuagan tres veces con agua destilada y se conservan hasta su tinción.

Finalmente, el método de citología exfoliativa en base líquida permite la recolección eficiente y la fijación inmediata sin impurezas, generando extendidos en monocapa con fondo claro. Esto incrementa la sensibilidad y calidad de los resultados. En este procedimiento, tanto la muestra como el cepillo recolector se colocan en un recipiente con un medio conservador, lo que facilita su transporte y almacenamiento adecuado.

Recolección y preservación de la muestra mediante citología en base líquida

La toma de muestra se realiza utilizando un cepillo citológico estéril, con el cual se efectúa un raspado suave en ambas mejillas, girando el cepillo cuidadosamente para asegurar una recolección homogénea de células epiteliales. Una vez obtenida la muestra, el cepillo se introduce en un tubo de plástico identificado con el folio del participante y que contiene entre 4 y 5 mL de solución fijadora (ThinPrep®). Para liberar

las células adheridas, se recomienda agitar el tubo manualmente o utilizando un vórtex. A continuación, se corta el mango del cepillo, dejando únicamente la cabeza dentro del contenedor. El tubo debe cerrarse herméticamente y conservarse en refrigeración a 4 °C hasta el procesamiento. Bajo estas condiciones, la muestra puede mantenerse en buen estado hasta por cuatro meses (Carrillo-Novia et al., 2023).

Preparación de muestras mediante el método de base líquida

Para maximizar la eficacia, eficiencia y calidad de los resultados, las muestras deben procesarse lo antes posible, preservando su integridad y correcta identificación. Antes de iniciar el procedimiento, se debe verificar que tanto los tubos de muestra como las laminillas para el extendido estén rotulados con el folio correspondiente (Hayama et al., 2005).

El tubo con la muestra debe dejarse reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se agita manualmente o con vórtex para homogeneizar el contenido y liberar completamente las células. Una vez logrado esto, se retira el cepillo del tubo.

En un tubo Falcon de 15 mL se colocan 3 mL de la muestra y 3 mL de solución de gradiente. La mezcla se agita manualmente o con vórtex y se centrifuga durante 5 a 10 minutos a 1500–2000 rpm. Después, se decanta el sobrenadante y se ajusta el volumen al doble con solución fresca, repitiendo la centrifugación durante 5 minutos a 1500 rpm. Tras eliminar el nuevo sobrenadante, se resuspende el botón celular en 3 mL de agua destilada, hasta obtener una suspensión homogénea.

Simultáneamente, se prepara un portaobjetos limpio depositando una gota de solución de adherencia celular, la cual se extiende uniformemente con otra laminilla. Se deja sedimentar entre 4 y 5 minutos. Posteriormente, se colocan 2 mL de la muestra celular sobre la laminilla y se deja sedimentar por el mismo periodo. El exceso de líquido se retira cuidadosamente apoyando la laminilla de forma inclinada. A continuación, se lava la superficie dejando caer de manera controlada unas gotas de etanol al 96% (1 a 2 minutos), y nuevamente se elimina el exceso de alcohol. Finalmente, los frotis se colocan en una canastilla y se sumergen en etanol al 96% durante 2 a 3 minutos. Las laminillas deben conservarse en una caja cerrada y protegida hasta el momento de



la tinción.

Fijación de muestras de mucosa oral

La fijación inmediata de las placas celulares es esencial para preservar la integridad morfológica de las células y evitar procesos de autólisis, oxidación y alteraciones en la tinción. Para ello, se recomienda sumergir las laminillas directamente en una solución de etanol al 80% durante un periodo mínimo de 48 horas. Aunque la fijación ocurre principalmente en los primeros cinco minutos, la prolongación del tiempo ayuda a prevenir el desprendimiento celular durante el procesamiento posterior. Es importante evitar el uso de metanol debido a la toxicidad de sus vapores.

En caso de reutilizar la solución fijadora, debe filtrarse previamente para garantizar su pureza y efectividad. Una vez concluido el proceso de fijación, las laminillas deben dejarse secar al aire durante 10 minutos y luego conservarse en un lugar seco, protegido de la luz solar, el polvo, el aire, la humedad o insectos, como cucarachas, que pueden dañar irreversiblemente el material celular. Se recomienda almacenar las muestras en cajas porta laminillas hasta el momento de la tinción.

Para estudios de genotoxicidad, no se aconseja el uso de fijadores en aerosol, ya que pueden interferir con la visualización e identificación precisa de micronúcleos. Un fijador adecuado debe conservar la tensión superficial de las células, penetrar eficientemente al interior celular, preservar los componentes morfológicos y realzar los detalles cromáticos mediante una acción rápida, sin inducir alteraciones físicas o químicas significativas a la muestra (Arnaudo et al., 2013).

Tinción de muestras

La tinción es una etapa crítica en la preparación de frotis celulares, ya que permite la adecuada visualización de las estructuras nucleares y citoplasmáticas. Una tinción eficaz se caracteriza por una definición nítida del núcleo y una adecuada transparencia citoplasmática, que facilite la identificación de micronúcleos y otras anomalías nucleares.

Es indispensable verificar que las soluciones colorantes estén correctamente rotuladas, con indicación clara de su concentración, fecha de

preparación y advertencias de manejo. Estos colorantes deben almacenarse en frascos oscuros y bien cerrados, ya que son fotosensibles y susceptibles a la oxidación a temperatura ambiente. Aquellos colorantes que lo requieran deben filtrarse previamente mediante papel filtro de velocidad media (por ejemplo, Whatman N°1), con el fin de eliminar partículas o restos celulares que puedan haberse desprendido de muestras previas. Durante la tinción, es fundamental asegurar que toda la superficie de la laminilla esté completamente cubierta por la solución colorante.

Entre los colorantes empleados, se incluyen tanto aquellos no específicos, como la tinción de Papanicolaou (PAP), aceto-orceína, Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, orceína, hematoxilina y eosina (H y E), yoduro de propidio y Hoechst 33258; como también colorantes altamente específicos para ácidos nucleicos, tales como la reacción de Feulgen, naranja de acridina y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Debe considerarse que las tinciones inespecíficas para ADN pueden inducir una sobreestimación en la frecuencia de micronúcleos, ya que tiñen no solo estructuras nucleares, sino también otros componentes celulares como gránulos de queratina, que pueden confundirse morfológicamente con micronúcleos. Por ejemplo, en individuos sanos se han reportado frecuencias más altas de células micronucleadas al utilizar tinciones como Giemsa (0.6 ± 1.1 por cada 1000 células) o yoduro de propidio (hasta cinco veces más), en comparación con la tinción de Feulgen (0.4 ± 0.7 por cada 1000 células) (Juneja et al., 2019). Otros estudios comparativos encontraron que PAP y H&E arrojan frecuencias de micronúcleos de 7.7 ± 2.0 y 9.6 ± 2.3 por cada 1000 células, respectivamente, frente a 1.6 ± 1.2 con la tinción de Feulgen (Grover et al., 2012).

Casartelli et al. (1997), describieron que la tinción con Hoechst 33258 es una alternativa práctica, rápida y fiable, con resultados comparables a los obtenidos con la técnica de Feulgen, mientras que las tinciones con Giemsa y yoduro de propidio se consideran menos satisfactorias para la evaluación específica de micronúcleos.

Nersesyan et al. (2006), demostraron que, si bien los colorantes altamente específicos como Feulgen, naranja de acridina y DAPI tienden a proporcionar frecuencias similares de micronúcleos, los valores obteni-

dos con Giemsa pueden ser de 4 a 5 veces superiores. Esto se atribuye a la tinción de estructuras no nucleares, como cuerpos de queratina, que simulan morfológicamente a micronúcleos y pueden inducir falsos positivos. Además, la tinción con Giemsa mostró correlación significativa con otras anomalías celulares, como cariorrexis, cariólisis, condensación de cromatina y binucleación, hallazgos que no se replicaron con tinciones específicas para ADN.

La elección del colorante debe realizarse con base en la finalidad del estudio, considerando tanto la sensibilidad como la especificidad. Entre los colorantes más empleados en estudios genotoxicológicos se encuentran aceto-orceína con verde rápido, Papanicolaou, Feulgen y naranja de acridina (Nersesyan et al., 2006).

Métodos de tinción para la evaluación de micronúcleos y otras anomalías nucleares.

Tinción con orceína y verde rápido: una vez que las muestras han sido fijadas, se sumergen completamente en orceína durante dos horas, asegurando que queden completamente cubiertas. Posteriormente, se lavan con agua corriente y se tiñen con verde rápido durante un periodo de tres a cinco minutos. Después de un segundo enjuague, las laminillas se dejan secar al aire y se observan con un microscopio óptico a 100×. Este método tiene la ventaja de permitir una conservación prolongada de las muestras, manteniendo su integridad por años si se almacenan adecuadamente.

Tinción de Papanicolaou (PAP): este método, originalmente desarrollado para estudios en tejidos cervicales, ha demostrado ser adecuado para la tinción de células de mucosa oral. Se basa en una tinción polícromática que incluye una etapa nuclear y otra citoplasmática, proporcionando una excelente definición del detalle nuclear y un citoplasma transparente que facilita la evaluación de diferenciación celular y actividad metabólica. El procedimiento comprende cuatro fases: fijación con alcohol etílico al 96%; tinción nuclear con hematoxilina durante dos a cinco minutos; tinción citoplasmática con Orange G y eosina EA50 por dos a seis minutos; y aclaramiento final con xilol. La calidad de los

colorantes puede potenciarse: la hematoxilina se activa añadiendo 5 mL de ácido acético glacial por litro; Orange G y eosina mejoran con 2 g de ácido fosfomolibdico por litro.

Tinción de Feulgen: este método es altamente específico para ADN. Los frotis celulares previamente fijados se someten a hidrólisis ácida con HCl 5 M a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se enjuagan con agua destilada durante el mismo periodo y se tiñen con reactivo de Schiff entre 50 y 90 minutos. Una vez completada esta etapa, se realiza una contratinción con verde rápido al 0.1%. Esta tinción permite una visualización precisa de los micronúcleos, evitando sobreestimaciones frecuentes con otras tinciones menos específicas.

Tinción con naranja de acridina: la naranja de acridina es un colorante catiónico fluorescente que se une de forma específica a ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia verde al intercalarse con ADN y fluorescencia roja al unirse al ARN o a compartimentos ácidos como los lisosomas. Su aplicación requiere el uso de un microscopio equipado con epifluorescencia. Las laminillas, una vez fijadas, se sumergen en una solución preparada en buffer de fosfatos durante dos, seis o diez minutos, agitando suavemente para favorecer la penetración del colorante. Luego, se lavan en un segundo contenedor con buffer fresco durante diez minutos. Se recomienda teñir inicialmente una sola laminilla para verificar la calidad de la tinción antes de procesar el resto de las muestras. Las laminillas deben protegerse de la luz y conservarse en cajas cerradas; el periodo óptimo de análisis es de hasta 60 días, aunque pueden conservarse por más tiempo con pérdida gradual de calidad.

Esta tinción permite reducir el tiempo de análisis hasta en un 40%, y ofrece alta precisión en la identificación de micronúcleos. No obstante, su uso implica precauciones estrictas debido a su carácter mutagénico. La naranja de acridina puede inducir mutaciones por desplazamiento del marco de lectura al intercalarse en el ADN. Además, su uso incrementa el costo del análisis, tanto por el precio del colorante y los reactivos como por el mantenimiento del equipo de fluorescencia, el cual puede requerir lámparas de mercurio con vida útil limitada (alrededor

de 150 horas).

Procedimientos complementarios: limpieza y montaje de muestras

Durante todo el proceso, es fundamental asegurar la calidad de los colorantes mediante filtración con papel Whatman N° 1, almacenarlos en envases oscuros y bien cerrados, y cubrir completamente las laminillas durante la tinción para evitar resultados inconsistentes. La limpieza de las laminillas por el reverso puede realizarse con una solución compuesta de alcohol isopropílico o etanol absoluto mezclado con acetona (1:1), lo cual facilita la observación bajo el microscopio.

El montaje final para análisis consiste en aplicar una gota de buffer de fosfato sobre la muestra, colocar un cubreobjetos evitando la formación de burbujas, envolver en una gasa limpia y presionar suavemente para eliminar el exceso de líquido. Posteriormente, se aplica una gota de aceite de inmersión y se observa la muestra con el objetivo de 100X. Es importante completar este procedimiento sin interrupciones, ya que la desecación parcial o contaminación puede comprometer la calidad de la tinción de la muestra y generar falsos negativos.

