

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

DETECCION DE DAÑO EN EL ADN POR MEDIO DE ELECTROFORESIS
UNICELULAR EN CÉLULAS DE RATAS DESNUTRIDAS EXPERIMENTALMENTE
DURANTE LA LACTANCIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

EDITH CORTÉS BARBERENA

TUTOR:

DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

ASESORES:

M. EN C. PATRICIA PÉREZ VERA

DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D.F.

SEPTIEMBRE DE 1997

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, número 88086.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, dentro del proyecto apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de convenio **3005P-M9606**.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortiz por la dirección de esta tesis y el apoyo que siempre me ha brindado.

A la M. en C. Patricia Pérez Vera y al Dr. Mario Altamirano Lozano por la valiosa asesoría prestada para la realización de esta tesis.

Al Dr. Miguel Betancourt Rule por sus comentarios y sugerencias y por el apoyo que me ha brindado.

A Leonor Rodríguez por su valiosa ayuda prestada para la realización de este trabajo.

A Cristina, Lety, Oralia, Eduardo, Ernesto e Yvonne, por el apoyo y consejo que siempre me han brindado desinteresadamente.

A mi familia especialmente, por su comprensión y apoyo.

A todos los amigos y personas que intervinieron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi padre Domingo Cortés

A mi madre Catalina Barberena

A mis hermanos Daniel, Sofía y Susana.

A mi hermana Alma y su familia.

A todos los amigos.

INDICE

RESUMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1
1. Desnutrición	1
2. Estudios en modelos animales	3
3. Estudios de los efectos causados por la desnutrición	4
3.1. Efectos a nivel fisiológico y bioquímico	4
3.2. Efectos sobre la proliferación celular	7
3.3. Estudios del efecto a nivel cromosómico	8
3.4. Estudios del efecto a nivel del material genético	9
4. Detección de daño al ADN por medio de electroforesis unicelular	9
4.1. Desarrollo de la metodología	9
4.2. Principios de la electroforesis unicelular alcalina	10
4.3. Estudios de daño inducido por radiación	14
4.4. Estudios de daño inducido por agentes químicos	15
4.4.1 Agentes alquilantes	15
5. Tejidos hematopoyéticos y sangre	16
5.1. Médula ósea	16
5.2. Bazo	17
5.3. Sangre	18
5.4. Estudios citogenéticos en tejidos hematopoyéticos y sangre	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVO	21
HIPÓTESIS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
1. Desnutrición Experimental Durante la Lactancia	22
2. Obtención de células	22
2.1. Extracción de sangre	22

2.2. Extracción de médula ósea	22
2.3. Extracción de bazo	23
2.4. Separación de linfocitos	23
2.5. Congelamiento de las células sanguíneas	23
2.6. Descongelamiento	23
2.7. Viabilidad	24
3. Ensayo de electroforesis unicelular	24
3.1. Preparación de geles	24
3.2. Tinción de las células y observación	25
4. Análisis de resultados	28
RESULTADOS	29
1. Peso de las ratas	29
2. Viabilidad	29
3. Daño al ADN	29
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	63

RESUMEN

La desnutrición es un síndrome que se encuentra ampliamente distribuido por el mundo que además, existe con una alta prevalencia en los países pobres. Se presenta como consecuencia de una deficiente ingestión o utilización de dietas con bajo contenido proteico, y es en los niños en donde los efectos de la desnutrición pueden ser devastadores.

Los modelos experimentales en animales son una herramienta muy poderosa para el estudio de diferentes padecimientos y permiten además probar diferentes tratamientos potenciales. Los estudios que se realizan en los modelos animales tienen la ventaja de controlar diferentes variables, como son las infecciones, que pudieran enmascarar los efectos causados por la desnutrición. Además, los modelos animales han sido útiles para estudiar los efectos de la desnutrición en diferentes grupos de edades, desde los prenatales hasta edades avanzadas.