Conteo celular y factores que influyen en la frecuencia de células micronucleadas

Independientemente del método de tinción utilizado, la literatura científica recomienda evaluar entre 500 y 4,000 células epiteliales por individuo. Sin embargo, se ha establecido que el número mínimo más comúnmente aceptado para alcanzar el poder estadístico adecuado es de 2,000 células por sujeto. El análisis debe iniciarse observando la laminilla con la muestra y el objetivo de 10X, recorriéndola de forma ordenada en trayectorias en zigzag, ya sea horizontales o verticales, para identificar la región más adecuada. Posteriormente, se realiza un enfoque preliminar con el objetivo de 40X, y finalmente se procede al conteo detallado utilizando el objetivo de inmersión a 100X (Ceppi et al., 2010).

Diversos factores pueden influir en la frecuencia de células micronucleadas observadas en los estudios. En este sentido, el proyecto Human MicroNucleus sobre células bucales exfoliadas (HUMN_{XL}) surge como una extensión del proyecto HUMN, originalmente centrado en

linfocitos de sangre periférica. Este esfuerzo internacional, desarrollado por múltiples laboratorios, tiene como objetivo validar el uso del ensayo de micronúcleos en células epiteliales orales como biomarcador de riesgo genético y carcinogénico en poblaciones humanas. Este proyecto ha contribuido a la identificación y clasificación de los factores de confusión que influyen en la frecuencia de micronúcleos, como el estilo de vida, el estado de salud, la exposición a contaminantes ambientales u ocupacionales y las características individuales del huésped. Este enfoque colaborativo ha generado evidencia sólida sobre la sensibilidad, eficacia y accesibilidad del ensayo, resaltando su bajo costo, capacidad predictiva y carácter mínimamente invasivo. Estas cualidades, favorecen su uso en estudios con poblaciones vulnerables o expuestas crónicamente a contaminantes ambientales (Bolognesi et al., 2013; Bonassi et al., 2001, 2009, 2011; Fenech et al., 2011; Gómez-Arroyo, 2011).

Frecuencia espontánea de células micronucleadas y factores asociados

La frecuencia espontánea de células micronucleadas en individuos sanos, no expuestos a agentes químicos genotóxicos ni a radiación, se estima en 0.74% (intervalo de confianza del 95%: 0.52–1.05), con rango entre 0.3% y 1.7%. No obstante, este biomarcador presenta considerable variabilidad entre distintas poblaciones, atribuible a factores biológicos, ocupacionales y de estilo de vida.

En cuanto al sexo, esta descrito que la frecuencia de micronúcleos en linfocitos tiende a ser más elevada en mujeres. Sin embargo, esta diferencia no se refleja de manera significativa en células exfoliadas de mucosa oral, donde los valores son comparables entre hombres y mujeres.

Por su parte, la edad es un factor determinante, ya que la frecuencia de células micronucleadas aumenta de forma significativa conforme avanza la edad, mostrando tendencia positiva con $p < 0.001$.

La exposición laboral también influye de manera importante en la frecuencia de micronúcleos. Diversos estudios evidenciaron incremento significativo de este biomarcador en células orales de trabajadores expuestos a solventes, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), gasolina, arsénico y fármacos antineoplásicos, en comparación con grupos control no expuestos.



En el contexto de enfermedades oncológicas, incluso cuando los tumores no se localizan en la región de cabeza y cuello, se describió aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos. Esto es particularmente notable en pacientes con cáncer orofaríngeo (FR = 1.72; IC 95%: 1.19–2.49), cáncer del aparato respiratorio (FR = 1.40; IC 95%: 1.06–1.86), y otros tipos de cáncer agrupados (FR = 1.94; IC 95%: 1.46–2.59).

En contraste, no se ha encontrado asociación significativa entre la presencia de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer y aumento en la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales orales.

Respecto al estilo de vida, el factor más analizado es el tabaquismo. Los estudios indican que solo los fumadores intensivos —aquellos que consumen aproximadamente 40 cigarrillos al día— presentan aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos en comparación con los no fumadores (FR = 1.37; IC 95%: 1.03–1.82). No se encontró asociación consistente con el consumo de tabaco mascado o nuez de betel, aunque los valores medios de los usuarios de estas sustancias fueron aproximadamente el doble de los observados en los controles, sin alcanzar significancia estadística. Tampoco se observó una relación entre el consumo diario de alcohol y el aumento en la frecuencia de micronúcleos (Jalili et al., 2022).

Por el contrario, ciertos hábitos alimenticios parecen tener efecto protector. Las personas que reportaron consumo diario de frutas o verduras de hoja verde presentaron frecuencias significativamente más bajas de células micronucleadas que quienes no los consumen regularmente. En el caso de las frutas, se observó frecuencia de 1.17% frente a 1.99%, mientras que para las verduras de hoja verde fue de 1.80% frente a 2.33%. Este efecto se confirmó mediante análisis multivariado únicamente para el consumo de frutas: los sujetos que consumen frutas diariamente presentaron frecuencia de micronúcleos 32% menor en células orales exfoliadas respecto a quienes nunca las consumen (FR = 0.68; IC 95%: 0.50–0.91).

El análisis de micronúcleos y otras anomalías nucleares en células epiteliales exfoliadas de la mucosa oral es una herramienta potente, no invasiva y de alto valor predictivo para los estudios de genotoxici-

dad humana. Su sensibilidad ante agentes ambientales, ocupacionales y endógenos, así como su aplicabilidad en poblaciones vulnerables, la han convertido en una técnica clave para la vigilancia de la salud pública. El epitelio oral permite detectar daño genético temprano y examinar procesos celulares como la proliferación, la citotoxicidad y la apoptosis. La correcta ejecución de los procedimientos, desde la toma y el procesamiento de las muestras hasta la selección de las tinciones, asegura la fiabilidad de los resultados y refuerza su utilidad en entornos clínicos, epidemiológicos y de investigación biomédica. En conjunto, esta prueba se consolida como un método versátil para evaluar múltiples biomarcadores celulares asociados con la inestabilidad genómica.





CAPÍTULO V

EL BIOENSAYO *Allium cepa*: HERRAMIENTA PARA ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD

Perspectiva citogenética del bioensayo *Allium cepa*

Un bioindicador es un organismo, o una parte de él, que refleja alteraciones causadas por distintos niveles de contaminación ambiental, tanto en ecosistemas reales como en entornos controlados. Estos organismos permiten identificar cambios estructurales o funcionales, como la presencia de micronúcleos, que actúan como señales tempranas de deterioro ambiental y brindan información sobre la salud del organismo expuesto y su entorno (da Silva Souza et al., 2014).

Los sistemas de prueba utilizados en bioensayos se clasifican de acuerdo con el tipo de organismo biológico empleado y el punto final genético que se pretende identificar. En este contexto, los bioensayos con células procariotas son eficaces para detectar agentes que inducen mutaciones génicas o causan daño primario al ADN. Cabe señalar que, estos sistemas permiten evaluar el tipo y la magnitud de las alteraciones genéticas inducidas, incluyendo mutaciones específicas, daño cromosómico y eventos de aneuploidía (Leme y Marin-Morales, 2009).

Las plantas vasculares son ampliamente reconocidas como bioindicadores eficaces y modelos genéticos versátiles para la detección y evaluación de compuestos con potencial citotóxico y genotóxico. Entre las especies más utilizadas se encuentran *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* y *Hordeum vulgare*. Estos modelos permiten el análisis de células provenientes de



diferentes órganos y tejidos, como hojas, raíces y polen, lo que incrementa su aplicabilidad en distintos contextos experimentales (Leme y Marin-Morales, 2009; de Souza et al., 2016).

Las plantas mencionadas presentan diversas ventajas metodológicas: son de manejo sencillo, fácil almacenamiento, bajo costo, y pueden emplearse en múltiples especies. Además, se ha demostrado buena correlación con otros sistemas de ensayo, incluidos los modelos animales. Su posición basal en la cadena trófica les confiere capacidad de respuesta más rápida ante la exposición a sustancias tóxicas, lo que las convierte en herramientas sensibles para el monitoreo ambiental. Este es el caso particular del bioensayo con *Allium cepa* (cebolla), que ha mostrado mayor sensibilidad en comparación con organismos ubicados en niveles tróficos superiores (Fiskesjö, 1985; de Souza et al., 2016).

Por otro lado, las pruebas de citotoxicidad permiten estimar la proporción de células afectadas o muertas como resultado del daño inducido por un xenobiótico, mientras que los ensayos de genotoxicidad evalúan alteraciones directas o indirectas sobre el material genético. Existen diversas metodologías disponibles para este fin, entre ellas las pruebas citogenéticas, que permiten identificar y cuantificar alteraciones cromosómicas, como los intercambios de cromátides hermanas (ICH) o la frecuencia de células con micronúcleos. Todas estas técnicas son altamente resolutivas y pueden aplicarse eficazmente en el modelo vegetal *Allium cepa*.

Por lo tanto, uno de los sistemas biológicos que permite evaluar con alta precisión los efectos citotóxicos y genotóxicos, mediante el análisis de la cariocinesis y la citocinesis en células meristemáticas de raíz, es el ensayo de *Allium cepa*, también conocido como *Allium test*. Este modelo ha ganado progresiva aceptación en el campo de la toxicología genética, debido a su alta sensibilidad para detectar el efecto de agentes tóxicos, tanto de interés ambiental como relacionados con la nanotecnología (Leme y Marin-Morales, 2009). Su popularidad se atribuye además a su fácil acceso, simplicidad metodológica y a la ventaja citogenética de poseer cromosomas grandes y en número reducido.

Entre las limitaciones del modelo se encuentra su elevada sensibilidad, lo que puede conducir a la detección de efectos en *Allium cepa* que

no necesariamente se manifiestan de la misma manera en organismos más complejos, como mamíferos, aves, reptiles, anfibios o peces. Por otra parte, en este modelo puede ser difícil evaluar efectos a largo plazo, o daños hereditarios indirectos que no se reflejan de forma medible en las primeras generaciones celulares. Sin embargo, los resultados positivos en el ensayo con *Allium cepa* deben interpretarse como señales de advertencia sobre el potencial riesgo del agente evaluado, no solo para la salud vegetal, sino también para los ecosistemas y organismos superiores, incluida la especie humana (Fiskesjö, 1985; Sabeen et al., 2020).

El modelo se fundamenta en la evaluación de efectos citotóxicos y genotóxicos mediante la medición del crecimiento de las raíces y la observación microscópica de alteraciones citológicas y cromosómicas. Uno de los principales indicadores es el índice de división celular, que permite establecer el grado de interferencia del agente probado sobre el ciclo mitótico (Leme y Marin-Morales, 2009).

Modelo *Allium cepa*: evaluación de genotoxicidad y citotoxicidad

La citogenética es una disciplina que integra conocimientos de la genética, la citología y la biología celular, centrada en el análisis de los genomas nucleares a nivel cromosómico. Su objeto principal de estudio son los cromosomas, tanto en el contexto de investigaciones básicas como en estudios aplicados de mutagénesis y toxicología genética (Kwasniewska y Bara, 2022).

La técnica de micronúcleos, ampliamente descrita en capítulos anteriores, ha sido aplicada en una gran diversidad de organismos. Sin embargo, su desarrollo en vegetales ha seguido un camino particular. El primer uso documentado de esta técnica en plantas se remonta al trabajo pionero de Levan (1938), quien evaluó los efectos de la colchicina sobre la mitosis en raíces de *Allium cepa*. En dicho experimento, los bulbos de cebolla fueron expuestos a soluciones acuosas de la sustancia de interés, permitiendo el crecimiento de raíces, las cuales fueron posteriormente seccionadas, teñidas y observadas al microscopio para identificar alteraciones mitóticas (Levan, 1938).

Posteriormente, en 1959, se aplicó por primera vez el ensayo de micronúcleos en raíces primarias de plántulas de *Vicia faba* tratadas con

radiación gamma (cobalto-60) y neutrones, bajo condiciones de presencia o ausencia de oxígeno. En ese estudio se analizaron 8,000 células por tratamiento, observándose una frecuencia significativamente mayor de células micronucleadas en las plantas expuestas a radiación (83.7 ± 8.0 MN/1,000 células a las 36 horas post-irradiación, dosis de 107 rads con oxígeno) en comparación con el grupo control (1.1 ± 0.3 MN/1,000 células), lo que evidenció la alta sensibilidad del método en tejidos vegetales al efecto de la radiación (Evans et al., 1959).

Más tarde, Fiskesjö (1985), realizó modificaciones metodológicas con el fin de adaptar esta prueba a evaluaciones ambientales, estableciendo así un sistema de bioensayo confiable para medir el daño genómico inducido por agentes genotóxicos en células vegetales mitóticas y meióticas.

Los micronúcleos son estructuras pequeñas y extranucleares que se localizan junto al núcleo parental dentro del citoplasma. En el ensayo con *Allium cepa*, estos se detectan en células meristemáticas interfásicas de raíces o brotes, típicamente durante el ciclo celular posterior a la exposición al agente mutagénico (Mišík et al., 2019). Aunque los estudios sobre micronúcleos son extensos en modelos animales y humanos, el conocimiento generado en plantas sigue siendo considerablemente más limitado (Kwasniewska y Bara, 2022). No obstante, la prueba de micronúcleos en vegetales ha demostrado ser útil y sensible para la detección de efectos genotóxicos causados por diversas sustancias, tales como plaguicidas, compuestos nitroaromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, metales pesados, radiación ionizante, productos químicos industriales, nanopartículas, entre otros. Actualmente, las especies vegetales más empleadas en estos ensayos incluyen *Allium*, *Nicotiana*, *Vicia* y otras plantas modelo de uso común en estudios ambientales y de toxicología genética (Kwasniewska y Bara, 2022; Kumari et al., 2009).

Características biológicas de *Allium cepa*

Allium es uno de los géneros botánicos más amplios del planeta, con un número estimado de entre 600 y 920 especies. Dentro de este género, *Allium cepa*, conocida comúnmente como cebolla, es la especie más

cultivada. Se trata de una planta herbácea bienal perteneciente a la familia Amaryllidaceae, cuyas características biológicas la convierten en un modelo ideal para estudios de bioindicadores ambientales, especialmente en la detección de daño celular, cromosómico o alteraciones en la división celular, incluyendo la evaluación del riesgo de aneuploidía (Evans et al., 1959; Fiskesjö, 1985).

Entre sus principales ventajas se destaca su fácil acceso, manejo y conservación, así como el bajo costo de los ensayos que la emplean. Estos experimentos permiten obtener resultados en periodos cortos de tiempo. Su sistema radicular está compuesto por numerosas raíces fasciculadas, de color blanquecino y escasa profundidad, que emergen de un tallo en forma de disco o disco caulinar. Este presenta múltiples nudos y entrenudos muy cortos, a partir de los cuales se desarrollan las hojas. En el extremo apical de las raíces se localiza el meristemo radicular, una región compuesta por células en constante proliferación responsable del crecimiento de la raíz. Estas células atraviesan ciclos celulares continuos sin sincronía entre ellas, lo que permite que en una misma preparación se encuentren células en diferentes fases del ciclo celular, facilitando el análisis comparativo entre interfase y mitosis. De esta manera, es posible calcular el índice mitótico y estimar la duración relativa de cada fase del ciclo celular.

Las curvas de crecimiento generadas a partir del desarrollo radicular permiten establecer relaciones efecto-concentración para los agentes evaluados. Las células del meristemo radicular presentan un tamaño lo suficientemente grande como para ser observadas al microscopio con el objetivos 40X, lo cual favorece su análisis citogenético. Además, estas células son altamente permeables, lo que facilita la entrada de sustancias químicas y colorantes, incrementando su sensibilidad y mejorando la visualización de las estructuras internas.

Otro aspecto destacable es su elevada capacidad para activar pro-mutágenos, lo que incrementa la detección de efectos genotóxicos. A nivel cromosómico, *Allium cepa*, presenta un número diploide de 16 cromosomas ($2n = 16$), caracterizados por su gran tamaño, lo que facilita su identificación y estudio durante la mitosis. Esto, junto con la claridad con que pueden observarse las distintas fases mitóticas, permite evaluar

con precisión el daño inducido tanto en la cariocinesis como en la citocinesis.

Adicionalmente, el número de células disponibles en una sola raíz es prácticamente ilimitado, lo que permite alcanzar el poder estadístico necesario sin recurrir a un número elevado de réplicas biológicas. El ensayo con *Allium cepa* ha demostrado ser un sistema sensible y confiable, mostrando buena correlación con otros modelos de prueba utilizados en toxicología genética. Por ello, los resultados positivos obtenidos con este modelo deben considerarse una señal de advertencia sobre el potencial riesgo que una sustancia química representa no solo para la salud humana y animal, sino también para el medio ambiente en general.

Fundamento del ensayo *Allium cepa*

Cuando se coloca un bulbo de *Allium cepa* en condiciones de hidratación, se estimula el desarrollo de raíces nuevas mediante la activación del tejido meristemático radicular. No obstante, si este tejido es expuesto a xenobióticos, la división celular puede verse alterada de distintas formas: el proceso proliferativo puede ser estimulado, inhibido, retardado o incluso interrumpido de manera irreversible por la destrucción de las células. Para evaluar estos efectos, se calcula la velocidad de división celular a través del índice mitótico, el cual estima el porcentaje de células en división presentes en un tejido y, por lo tanto, constituye una medida del potencial proliferativo del mismo (Rodríguez-Soto et al., 2018).

Además del efecto sobre la tasa de proliferación, los xenobióticos pueden inducir alteraciones citogenéticas en las células radiculares, como fracturas del ADN o disrupciones en la estructura del huso mitótico, lo que conlleva la aparición de anomalías cromosómicas, incluida la formación de micronúcleos (Correa et al., 2016).

Metodología del ensayo *Allium cepa*

Para ejecutar el ensayo, se deben seleccionar cuidadosamente los bulbos de *Allium cepa*, procurando que se encuentren en buen estado sanitario (Figura 17). Los ejemplares deben ser sanos, intactos, libres de daños mecánicos, sin signos de infestación por hongos o parásitos,

y con un follaje de color verde intenso. Es fundamental que la base del bulbo, donde se sitúan los primordios radicales, esté completa y sin raíces previas. Se recomienda elegir individuos uniformes, con un peso de entre 12 y 15 gramos y un diámetro aproximado de 2 a 3 cm.

Por cada tratamiento experimental, se seleccionan entre tres y cinco bulbos, dos de los cuales pueden considerarse como reserva para reemplazo, ya que se estima que aproximadamente un 20% de los ejemplares puede presentar crecimiento anómalo. Antes de iniciar el experimento, se deben retirar las escamas externas del bulbo, así como las raíces secas y la base inferior de color pardo. Es importante no dañar el anillo de primordios radicales durante este proceso. Posteriormente, cada

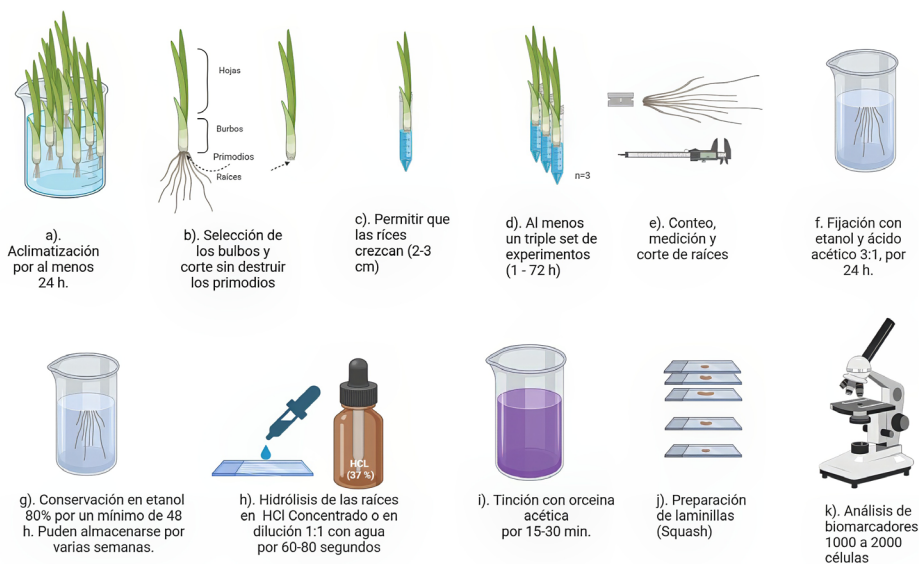


Figura 17. Metodología del ensayo *Allium cepa* para la evaluación de genotoxicidad y citotoxicidad. El procedimiento incluye la selección, acondicionamiento y exposición de bulbos a diferentes tratamientos, seguido del procesamiento de raíces para el análisis de biomarcadores nucleares. Las etapas comprenden desde la aclimatación inicial, crecimiento radicular y exposición a xenobióticos, hasta la fijación, hidrólisis, tinción con orceína, montaje de laminillas por técnica de aplastamiento (squash) y conteo microscópico de células en división. Fuente: elaboración Dra. Evarista Arellano-García, con la ayuda de Biorender®.

bulbo debe lavarse cuidadosamente con agua potable o destilada para eliminar residuos o contaminantes.

Para la exposición, los bulbos se colocan individualmente en tubos cónicos Falcon de 50 mL que contengan 10 mL de la sustancia de prueba o agua destilada (grupo control). El contacto del bulbo con el líquido debe ser suficiente para cubrir la base y favorecer el crecimiento de las raíces en condiciones controladas.

Tratamiento de bulbos de *Allium cepa*

Los bulbos seleccionados se colocan individualmente en tubos cónicos Falcon de 50 mL, cada uno con 10 mL de agua destilada (grupo control negativo) o con la disolución correspondiente del agente a evaluar. Posteriormente, se incuban en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente constante ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 72 horas.

Para el control positivo, se utiliza un agente genotóxico de referencia, como la colchicina o la ciclofosfamida. En este caso, los bulbos se exponen durante una hora a la solución del agente en la dosis establecida y, posteriormente, se trasladan a tubos con agua destilada libre del compuesto para completar el periodo total de incubación bajo las mismas condiciones que el resto de los tratamientos.

En los grupos experimentales, por ejemplo, en pruebas con fertilizantes, se sigue un protocolo similar: exposición inicial de una hora a la disolución de prueba, seguida por incubación en agua destilada hasta completar las 72 horas. Con el fin de mantener la estabilidad de las concentraciones y asegurar condiciones homogéneas, tanto las disoluciones de prueba como el agua destilada utilizada en los controles se reemplazan diariamente. Para cada tratamiento se realizan tres ensayos independientes, con tres bulbos por experimento.

Recolección y preparación de muestras para análisis microscópico

Transcurridas las 72 horas de incubación, se recolectan de cada bulbo entre dos y tres milímetros del extremo de al menos siete raíces, ya que esta región contiene el tejido meristemático donde ocurre la división celular activa. Las raíces se fijan inmediatamente en solución de Carnoy (etanol:ácido acético, 3:1) durante un periodo adecuado. Luego se reali-



za un enjuague breve con agua destilada durante 30 segundos.

Posteriormente, cada muestra se coloca sobre un portaobjeto limpio y se añaden dos gotas de aceto-orceína al 2% como colorante. Se cubre el tejido con un cubreobjetos y se aplica calor suave durante aproximadamente un minuto, asegurándose de que la muestra permanezca húmeda. Si es necesario, se puede añadir más colorante para intensificar la tinción y mejorar el contraste.

A continuación, se realiza el montaje por presión (squash), presionando de forma firme pero controlada el cubreobjetos sobre el portaobjetos, con el objetivo de dispersar las células en un único plano para facilitar la visualización de las distintas fases mitóticas. Si tras el extendido es necesario ajustar la tinción, puede levantarse cuidadosamente el cubreobjetos con una aguja de disección, añadir una gota adicional de aceto-orceína, y reposicionar el cubreobjetos sobre la muestra.

Una vez preparado el montaje, los portaobjetos están listos para su observación microscópica. El análisis se realiza por triplicado, asegurando la reproducibilidad de los resultados.

Examen macroscópico

Los parámetros macroscópicos se evalúan después de un periodo de exposición de 72 horas. En esta etapa, se cortan las raíces desde su base y se procede a contar el número de raíces emitidas por cada bulbo, así como a medir su longitud individual. Posteriormente, se calcula la suma del largo total de las raíces por bulbo, y este valor se expresa como la longitud total del sistema radicular. Este parámetro constituye un indicador indirecto de citotoxicidad, dado que los xenobióticos pueden inhibir o estimular el crecimiento de las raíces dependiendo de su mecanismo de acción.

Análisis por microscopía óptica

Las muestras teñidas se examinan mediante microscopía óptica, utilizando aumentos progresivos de 10X, 40X y 100X, en ese orden, con el fin de localizar y analizar las células meristemáticas. El objetivo es identificar y contar las cuatro fases principales de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase), así como las células en interfase. Durante



la observación se registran eventos de genotoxicidad, tales como aberraciones cromosómicas (puentes de anafase, fragmentos cromosómicos, entre otros) y la presencia de micronúcleos.

Para asegurar validez estadística, se recomienda analizar un mínimo de 1,000 células por ejemplar, utilizando al menos tres bulbos por tratamiento experimental (Santos et al., 2023).

Biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad en *Allium cepa*

El ensayo *Allium cepa* permite la evaluación simultánea de citotoxicidad y genotoxicidad a través del análisis de diversos biomarcadores. Entre los más utilizados destacan el índice mitótico, el tiempo de fase, el porcentaje de células aberrantes y la frecuencia de micronúcleos. Estos indicadores permiten caracterizar los efectos de sustancias químicas sobre el ciclo celular y la integridad del material genético.

El índice mitótico (IM) es un parámetro clave que representa la proporción de células en división activa: profase (P), metafase (M), anafase (A) y telofase (T) respecto al total de células observadas. Se calcula mediante la fórmula:

El índice mitótico se utiliza como indicador del potencial proliferativo del tejido, y cualquier desviación significativa respecto al grupo control puede interpretarse como un efecto citotóxico. Una disminución del IM por debajo del 50% en comparación con el control negativo puede indicar inhibición de la división celular, reflejando efectos adversos sobre el crecimiento y desarrollo del organismo expuesto. Por el contrario, un aumento anormal del IM puede sugerir proliferación acelerada, lo cual no necesariamente es positivo, ya que podría asociarse con procesos displásicos o incluso carcinogénesis temprana. Por esta razón, el índice mitótico se evalúa en conjunto con parámetros de crecimiento radicular (Fiskesjö et al., 1993; Leme y Marin-Morales, 2009; Sabeen et al., 2020).

Otro biomarcador es el tiempo de fase mitótica, el cual permite estimar la duración relativa de cada etapa del ciclo celular y se calcula mediante la siguiente expresión:

Este valor se interpreta como una estimación del tiempo que las células tardan en completar una fase específica dentro del ciclo celular de

Allium cepa, el cual tiene una duración estimada promedio de 12 horas (Urteaga et al., 2005).

El biomarcador porcentaje de células aberrantes (% Cel_Ab), constituye un indicador directo de daño cromosómico. Las aberraciones se clasifican según su aparición en distintas fases de la mitosis y pueden incluir puentes cromatídicos, fragmentos rezagados, cromosomas viscosos, cromosomas segregados de manera anómala, células binucleadas, lesiones nucleares y células gigantes. Este porcentaje se calcula con base en la siguiente fórmula:

Un aumento significativo en este biomarcador indica que el agente evaluado tiene potencial clastogénico o aneugénico, comprometiendo la integridad estructural o numérica del material genético (Sabeen et al., 2020).

La frecuencia de micronúcleos es uno de los biomarcadores más sensibles y ampliamente utilizados para evaluar genotoxicidad en el modelo *Allium cepa*. Su detección permite identificar daños en el material genético inducidos por agentes clastogénicos o aneugénicos, manifestados como pequeños cuerpos redondos extracromosómicos presentes en el citoplasma de las células en interfase o telofase. Estos cuerpos se originan a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que no logran incorporarse al núcleo principal durante la mitosis.

Para su evaluación, se analizan al menos 1,000 células en división por bulbo, seleccionadas aleatoriamente en diferentes campos microscópicos. Se recomienda realizar el conteo en triplicado, es decir, en tres bulbos independientes por tratamiento, a fin de asegurar la reproducibilidad y robustez estadística del ensayo.

Cabe destacar que, dentro del conjunto de biomarcadores empleados en el ensayo *Allium cepa*, la frecuencia de micronúcleos es el más reportado en la literatura científica. Esta amplia aceptación se debe a su alta sensibilidad, facilidad de observación y correlación directa con el daño genético. Por ello, un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos respecto al grupo control representa una señal clara del potencial genotóxico del agente evaluado (Sabeen et al., 2020).

Identificación de fases celulares y alteraciones cromosómicas en el ensayo *Allium cepa*

En el análisis citogenético con *Allium cepa*, es fundamental establecer criterios precisos para reconocer las células en interfase, las distintas fases de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase), así como para identificar células aberrantes y células micronucleadas. Esta clasificación permite cuantificar adecuadamente los biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad, garantizando consistencia y validez en los resultados obtenidos.

Las alteraciones cromosómicas observadas se agrupan, según su origen, en clastogénicas y aneugénicas. Las alteraciones clastogénicas se deben a rupturas físicas en el ADN o los cromosomas, y se manifiestan típicamente como puentes de anafase o fragmentos cromosómicos. En contraste, las alteraciones aneugénicas se relacionan con disfunciones del huso mitótico que afectan la correcta segregación cromosómica. Entre las manifestaciones de este tipo de daño se encuentran las C-metafases, cromosomas rezagados, pérdidas cromosómicas, divisiones multipolares y adherencia cromosómica (Leme y Marin-Morales, 2009). Además, algunas de estas alteraciones pueden estar asociadas con la inhibición de la citocinesis, lo que favorece la formación de células binucleadas o multinucleadas.

Caracterización morfológica de fases celulares y aberraciones en *Allium cepa*

El ensayo *Allium cepa* permite observar con gran claridad el ciclo celular en células meristemáticas de raíz, así como detectar diversas alteraciones morfológicas que actúan como biomarcadores confiables de citotoxicidad y genotoxicidad. El reconocimiento preciso de las fases de la mitosis, así como de aberraciones cromosómicas y nucleares, es clave para interpretar los efectos de agentes químicos y físicos en los organismos expuestos.

Las células en interfase, como se muestra en la figura 18a, presentan un núcleo bien definido, de contorno regular y cromatina finamente granular. En muchos casos, se observan nucleolos visibles como esferas claras dentro del núcleo, debido a su alto contenido de ARN, que no se

tiñe con intensidad. Conforme se aproxima la división celular, el núcleo se vuelve más voluminoso y los nucleolos se hacen más prominentes, lo que indica una mayor actividad transcripcional previa al inicio de la mitosis.

En la profase (Fig. 18b), se inicia la espiralización de la cromatina, que comienza a adoptar formas de cordones irregulares. A medida que avanza esta fase, la envoltura nuclear empieza a desorganizarse. En la prometafase, representada en la misma figura, la membrana nuclear ya no es visible y los cromosomas se movilizan hacia el plano ecuatorial.

Durante la metafase, como se observa en la Fig. 18c, los cromosomas se alinean con precisión en el centro de la célula. En esta etapa se activa

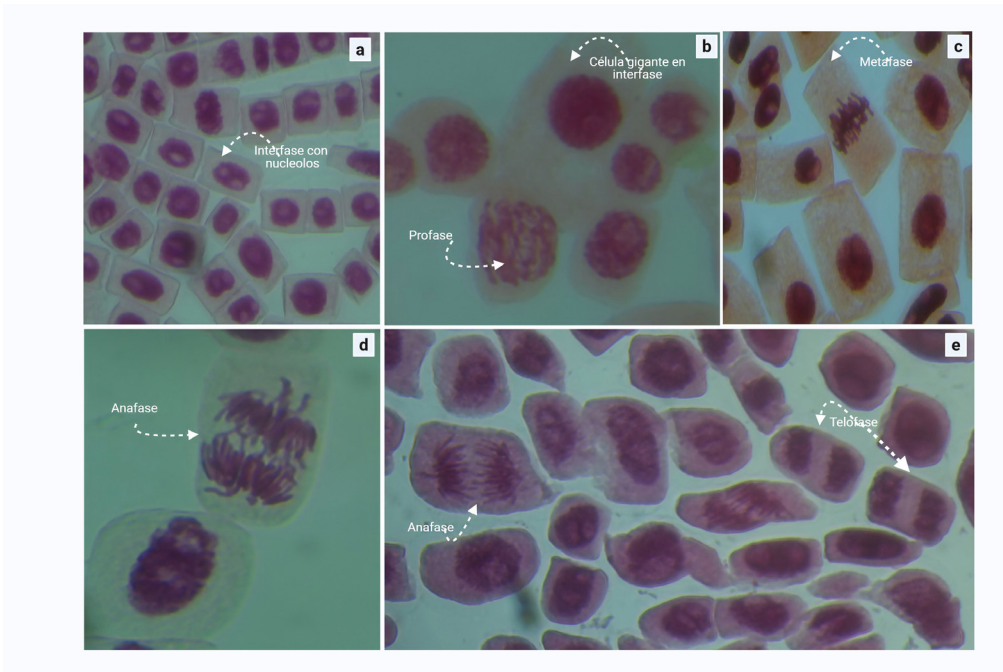


Figura 18. Fases del ciclo celular y características citológicas en células meristemáticas de *Allium cepa*. a) células en interfase con nucleolos visibles b) célula gigante en interfase y célula en profase; c) célula en metafase con cromosomas alineados en el plano ecuatorial; d) célula en anafase, con cromátidas en separación hacia los polos; e) Células en telofase, con reorganización nuclear, y anafase adicional en el mismo campo. Cortesía de la Dra. en C. Olivia Torres Bugarín.

un punto de control crítico, el Anaphase Promoting Complex (APC), que asegura que los cromosomas estén correctamente alineados antes de permitir su separación. Su inhibición por agentes tóxicos puede detener la progresión mitótica o inducir errores en la segregación.

La anafase (Figura 18d y 18e) se caracteriza por la migración sincrónica de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos. Un patrón anafásico incompleto o desorganizado puede indicar una alteración en la velocidad de división celular o un fallo en el aparato mitótico. Finalmente, en la telofase, los cromosomas inician su descondensación y se reconstituye la envoltura nuclear en cada célula hija. En esta etapa, que también puede apreciarse en la Figura 18e, las células suelen aparecer sincrónicas, de tamaño similar, y con núcleos bien definidos.

Además de las fases del ciclo celular, el modelo *Allium cepa* permite identificar diversas anomalías estructurales que reflejan daño genético. Estas alteraciones pueden clasificarse en clastogénicas y aneugénicas. Las clastogénicas, como los puentes cromosómicos (Fig. 19k), resultan de la ruptura física de cromosomas, generalmente provocada por agentes que interfieren con la integridad del ADN. Por su parte, las aneugénicas reflejan alteraciones en el huso mitótico y la segregación cromosómica. Ejemplos de estas son las C-mitosis (Fig. 19a), los cromosomas viscosos (Fig. 19b), rezagados (Figura 19c), dispersos (Fig. 19d) y las divisiones multipolares (Fig. 19l), todas asociadas con agentes capaces de interferir en la organización y función del huso mitótico.

Las células binucleadas (Fig. 19e) evidencian un fallo en la citocinesis al final del proceso mitótico. Las células gigantes (Fig. 19h), son típicamente poliploides y suelen derivarse de procesos de endoreduplicación o endomitosis. Estas anomalías reflejan eventos de duplicación sin división.

Entre los eventos más relevantes para la evaluación de genotoxicidad está la presencia de micronúcleos. Estos pueden observarse tanto en anafase como en telofase (Fig. 19j), o bien en células ya estabilizadas en interfase (Fig. 19n). Su detección y cuantificación constituyen uno de los indicadores más sensibles del ensayo *Allium cepa*.

También es posible identificar gemas nucleares (Figs. 19f y 19g), que se manifiestan como extensiones nucleares pequeñas. Estas estructuras

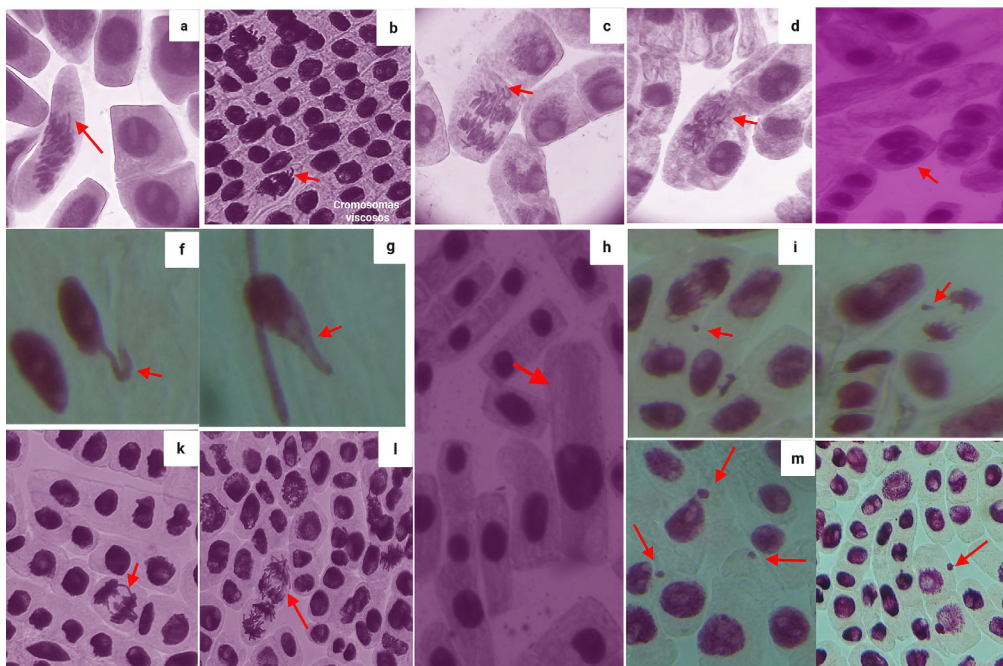


Figura 19. Alteraciones cromosómicas y nucleares observadas en células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a agentes genotóxicos. Se muestran diferentes tipos de anomalías: a) C-metáfase; b) cromosomas viscosos; c) cromosoma rezagado; d) cromosomas dispersos; e) célula binucleada; f-g) gemas nucleares; h) célula gigante; i-j) micronúcleos observados en anafase y telofase, respectivamente; k) puente cromosómico; l) división multipolar; m-n) células con micronúcleo en interfase. Estas alteraciones no se observan en células F1 de raíces normales y su presencia indica daño citogenético derivado de exposición a xenobióticos. Cortesía de la Dra. en C. Olivia Torres Bugarín.

pueden ser producto de intentos de eliminación de material genético dañado o excedente, y se han asociado con procesos de reparación o de respuesta a estrés genotóxico.

Cabe señalar que muchas de estas alteraciones — micronúcleos, gemas, binucleación, puentes cromosómicos, entre otras — no se presentan en condiciones normales en células de raíz F1 de *Allium cepa*. Su aparición en tratamientos experimentales es indicativa de un efecto directo del agente evaluado sobre la estabilidad genética y la integridad celular. La precisión con la que estas estructuras pueden ser identificadas bajo el

microscopio óptico hace de este modelo vegetal una herramienta poderosa y de bajo costo para estudios de monitoreo ambiental, toxicología genética y evaluación de riesgo.

El ensayo *Allium cepa* se ha consolidado como una herramienta versátil, sensible y accesible para la evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad en contextos experimentales y ambientales. Su capacidad para evidenciar alteraciones en el ciclo celular, así como una amplia gama de anomalías cromosómicas y nucleares, lo convierte en un modelo de referencia tanto en estudios de laboratorio como en monitoreo de contaminantes ambientales. La observación sistemática de fases mitóticas, la cuantificación del índice mitótico y la identificación de biomarcadores como micronúcleos, gemas nucleares y divisiones aberrantes permiten establecer relaciones claras entre la exposición a xenobióticos y el daño genético inducido.

Además de su relevancia científica, la simplicidad metodológica, el bajo costo y la capacidad de detectar efectos agudos y subletales hacen del ensayo *Allium cepa* una herramienta educativa poderosa, ampliamente utilizada también en la formación de estudiantes en genética, toxicología y ecología. En conjunto, sus características técnicas, interpretativas y pedagógicas reafirman su valor en el estudio de los efectos de sustancias potencialmente peligrosas sobre los organismos vivos y el medio ambiente.

LITERATURA CITADA

- Albertini, R.J., & Kaden, D.A. (2020). Mutagenicity monitoring in humans: Global versus specific origin of mutations. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 786:108341.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108341>.
- Amini, F., Farhadi, S., Shahbeik, S., Mohammadi, M.M., & Rakhshan, V. (2023). Effects of fixed orthodontic treatment with and without chlorhexidine mouthwash on vitality of oral mucosal cells reflected by cell nuclear indexes: A preliminary 3-phase before-after clinical trial. *International Orthodontics*, 21(1), 100722.
<https://doi.org/10.1016/j.ortho.2023.100722>.
- Antoniou, E.E., Rooseboom, M., Kocabas, N.A., North, C.M., & Zeegers, M.P. (2023). Micronuclei in human peripheral blood and bone marrow as genotoxicity markers: A systematic review and meta-analysis. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 891:503689.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503689>.
- Arbogast, F., & Gros, F. (2018). Lymphocyte autophagy in homeostasis, activation, and inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 1801.
- Arellano-García, M. E., Camarena-Ojinaga, M. de L., Von-Glascoe, C. A., Ruiz-Ruiz, B., Zúñiga-Violante, E., Montaña Soto, T., Camarena-Ojinaga, L., Von-Glascoe, C.A., & Zúñiga Tatiana, E. M. (2012). Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California. En SEMARNAT-Instituto Nacional de Ecología. Género, Ambiente y Contaminación Por Sustancias Químicas.
- Arellano-García, M.E., Izaguirre-Pérez, M.E., Molina-Noyola, L.D., Castañeda-Yslas, I.Y., Luna-Vázquez-Gómez, R., & Torres-Bugarín, O. (2020). Genetic instability of a polydactyl hypopigmented cat with squamous cell carcinoma — A Case Report. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 258.
- Arellano-García, M.E., Torres-Bugarín, O., García-García, M.R., García-Flores, D., Toledano-Magaña, Y., Sanabria-Mora, C.S., Castro-Gamboa, S., & García-Ramos, J.C. (2021). Genomic Instability and Cyto-Genotoxic Damage in Animal Species. In: Updates on Veterinary Anatomy and Physiology. Edited by Catrin Sian



- Rutland and Samir A.A. El-Gendy. Ed. Intech Open. 1-19.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.99685>.
- Arnautoglou, C., Keivanidou, A., Dragoutsos, G., Tentas, I., Meditskou, S., Zarogoulidis, P., Matthaios, D., Sardeli, C., Ioannidis, A., Perdikouri, E.I., & Giannopoulos, A. (2022). Factors affecting the nuclei in newborn and children. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19 (7), 4226.
<https://doi.org/10.3390/ijerph19074226>.
- Arnaudo, M.E., Konicoff, A., & Solussoglia, A.M. (2013). Guía de procedimiento para citología exfoliativa. *Revista Bioanálisis*. 8-19.
- Asociación Médica Mundial. (2019). Declaración de Helsinki de la AMM-Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.
 URL: <https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>. 2019.
- Backer, L. C., Grindem, C. B., Corbett, W. T., Cullins, L., & Hunter, J. L. (2001). Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Science of the Total Environment*, 274(1-3), 161-169. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00740-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00740-9)
- Batista-González, C., Corona-Rivera, J.R., Gómez-Meda, B.C., Zamora-Pérez, A., Ramos-Ibarra, M.L., & Zúñiga-González, G. (2006). Micronucleated erythrocytes in preterm newborns in relation to maternal pathology. *Revista Biomédica*, 17(1), 11-16.
- Benvindo-Souza, M., Assis, R.A., Oliveira, E.A.S., Borges, R.E., & Santos, L.R.D.S. (2017). The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 27724-27730.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0727-2>.
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.
- Bolognesi, C., & Holland, N. (2016). The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 183-203.
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., & Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay—An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(2), 100-113.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002>.
- Bolognesi, C., Roggieri, P., Ropolo, M., Thomas, P., Hor, M., Fenech, M., Nersesyan, A., & Knasmueller, S. (2015). Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra-and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*, 30(4), 545-555.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gev017>.
- Bonassi, S., & Fenech, M. (2021). Roadmap for translating results from the micronucleus assay into clinical practice: From observational studies to randomized controlled trials. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 788:108390.



- <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108390>.
- Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Burgaz, S., & HUMNXL Project Consortium. (2009). State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis*, 24(4), 295-302.
- <https://doi.org/10.1093/mutage/geb019>.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., & Fenech, M. (2011). The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(3), 88-97.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., & Zijno, A. (2001). HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and molecular mutagenesis*, 37(1), 31-45.
- [https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2001\)37:1%3C31::AID-EM1004%3E3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2001)37:1%3C31::AID-EM1004%3E3.0.CO;2-P)
- Brenneke, H. (1937). Strahlenschädigung von Mäuse-und Rattensperma, beobachtet an der Frühentwicklung der Eier. *Strahlentherapie*, 60, 214-238.
- Brina, K.R., Carvalho, T.S., Ardenghi, P.G., & da Silva, L.B. (2018). Micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated buccal cells of urban solid waste collectors and recyclers in southern Brazil. *Chemosphere*, 193, 1058-1062.
- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.119>.
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255(5505), 197-200.
- <https://doi.org/10.1038/255197a0>.
- Carrillo-Novia, I., Lara-Carrillo, E., Torres-Bugarin, O., Morales-Valenzuela, A. A., Salmerón-Valdés, E. N., Hegazy-Hassan, W., & Toral-Rizo, V. H. (2023). Use of liquid-based cytology samples reveals genomic instability and cell death in patients undergoing orthodontic treatment. *Journal of Oral Science*, 65(1), 24-28.
- Casartelli, G., Monteghirfo, S., De Ferrari, M., Bonatti, S., Scala, M., Toma, S., Margarino, G., & Abbondandolo, A. (1997). Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 19(6), 475-481.
- Casillas-Figueroa, F., Arellano-García, M. E., Leyva-Aguilera, C., Ruíz-Ruíz, B., Luna Vázquez-Gómez, R., Radilla-Chávez, P., & Bogdanchikova, N. (2020). Argovit™ silver nanoparticles effects on *Allium cepa*: Plant growth promotion without cytogenotoxic damage. *Nanomaterials*, 10(7), 1386.
- <https://doi.org/10.3390/nano10071386>.
- Castañeda-Yslas, I. J., Arellano-García, M. E., García-Zarate, M. A., Ruíz-Ruíz, B., Zavala-Cerna, M. G., & Torres-Bugarín, O. (2016). Biomonitoring with micronuclei test in buccal cells of female farmers and children exposed to pesticides of Ma-



- neadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of toxicology*, 2016(1), 7934257.
<https://doi.org/10.1155/2016/7934257>.
- Catena, C., Conti, D., Villani, P., Nastasi, R., Archilei, R., & Righi, E. (1994). Micronuclei and 3AB index in human and canine lymphocytes after in vitro X-irradiation. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(1), 1-8.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90002-7).
- Celik, A., Diler, S.B., & Eke, D. (2010). Assessment of genetic damage in buccal epithelium cells of painters: micronucleus, nuclear changes, and repair index. *DNA and cell biology*, 29(6), 277-284.
<https://doi.org/10.1089/dna.2009.0996>
- Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., & Bonassi, S. (2010). Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(1), 11-19.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.11.001>
- Cesta, M. F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen.
- Ceyca, J.P., Torres-Bugarín, O., Castillo-Guerrero, J.A., & Betancourt-Lozano, M. (2014). Seabird embryos as biomonitors of micronucleogenic genotoxic agents: potential application for the coasts of Mexico. *Avian Biology Research*, 7(4), 223-234.
<https://doi.org/10.3184/175815514X14162211300859>.
- Chen, Q., Sun, L., & Chen, Z.J. (2016). Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature immunology*, 20;17(10):1142-1149. <https://doi.org/10.1038/ni.3558>.
- Cheong, H. S. J. J., Seth, I., Joiner, M. C., & Tucker, J. D. (2013). Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 28(4), 433-440.
<https://doi.org/10.1093/mutage/get020>.
- Clones. *Experimental Cell Research*, 76(1), 170-174.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(73\)90432-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(73)90432-1).
- Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS. MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). (1995). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS. MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10(3), 153-159.
- Correa, M.N.; Ventura V & da Silva T. 2016. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. *Chemosphere*, 148: 481- 486.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.071>.
- Countryman, P.I., & Heddle, J.A. (1977). A true microculture technique for human lymphocytes. *Human Genetics*, 35(2), 197-200.
<https://doi.org/10.1007/BF00393970>.



- Countryman, R.I., & Heddle, J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 41(2-3), 321-331.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(76\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(76)90105-6).
- Cuello-Almarales, D.A., Almaguer-Mederos, L.E., Vázquez-Mojena, Y., Almaguer-Gotay, D., Zayas-Feria, P., Laffita-Mesa, J.M., González-Zaldívar, Y., Aguilera-Rodríguez, R., Rodríguez-Estupiñán, A., & Velázquez-Pérez, L. (2017). Buccal cell micronucleus frequency is significantly elevated in patients with spinocerebellar ataxia type 2. *Archives of Medical Research*, 48(3), 297-302.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.06.008>.
- da Silva Souza, T., Christofoletti, C. A., Bozzatto, V., & Fontanetti, C. S. (2014). The use of diplopods in soil ecotoxicology—A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 103, 68-73.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.025>.
- D'Alessandro, A., Hansen, K.C., Eisenmesser, E.Z., & Zimring, J.C. (2019). Protect, repair, destroy or sacrifice: a role of oxidative stress biology in inter-donor variability of blood storage? *Blood Transfus.* 17: 281-8.
<https://doi.org/10.2450/2019.0072-19>.
- Danica, H. H., & Dunja, R. (2007). Micronuclei in lymphocytes of horses and pigs after *in vitro* irradiation. *Acta Veterinaria-Beograd*, 57(4), 341-350.
<https://doi.org/10.2298/AVB0704341H>
- Dawson, D. W., & Bury, H. P. R. (1961). The significance of Howell-Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears. *Journal of Clinical Pathology*, 14(4), 374-380.
<https://doi.org/10.1136/jcp.14.4.374>.
- de Souza, C. P., Guedes, T. D. A., & Fontanetti, C. S. (2016). Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-12.
<https://doi.org/10.1007/s10661-016-5702-8>.
- Dindgire, S. L., Gosavi, S., Kumawat, R. M., Ganvir, S., & Hazarey, V. (2012). Comparative study of exfoliated oral mucosal cell micronucleus frequency in potentially malignant and malignant lesions. *International Journal of oral & Maxillofacial pathology*, 3(2), 15-21.
<http://journalgateway.com/index.php/ijomp>.
- Dönmez-Altuntas, H., Hamurcu, Z., Liman, N., Demirtas, H., & Imamoglu, N. (2006). Increased micronucleus frequency after oral administration of cadmium in dogs. *Biological Trace Element Research*, 112(3), 241-246.
<https://doi.org/10.1385/BTER:112:3:241>
- Drážovská, M., Šivíková, K., Holečková, B., Dianovský, J., Galdíková, M., & Schwarzbacherová, V. (2016). Evaluation of potential genotoxic/cytotoxic effects induced by epoxiconazole and fenpropimorph-based fungicide in bovine lymphocytes *in vitro*. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants,*



- and *Agricultural Wastes*, 51(11), 769-776.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1198643>
- El-Samad, L.M., El-Ashram, S., Kheirallah, D.A., Abdul-Aziz, K.K., Toto, N.A., & Mokhamer, E.H.M. (2021). Relative gene expression, micronuclei formation, and ultrastructure alterations induced by heavy metal contamination in *Pimelia latreillei* (Coleoptera: Tenebrionidae) in an urban-industrial area of Alexandria, Egypt. *PLoS One*. 23;16(6) e0253238.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253238>.
- Evans, H. J., Neary, G. J., & Williamson, F. S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1(3), 216-229.
<https://doi.org/10.1080/09553005914550311>
- Farag MR, & Alagawany M. (2018). Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico - Biological Interactions*, 5(279), 73-83.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>.
- Fareed, M., Afzal, M., & Siddique, Y.H. (2011). Micronucleus investigation in buccal mucosal cells among pan masala/ gutkha chewers and its relevance for oral cancer, *Biology and Medicine*, 3(2), 8-15.
- Farhadi, S., Mohamadi, M., & Mohamadi, M. (2017). Repair index in examination of nuclear changes in the buccal mucosa of smokers: a useful method for screening oral cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(11), 3087.
<https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.11.3087>.
- Fenech, M. & Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 147, 29-36.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9).
- Fenech, M. (2001). The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1), 57-67.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00079-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00079-3).
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-104.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>.
- Fenech, M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes*, 11(10), 1203. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>.
- Fenech, M., & Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA Damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43-49.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq050>.



- Fenech, M., & Crott, J.W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 131-136. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00086-6).
- Fenech, M., & Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(86\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90010-2).
- Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W. P., & Zijno, A. (2003b). Intra-and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes: Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 45-64. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00248-6).
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003a). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 65-75.
- Fenech, M., Crot, J., Turner, J., & Brown, S. (1999a). Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measure simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, 14(6), 605-612. <https://doi.org/10.1093/mutage/14.6.605>.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., & Bonassi, S. (1999b). The HUMAN MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1-2), 271-283. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00053-8).
- Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., & Bonassi, S. (2011). The HUMN and HUM-NxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis*, 26(1), 239-245. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq051>.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, L.H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-13. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Knudsen, L.E., Kirsch-Volders, M., Deo, P., Franzke, B., Stopper, H., Andreassi, M.G., Bolognesi, C., Dhillon, V.S., Laffon, B., Wagner, K.H.,



- & Bonassi, S. (2021). "Micronuclei and Disease" special issue: Aims, scope, and synthesis of outcomes. *Mutation Research*, 788, 108384.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108384>.
- Fernández, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., & Zoll-Moreux, C. (1993). Amphibian micronucleus test (s): a simple and reliable method for evaluating *in vivo* genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. *Mutation Research Environmental Mutagen*, 292(1), 83-99.
- Ferré, D. M., Luduena, H. R., Romano, R. R., & Gorla, N. B. M. (2020). Evaluation of the genotoxic potential of cypermethrin, chlorpyrifos and their subsequent mixture, on cultured bovine lymphocytes. *Chemosphere*, 243, 125341.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125341>
- Fiskesjö, G. (1974) G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1985), 99-112.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>.
- Fiskesjö, G. (1993). The Allium Test - A Potential Standard for the Assessment of
- Flores-Galván, M.A., Daesslé, L.W., Arellano-García, M.E., Torres-Bugarín, O., Macías-Zamora, J.V., & Ruiz-Campos, G. (2020). Genotoxicity in fishes environmentally exposed to As, Se, Hg, Pb, Cr and toxaphene in the lower Colorado River basin, at Mexicali valley, Baja California, México. *Ecotoxicology*. 29 (4), 493-502.
<https://doi.org/10.1007/s10646-020-02200-9>.
- Flores-García, A., Torres-Bugarin, O., Velarde-Félix S.J., Rangel-Villalobos, H., Zepe-da-Carrillo, E.A., Rodríguez-Trejo, A., Aguilar-García, P., & Nersesyan, A. (2014). Micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated buccal mucosa cells of Mexican women with breast cancer. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 19 (4), 895-9.
- Gauthier, B. R., & Comaills, V. (2021). Nuclear envelope integrity in health and disease: consequences on genome instability and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7281.
- Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M.G., Montero-Montoya, R., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Favero Salvadori, D.M., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarín, O., Yadav, A.S., Zúñiga-González, G., & Fenech, M. (2011). The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(3), 88-97.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.005>.
- Gómez-Meda, B.C., Zamora-Perez, A.L., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Ramos-Ibarra, M.L., Torres-Bugarín, O., Batista-González C.M., & Zúñiga-González, G.M. (2006). Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian pathology*, 35(3), 206-210.
<https://doi.org/10.1080/03079450600711003>.



- Grover, S., Mujib, A.B.R., Jahagirdar, A., Telagi, N., & Kulkarni, P. G. (2012). A comparative study for selectivity of micronuclei in oral exfoliated epithelial cells. *Journal of cytology/Indian academy of cytologists*, 29(4), 230.
<https://doi.org/10.4103/0970-9371.103940>.
- Guirola, F.J., Mastrapa, O.H., García, G.Y., Pérez, B.L., Cisnero, N., & Batista, R.Y. (2019). Caracterización de la intoxicación por plomo. Revisión bibliográfica. RE-TEL. *Revista de Toxicología en Línea*. 59: 39-63.
- HaeJune, L., ChangMo, K., SeRa, K., JinHee, L., JoongSun, K., JongChoon, K., IllHwa, K., TaeHwan, K., SiYun, R., SungKee, J., SooYong, C., & Kim, S. (2005). Incidence of micronuclei in lymphocytes of pig in the high background radiation area (Cheongwon-gun and Boeun-gun). *Korean Journal of Veterinary Research*, 45(4), 469-475.
- Harabawy, A. S., & Mosleh, Y. Y. (2014). The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 28-35.
- Hayama, F.H., Motta, A.C., & Migliari, D.A. (2005). Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 10(2), 115-122.
- Hayashi, M. (1992). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 278(2-3), 83-98.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90215-L](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90215-L).
- Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Adler, I. D., Blakey, D.H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., & Sutou, S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design include repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 234-252.
- Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Blakey, D.H., Derlinger, S. D., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Asano, N., Suzuki, H., Ohyama, W., & Gibson, D. (2007). *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(1), 10-30.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.010>.
- Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., & Vannier, B. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(3), 293-304.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90039-6).
- Hayretdağ, S., Gürkan, M., Yakin, B., & Tok, C. (2014). A preliminary study on micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of some Colubrid snakes from Turkey. *Biharean Biologist*, 8(1), 53-55.
<http://biozoojournals.ro/bihbiol/index.html>



- Heddle, J. A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 18(2), 187-190.
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., & MacGregor, J. T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(4), 277-291.
- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., & Salamone, M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*.123(1), 61-118.
[https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90047-7).
- Heitland, P., & Köster, H.D. (2021). Human biomonitoring of 73 elements in blood, serum, erythrocytes and urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 64:126706.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33352468/>
- Himes, R.H., Kersey, R.N., Ruscha, M., & Houston, L.L. (1976). Cytochalasin a inhibits the *in vitro* polymerization of brain tubulin and muscle actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 68(4), 1362-1370.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90346-6).
- Hintzsche, H., Hemmann, U., Poth, A., Utesch, D., Lott, J., & Stopper, H. (2017). Working Group “*In vitro* micronucleus test”, Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM, German-speaking section of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society EEMGS). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 771, 85-98.
- Hoehn, H., Sprague, C. A., & Martin, G. M. (1973). Effects of cytochalasin B on cultivated human diploid fibroblasts and its use for the isolation of tetraploid clones. *Experimental Cell Research*, 76(1), 170-174.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1-2), 93-108.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>.
- Howell, W.H. (1890). The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *Journal of Morphology*, 4, 57-116.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1050040105>.
- Instituto Nacional de Ecología. INECOL, Vol. 1, Issues 95-113, 95-113. *International Journal of Oral Science*, 5(2), 59-65.
<https://doi.org/10.1038/ijos.2013.24>
- Jalili, S., & Naderi, N. J. (2022). Comparison of repair index in cigarette and waterpipe smokers: A bio-monitoring assessment using human exfoliated buccal mucosa cells. *International Journal of Preventive Medicine*, 13(1), 27.



- Jara-Ettinger, A.C., López-Tavera, J.C., Zavala-Cerna, M.G., & Torres-Bugarín, O. (2015). Genotoxic Evaluation of Mexican Welders Occupationally Exposed to Welding-Fumes Using the Micronucleus Test on Exfoliated Oral Mucosa Cells: A Cross-Sectional, Case-Control Study. *PLoS One*, 5, 10(8), e0131548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131548>.
- Jiang, H., Panda, S., & Gekara, N.O. (2019). Comet and micronucleus assays for analyzing DNA damage and genome integrity. *Methods Enzymol*, 625, 299-307. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.05.015>.
- Jois, H.S., Kale, A.D., & Mohan Kumar, K.P. (2010). Micronucleus as potential biomarker of oral carcinogenesis. *Indian Journal of Dental Advancements*, 2(2), 197-202.
- Jolly, M. (1907). Recherches sur la formation des globules rouges des mammifères. *Arch. D'anatomie Microsc.*, 9, 133-314.
- Juneja, S., Katyal, S., Rathore, A.S., Shetty, D.C., Tandon, A., & Jain, P. (2019). Utility of DNA-specific stains in micronuclei assay as a marker of genotoxicity in oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cytology*, 36(2), 111. https://doi.org/10.4103/joc.joc_230_16
- Kashyap, B., & Reddy, P.S. (2012). Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *Journal of cancer research and therapeutics*, 8(2), 184-191. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.98968>.
- Kim, S. H., Han, D. U., Lim, J. T., Jo, S. K., & Kim, T. H. (1997). Induction of micronuclei in human, goat, rabbit peripheral blood lymphocytes and mouse splenic lymphocytes irradiated *in vitro* with gamma radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 393 (3), 207-214. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00103-4)
- Kim, S. R., Kim, T. H., Ryu, S. Y., Lee, H. J., Oh, H., Jo, S. K., ... & Kim, S. H. (2003). Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated *in vitro* with gamma radiation. *In Vivo (Athens, Greece)*, 17(5), 433-438. <https://europepmc.org/article/med/14598606>
- Kiran, K., Agarwal, P., Kumar, S., & Jain, K. (2018). Micronuclei as a predictor for oral carcinogenesis. *Journal of cytology*, 35(4), 233-236.
- Kirsch-Volders, M., & Fenech, M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16(1), 51-58. <https://doi.org/10.1093/mutage/16.1.51>.
- Kirsch-Volders, M., Bolognesi, C., Ceppi, M., Bruzzzone, M., & Fenech, M. (2020). Micronuclei, inflammation and auto-immune disease. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 786, 108335.
- Kirsch-Volders, M., Fenech, M., & Bolognesi, C. (2018). Validity of the Lymphocyte Cytokinesis- Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human ex-



- posure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 47-52.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.010>.
- Krishna-Volders, M., Mateuca, R. A., Roelants, M., Tremp, A., Zeiger, E., Bonassi, S., ... & Fenech, M. (2006). The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes *in vivo*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(5), 1038-1042.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0487>.
- Krishna G, & Hayashi M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Reserch*. 20;455 (1-2),155-66.
[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00117-2).
- Krishna, G., Fiedler, R., & Theiss, J. C. (1992). Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenecity and toxicity in the mouse micronucleus assay using immunofluorescence. *Mutation Research*, 282(3), 159-167.
[https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90090-5](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90090-5)
- Krupina, K., Goginashvili, A., & Cleveland, D. W. (2021). Causes and consequences of micronuclei. *Current Opinion in Cell Biology*, 70, 91-99.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.004>.
- Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the total environment*, 407(19), 5243-5246.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>.
- Kwasniewska, J., & Bara, A. W. (2022). Plant cytogenetics in the micronuclei investigation – the past, status, and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1306. <https://doi.org/10.3390/ijms23031306>.
- Labrada-Martagón, V., Teneriá, F.A.M., & Zenteno-Savín, T. (2019). Standardized micronucleus assay for peripheral blood from sea turtles. *Chelonian Conservation and Biology: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal*, 18(2), 175-186.
<https://doi.org/10.2744/CCB-1373.1>.
- Leme, D.M., & Marin-Morales, M.A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation research/reviews in mutation research*, 682(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>.
- Lemus-Varela, M.L., Sola, A., Gómez-Meda, B.C., Zamora-Perez, A.L., Ramos-Ibarra, M.L., Batista-González, C.M., & Zúñiga-González, G.M. (2006). Oral sildenafil citrate lacks genotoxicity and cytotoxicity in a primate model: *Callithrix jacchus*. *Journal Perinatology*. 26(7), 423-7.
<https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211518>.
- Lenarczyk, M., Goddu, S. M., Rao, D. V., & Howell, R. W. (2001). Biologic dosimetry of bone marrow: induction of micronuclei in reticulocytes after exposure to ³²P and ⁹⁰Y. *Journal of Nuclear Medicine*, 42(1), 162-169.
- Levan, A. (1938). The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 24(4), 471-486.



- <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>.
- Lindberg, H. K., Wang, X., Järventausta, H., Falck, G. C. M., Norppa, H., & Fenech, M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 617(1-2), 33-45.
- MacGregor, J. T., Wehr, C. M., & Gould, D. H. (1980). Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, 2(4), 509-514.
- Maciejowski, J., & Hatch, E. M. (2020). Nuclear membrane rupture and its consequences. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 36(1), 85-114.
- Mackenzie, K.J., Carroll, P., Martin, C.A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D.J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J.K., Leitch, A., Osborn, R.T., Wheeler, A.P., Nowotny, M., Gilbert, N., Chandra, T., Reijns, M.A.M., & Jackson, A.P. (2017). cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, 548, 461-465.
- <https://doi.org/10.1038%2Fnature23449>.
- Mallory, M.L., Robinson, S.A., Hebert, C.E., & Forbes, M.R. (2010). Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: a case for gathering multiple proxies of seabird health. *Marine Pollution Bulletin*, 60(1), 7-12.
- Mamoulakis, C., Fragkiadoulaki, I., Karkala, P., Georgiadis, G., Zisis, I. E., Stivaktakis, P., & Tsatsakis, A. (2019). Contrast-induced nephropathy in an animal model: Evaluation of novel biomarkers in blood and tissue samples. *Toxicology Reports*, 6, 395-400.
- <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.04.007>
- Markert, B. A., Breure, A. M., & Zechmeister, H. G. (Eds.). (2003). *Bioindicators and biomonitors* (Vol. 6). Elsevier.6-9.
- Martínez Quintanilla, M. C., Torres Bugarín, O., Martínez Guerrero, J. H., Delgado León, T. G., Salas Pacheco, J. M., & Pereda Solís, M. E. (2017). Relación heterófilo/linfocito, frecuencia espontánea de eritrocitos micronucleados y prolongaciones nucleares en el ganso nevado (*Chen caerulescens*): Una propuesta como posible biomonitor de estrés y genotóxicos ambientales. *Huitzil*, 18(1), 102-111.
- Martínez-Haro, M., Balderas-Plata, M.A., Pereda-Solís, M.E., Arellano-Aguilar, O., Hernández-Millán, C.L., Mundo-Hernández, V., & Torres-Bugarín, O. (2017). Anthropogenic influence on blood biomarkers of stress and genotoxicity of the burrowing owl (*Athene cunicularia*). *Journal of Biodiversity & Endangered Species*, 5(3), 196-199.
- Martins, R.A., da Silva Gomes, G.A., Aguiar Jr, O., & Ribeiro, D.A. (2009). Biomonitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Environment International*, 35(7), 1062-1065.
- <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.06.001>.



- Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F., & Heddle, J.A. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. *Environ Prot Agency Gene-Tox Program. Mutation Research*. 239(1):29-80.
[https://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90030-F](https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90030-F).
- Melchior, K., Saska, S., Coelho, F., Scarel-Caminaga, R. M., & Capote, T. S. de O. (2018). Bonefill® block as alternative for bone substitute: A toxicological evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(2), 1-9.
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000217438>
- Messadi, D.V. (2013). Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 407(1), 93-105.
- Miller, R. C. (1973). The micronucleus test as an *in vivo* cytogenetic method. *Environmental Health Perspectives*, 6, 167-170.
<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/pdf/10.1289/ehp.7306167>.
- Mišík, M., Nersesyan, A., Mišíková, K., & Knasmueller, S. (2019). Micronucleus assays with meiotic pollen tetrad cells of *Tradescantia* and with mitotic root tip cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. In *The micronucleus assay in toxicology*. 290-304.
<https://doi.org/10.1039/9781788013604>.
- Mohr, L., Toufektchan, E., von Morgen, P., Chu, K., Kapoor, A., & Maciejowski, J. (2021). ER-directed TREX1 limits cGAS activation at micronuclei. *Molecular cell*, 81(4), 724-738.
- Montalvo-Arenas, C.E. (2021). Tejido y órganos linfáticos. UNAM.
<https://recursoseducativos.unam.mx/handle/123456789/20604>.
- Montano-Soto, T., Arellano-García, E., Camarena-Ojinaga, L., Vonglascoe, C., & Ruiz-Ruiz, B. (2014). Genotoxic biomonitoring and exposure to pesticides in women laborers at Maneadero valley in Baja California, México. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 3(2), 89-96.
- Morita T, MacGregor JT, & Hayashi M. (2011). Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutagenesis*. 26 (1):223-30.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq066>.
- Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T., & Tweats, D. (1999). ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 436(3), 195-225. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00004-6).
- Nersesyan, A. (2019). Re: Repair Index in Examination of Nuclear Changes in the Buccal Mucosa of Smokers: A Useful Method for Screening of Oral Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(11), 3189.
<https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.11.3189>.
- Nersesyan, A., Kundi, M., Atefie, K., Schulte-Hermann, R., & Knasmueller, S. (2006). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated



- oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers y Prevention*, 15(10), 1835-1840.
- OECD (2016a), *Test No.474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, *OECD Publishing*, Paris, 2016a <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>.
- OECD (2016b). *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, *OECD Publishing*, Paris, 2016; <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.
- OECD, 1997, Guideline for the testing of chemicals. mammalian erythrocyte micronucleus test. Guideline 474.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebat, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García-Vargas, G., del Razo, L.M., & Cebrián, M. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 250(1-2), 477-482. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90204-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90204-2).
- Palaskar, S., & Jindal, C. (2010). Evaluation of micronuclei using Papanicolaou and May Grunwald Giemsa stain in individuals with different tobacco habits-A comparative study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 4, 3607-13.
- Palve, D.H., & Tupkari, J.V. (2008). Clinico-pathological correlation of micronuclei in oral squamous cell carcinoma by exfoliative cytology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 12(1), 2-7. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.42189>.
- Pittol, M., Tomacheski, D., Simões, D. N., Ribeiro, V. F., & Santana, R. M. C. (2018). Evaluation of the Toxicity of Silver/Silica and Titanium Dioxide Particles in Mammalian Cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160667>
- Podsiedlik, M., Markowicz-Piasecka, M., & Sikora, J. (2020). Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and pollution. *Ecotoxicology and environmental safety*, 154, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.025>.
- Quintero-Ojeda, J. E., Aguilar-Medina, M., Olimón-Andalón, V., García Jau, R. A., Ayala Ham, A., Romero Quintana, J. G., & Ramos-Payán, R. (2018). Increased micronuclei frequency in oral and lingual epithelium of treated diabetes mellitus patients. *BioMed Research International*, 2018(1), 4898153.
- Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., & Piña, B. (2008). Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (NE Spain). *Environmental Pollution*, 155(1), 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.030>.
- Ramírez, A., & Saldanha, P.H. (2002). Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetics and Molecular Research*, 1(3), 246-260.



- Ramírez-Muñoz, M. P., Zúñiga, G., Torres-Bugarín, O., Portilla, E., García-Martínez, D., Ramos, A., Cantú, J. M., & Sánchez-Corona, J. (1999). Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model. *Comparative Medicine*, 49(4), 418-420.
- Ramos-Ibarra, M., Villa-Castellanos, J., Barba-León, J., Flores-Valdez, M., Zavala-Aguirre, L., & Torres Bugarín, O. (2020). Estudio exploratorio de la genotoxicidad de vacunas recombinantes para tuberculosis bovina. *Abanico veterinario*, 10(1), 1-14.
- Ray, M.R., Basu, C., Mukherjee, S., Roychowdhury, S., & Lahiri, T. (2005). Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefighters. *International Journal of Human Genetics*, 5(1), 45-48.
<https://doi.org/10.1080/09723757.2005.11885915>.
- Rivera, C., Oliveira, A. K., Costa, R.A.P., De Rossi, T., & Leme, A.F.P. (2017). Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review. *Oral oncology*, 72, 38-47.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.003>.
- Rodríguez-Soto, J. C., Barazorda-Miranda, C. E., Pollack-Velásquez, L., Contreras-Quinones, M., & Aldama-Reyna, C. W. (2018). Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles synthesized by laser ablation on *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). 2-25,3, 1015-1026.
- Rohr, P., da Silva, G. F., Vicentini, V. E. P., de Almeida, I. V., Dos Santos, R. A., Takahashi, C. S., & da Silva, J. (2020). Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil. *Toxicology Letters*, 333, 242-250.
- Romagna, F., & Staniforth, C. D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 213(1), 91-104. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(89\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90035-3).
- Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M.E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D.S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., Luna Vazquez-Gomez, R., Pestryakov, A., García-Ramos, J.C., & Bogdanchikova, N. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega*, 5(21), 12005-12015.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00149>.
- Ruiz-Ruiz, B., Torres-Bugarín, O., Zúñiga-Violante, E., Casillas-Figueroa, F., Luna-Vázquez-Gómez, R., Campos-Gallegos, V., Ruiz-Arellano, A.E., & Arellano-García, M.E. (2023). Genomic Instability and Cytotoxicity Evaluation of Two Communities Exposed to Pesticides in the Mexicali Valley by the L-CBMN Assay. *Toxics*. 25;11(10), 807.
<https://doi.org/10.3390/toxics11100807>.
- Russo, A., & Degrassi, F. (2018). Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836 (May), 36-40.



- <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.011>.
- Sabeen, M., Mahmood, Q., Bhatti, Z. A., Irshad, M., Bilal, M., Hayat, M. T., & Shahid, N. (2020). *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), 1368-1374.
- Sadik, J., Sharma, M., Deshmukh, C. V., Maqbool, S. B., Thekiya, A. H., & Kamble, P. P. (2023). Assessment of genotoxic biomarker in tongue and buccal mucosal epithelial cells of COVID-19 patients: an observational study. *Cureus*, 15(11), e48706. <https://doi.org/10.7759/cureus.48706>.
- Salamone, M.F., & Heddle, J.A. (1983). The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol. In *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*, 8 (111-149). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3694-5_4
- Santos, C.S., Brandao, R., Monteiro, M.S., Bastos, A.C., Soares, A.M., & Loureiro, S. (2017). Assessment of DNA damage in *Ardea cinerea* and *Ciconia ciconia*: A 5-year study in Portuguese birds retrieved for rehabilitation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 104-110.
- Santos, K. R., Galter, I. N., Grecco, K. D., Silva, E. Z. M., Lascola, M. B., Dos Santos, S. N., & Matsumoto, S. T. (2023). Toxicogenetic, biochemical, and anatomical effects of the herbicide Clethodim on *Allium cepa* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(60), 125388-125397. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31048-9>
- Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R.L.A.G., & Levis, A.G. (1987). The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*, 2(1), 11-17. <https://doi.org/10.1093/mutage/2.1.11>
- Sato, S., Taketomi, M., Nakajima, M., Kitazawa, M., Shimada, H., Itoh, S., Igarashi, M., Higashikuni, N., Sutou, S., Sasaki, Y. F., Hayashi, M., Sofuni, T., Higashiguchi, T., Nito, S., Kondo, Y., Honda, S., Hayashi, M., Shinagawa, Y., Nakajima, E., Oka, Y., Tamai, K. (1995). Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS · MMS. *Mutation Research/DNAging*, 338(1-6), 51-57. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(95\)00011-T](https://doi.org/10.1016/0921-8734(95)00011-T).
- Scarfi, M. R., Lioi, M. B., Di Berardino, D., Zeni, O., Coviello, A. M. R., & Matassino, D. (1993). Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 289(2), 291-295. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90080-Y](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90080-Y)
- Schlegel, R., MacGregor, J.T., & Everson, R.B. (1986). Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer research*, 46(7), 3717-3721.



- Schmid, W. (1973). Chemical mutagen testing *on vivo* somatic mammalian cells.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*. 31(1), 9-15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8).
- Sears, D.A., & Udden, M.M. (2012). Howell-Jolly bodies: a brief historical review. *The American journal of the medical sciences*, 343(5), 407-409. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31823020d1>.
- Serrano-García, L., & Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 38(1), 38-45. <https://doi.org/10.1002/em.1048>.
- Shen, Q., Xu, P., & Mei, C. (2024). Role of micronucleus-activated cGAS-STING signaling in antitumor immunity. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 53(1), 25-34. <https://doi.org/10.3724/zdxbyxb-2023-0485>
- Shimizu, N. (2011). Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extra-chromosomal elements. *Mutagenesis*. 26(1), 119-23.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., & Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*, 140(6), 1307-1320.
- Shimizu, N., Shimura, T., & Tanaka, T. (2000). Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 448(1), 81-90. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00003-8).
- Simonyan, A., Hovhannisyan, G., Sargsyan, A., Arakelyan, M., Minasyan, S., & Arou-tiounian, R. (2018). DNA damage and micronuclei in parthenogenetic and bisexual *Darevskia* rock lizards from areas with different levels of soil
- Solgi, E., Mirzaei-Rajeouni, E., & Zamani, A. (2020). Feathers of three waterfowl bird species from northern Iran for heavy metals biomonitoring. *Bull Environ Contam Toxicol*. 104(6), 727-732. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02852-7>.
- Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>.
- Souto, H.N., de Campos Júnior, E.O., Campos, C.F., Rodrigues, T.S., Pereira, B.B., & Morelli, S. (2018). Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 24084-24092. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2466-4>.
- Stevenson, A., Lopez, D., Khoo, P., Kalaria, R.N., & Mukaetova, E.B. (2017). Exploring erythrocytes as blood biomarkers for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(3), 845-857.



- <https://doi.org/10.3233/JAD-170363>.
- Stich, H. F., Stich, W., & Parida, B. B. (1982). Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. *Cancer Letters*, 17(2), 125-134.
[https://doi.org/10.1016/0304-3835\(82\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0304-3835(82)90024-6).
- Stich, H.F., San, R.H., & Rosin, M.P. (1983). Adaptation of the DNA repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 407(1), 93-105.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb47816.x>
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., & Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 341(3), 169-184.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90007-1).
- Tamai, K. (1995). Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS MMS. *Mutation Research/DNAging*, 338(1-6), 51-57.
[https://doi.org/10.1016/0921-8734\(95\)00011-T](https://doi.org/10.1016/0921-8734(95)00011-T).
- Terradas, M., Martín, M., & Genescà, A. (2016). Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. *Archives of toxicology*, 2016; 90 (11), 2657-2667.
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1818-4>.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. & Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 4(6), 825-837.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>.
- Todorova, K., Georgieva, A., Dikovska, A., & Toshkova, R. A. (2020). Surface interactions and cellular uptake of metal nanoparticles in primary lymphocyte cultures. Brief report. *The Cyprus Journal of Sciences*, 16, 51-58.
- Tolbert, P. E., Shy, C. M., & Allen, J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 69-77.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90033-I](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90033-I)
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., & Allen, J.W. (1991). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *American Journal of Epidemiology*, 134(8), 840-850.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116159>
- Tomazelli, J., Rodrigues, G. Z. P., Franco, D., de Souza, M. S., Burghausen, J. H., Panizzon, J., & Gehlen, G. (2022). Potential use of distinct biomarkers (trace metals, micronuclei, and nuclear abnormalities) in a heterogeneous sample of birds in southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-16657-6>.



- Torres-Bugarin, O., & Arias-Ruiz, L. F. (2023). Micronúcleos: Actualización del papel en la inestabilidad genética, inflamación, envejecimiento y cáncer. Revisión panorámica. *Revista Biomédica*, 34(2), 208-223. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=112014>.
- Torres-Bugarín, O., & Ramos-Ibarra, M. L. (2013a). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650-657.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>.
- Torres-Bugarín, O., Carillo, G.C., & Armijo, G.J. (2019). Evaluación de genotóxicos ambientales mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica. En *Ecología y Salud de la fauna silvestre Avances de investigación. Colección Investigadores. UJED. Ed. 2*. <https://play.google.com/books/reader?id=4U-xDwAAQBAJ&pg=GBS.PA5&hl=es>. 419.
- Torres-Bugarin, O., Covarrubias-Bugarín, R., Zamora-Perez, A. L., Torres-Mendoza, B. M. G., García-Ulloa, M., & Martínez-Sandoval, F. G. (2007). Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *British Journal of Sports Medicine*, 41(9), 592-596.
<https://doi.org/10.1136/bjism.2006.032474>.
- Torres-Bugarín, O., De Anda-Casillas, A., Ramírez-Munoz, M.P., Sánchez-Corona, J., Cantú, J.M., & Zúñiga, G. (1998). Determination of diesel genotoxicity in fire-breathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 413(3), 277-281.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00021-7)
- Torres-Bugarín, O., Macriz Romero, N., Ramos Ibarra, M. L., Flores-García, A., Valdez Aburto, P., & Zavala-Cerna, M. G. (2015). Genotoxic effect in autoimmune diseases evaluated by the micronucleus test assay: our experience and literature review. *Biomed research international*, 2015(1), 194031.
<https://doi.org/10.1155/2015/194031>.
- Torres-Bugarín, O., Pacheco-Gutiérrez, A.G., Vázquez-Valls, E., Ramos-Ibarra, M.L., & Torres-Mendoza, B.M. (2014). Micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa cells in patients with anorexia and bulimia nervosa. *Mutagenesis*. 29(6), 427-431.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geu044>.
- Torres-Bugarín, O., Zamora-Pérez, A., Esparza-Flores, A., López-Guido, B., Feria-Velasco, A., Cantú, J.M., & Zúñiga, G. (1999). Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 56(4), 212-217.
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M.G., Macriz-Romero, N., Flores-García, A., & Ramos-Ibarra, M.L. (2013b). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente*, 8(1),



- 4-11.
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M.G., Nava, A., Flores-García, A., & Ramos-Ibarra, M.L. (2014). Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Disease Markers*, 2014. 956835. <https://doi.org/10.1155/2014/956835>
- Udroiu, I. (2006). Feasibility of conducting the micronucleus test in circulating erythrocytes from different mammalian species: an anatomical perspective. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 47(9), 643-646. <https://doi.org/10.1002/em.20258>.
- Udroiu, I. (2006b). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201-204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>.
- Udroiu, I. (2008). The micronucleus test for aquatic toxicology. *Aquatic Toxicology Research Focus*. Elías Svensson (ed). Nova Science Publishers, Inc, 145-160.
- Umegaki, K., Higuchi, M., Inoue, K., & Esashi, T. (1998). Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. *International Journal of Sports Medicine*, 19(08), 581-585. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971963>.
- Urteaga, F. & Lallana, V., (2005). Optimización de una técnica de tinción para determinación de efectos citogenéticos en ápices radicales de *Allium cepa*. *Revista Científica Agropecuaria*, 9(1), 63-70.
- Vergallo, C., Panzarini, E., Izzo, D., Carata, E., Mariano, S., Buccolieri, A., Serra, A., Manno, D., & Dini, L. (2014). Cytotoxicity of β -D-glucose coated silver nanoparticles on human lymphocytes. *AIP Conference Proceedings*, 1603. <https://doi.org/10.1063/1.4883045>.
- Vernon, E.L., & Jha, A.N. (2019). Assessing relative sensitivity of marine and freshwater bivalves following exposure to copper: Application of classical and novel genotoxicological biomarkers. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.008>.
- Vijaya, P. P., Rekha, B., Mathew, A. T., Syed Ali, M., Yogananth, N., Anuradha, V., & Kalitha Parveen, P. (2014). Antigenotoxic effect of green-synthesised silver nanoparticles from *Ocimum sanctum* leaf extract against cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes-in vitro. *Applied Nanoscience*, 4(4), 415-420. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0212-2>.
- Wyrobek, A.J. & Bruce, W.R. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A.)*, 72, 4425-4429. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.11.4425>.
- Ye, C. J., Sharpe, Z., Alemara, S., Mackenzie, S., Liu, G., Abdallah, B., & Heng, H. H. (2019). Micronuclei and genome chaos: changing the system inheritance. *Genes*, 10(5), 366.



- Youssef, M. S., & Elamawi, R. M. (2020). Evaluation of phytotoxicity, cytotoxicity, and genotoxicity of ZnO nanoparticles in *Vicia faba*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 18972-18984.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-3250-1>.
- Zamora-Perez, A. L., Luna-Aguirre, J., Zúñiga-González, G. M., Torres-Bugarín, O., Torres-Mendoza, B. M., Gallegos-Arreola, M. P., & Gómez-Meda, B. C. (2021). Micronuclei and nuclear buds induced by Cyclophosphamide in *Crocodylus moreletii* as useful biomarkers in aquatic environments. *Animals*, 11(11), 3178.
<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/11/3178#>.
- Zavala-Aguirre, J.L., Torres-Bugarin, O., Buelna-Osben, H.R., Flores-Kehn, L.P., Ramos-Ibarra, M.L., Zuniga-Gonzalez, G., & Ogura, T. (2010). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities by cyclophosphamide and colchicine in *Xenotoca melanosoma* (Pisces, Goodeidae) from Lake la Alberca in Michoacán, México. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45(1), 75-81.
<https://doi.org/10.1080/10934520903388863>.
- Zhao, M., Wang, F., Wu, J., Cheng, Y., Cao, Y., Wu, X., Ma, M., Tang, F., Liu, Z., Liu, H., & Ge, B. (2021). CGAS is a micronucleophagy receptor for the clearance of micronuclei. *Autophagy*, 17 (12): 3976-3991.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899440>.
- Zhornik, E.V., Baranova, L.A., Drozd, E.S., Sudas, M.S., Chau, N.H., Buu, N.Q., Dung, T.T.N., Chizhik, S.A., & Volotovskii, I.D. (2014). Silver nanoparticles induce lipid peroxidation and morphological changes in human lymphocytes surface. *Biophysics (Russian Federation)*, 59(3), 380-386. <https://doi.org/10.1134/S0006350914030282>.
- Zhou, R., Xie, X., Li, X., Qin, Z., Wei, C., Liu, J., & Luo, Y. (2020). The triggers of the cGAS-STING pathway and the connection with inflammatory and autoimmune diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, 77, 104094.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104094>.
- Zúñiga, G., Torres-Bugarín, O., Ramírez-Muñoz, M.P., Delgado-Lamas, J.L., De Loza-Saldaña, R., & Cantú, J.M. (1996a). Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 361(2-3), 107-112.
[https://doi.org/10.1016/S0165-1161\(96\)90244-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1161(96)90244-7).
- Zúñiga, G., Torres-Bugarín, O., Ramírez-Muñoz, M.P., Ramos, A., Fanti-Rodríguez, E., Portilla, E., García-Martínez, D., Cantú, J.M., Gallegos-Arreola, M.P., & Sánchez-Corona, J. (1996b). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research*, 369(1-2), 123-7.
[https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90056-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90056-7).
- Zúñiga-González, G., Ramírez-Muñoz, M. P., Torres-Bugarín, O., Pérez-Jiménez, J., Ramos-Mora, A., Zamora-Pérez, A., & Sánchez-Corona, J. (1998). Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.



- nesis, 413(2), 187-189.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00184-8).
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ventura-Aguilar, A.J., Ramos-Ibarra, M.L., Ramos-Mora, A., Ortiz, G.G., & Gallegos-Arreola, M.P. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): part two. *Mutation Research*, 13;467(1), 99-103.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00021-8).
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B.C., Ramos Ibarra, M.L., Martínez-González, S., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D., & Gallegos-Arreola, M.P. (2001). Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*. 25;494 (1-2), 161-7.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00180-2).
- Zúñiga-González, G.M., Batista-González, C.M., Gómez-Meda, B.C., Ramos-Ibarra, M.L., Zamora-Perez, A.L., Muñoz-Magallanes, T., Ramos-Valdés, C., & Gallegos-Arreola, M.P. (2007). Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in animal models. *Mutation Research*. 1;634(1-2), 126-34.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.06.006>.





Micronúcleos, Genotoxicidad y Citotoxicidad: Implicaciones en la Salud y el Medio Ambiente se terminó de imprimir en el mes de julio 2026, en los talleres de Industria de Transformación Gráfica S.A. de C.V., ubicados en Alcalde # 830, Alcalde Barranquitas, 44270, Guadalajara, Jalisco, México. Se tiraron 200 ejemplares.

La edición, diseño de portada y tipografía estuvo a cargo de José L. Navarrete-Heredia