El ensayo de la electroforesis unicelular alcalina es una metodología muy sensible para detectar rompimientos de una sola hebra o sitios sensibles al medio alcalino, manteniendo la individualidad de la célula. Al realizar la electroforesis unicelular, las moléculas con rompimientos son las que migran hacia el ánodo y se pueden observar como una estela que sale del nucleóide. Se ha encontrado que la estela formada tiene relación con la cantidad de daño producido en el ADN.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el daño al ADN por medio de electroforesis unicelular, en células de la médula ósea, del bazo, y de sangre periférica de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia.

A ratas de la cepa Wistar se les indujo desnutrición durante la lactancia. Al final del periodo de la lactancia, se obtuvieron la sangre, bazo y médula ósea; se hizo la separación de linfocitos de sangre y bazo y la serie linfóide de la médula ósea, por medio de un gradiente de densidad. Se midió la viabilidad celular y se la electroforesis unicelular alcalina. Se analizaron 100 nucleóides por muestra, se obtuvieron los promedios de migración y los coeficientes de dispersión. Además, se clasificaron los nucleóides en diferentes categorías.

Las ratas bien nutridas tuvieron un peso en promedio de 50.1 ± 7.2 g, mientras que en las ratas desnutridas fue de 25.0 ± 3 g, mostrando diferencia estadística entre ambos grupos. La

viabilidad en las células fue igual o mayor al 90 % de células vivas en todos los tipos celulares, tanto en ambos grupos de ratas. Los resultados en cuanto al daño en el ADN muestran un claro incremento, en todos los tipos celulares provenientes de las ratas desnutridas en todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas. También se observó que el coeficiente de dispersión H no fue diferente entre las ratas BN y las DN.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran claramente un incremento en el daño en el ADN en las células provenientes de organismos desnutridos, afectando a los tipos celulares estudiados en este trabajo. La variabilidad intercelular no se vio afectado por la desnutrición.

Este daño es posible que se produzca por que no se lleve a cabo una duplicación adecuada el ADN durante la fase de síntesis; otra posibilidad es que los mecanismos de reparación del ADN no estén funcionando adecuadamente; también cabe la posibilidad que la falta de nutrientes provoque que no se puedan tener las moléculas necesarias en la protección contra agentes causantes de daño oxidativo.

INTRODUCCIÓN

1. Desnutrición

Los procesos biológicos críticos tales como diferenciación, desarrollo, crecimiento y adaptación metabólica dependen de la expresión genética, la cual a su vez depende principalmente de los componentes del ambiente nutricional. Los efectos de los nutrientes se reflejan en la estructura del ADN y la cromatina, la regulación de la expresión genética, la transcripción y duplicación, así como también en las modificaciones postranscripcionales y postransduccionales (Castro, 1987).

La desnutrición es un síndrome que se encuentra ampliamente distribuido por el mundo y existe con una alta prevalencia en los países pobres, en los que la frecuencia se está incrementando rápidamente, ya que la pobreza, el desempleo y la ignorancia están presentes (De Mello, 1994). La desnutrición se presenta como consecuencia de una deficiente ingestión y/o utilización de dietas con bajo contenido principalmente proteico. Se presenta principalmente en los niños, y es en quienes los efectos de la desnutrición pueden ser particularmente devastadores, debido a que en los primeros años de la vida el crecimiento corporal es rápido y los requerimientos de nutrientes son mayores (Cravioto y Arrieta, 1985). En 1975, Cravioto consideró a la desnutrición como un trastorno causado por el hombre, quien al permitir el mantenimiento de un sistema social inadecuado, consciente o inconscientemente permite que se produzcan individuos desnutridos.

A pesar de que la desnutrición no es padecimiento reciente, su reconocimiento y caracterización comenzó hasta hace relativamente poco tiempo. La descripción de la DCP comenzó de el siglo pasado, cuando Hinojosa en 1865 hizo una de las primeras descripciones de la desnutrición, al igual que Coindet en el mismo año (Citados en Cravioto y Vega-Franco, 1995). A partir de entonces se hicieron numerosas descripciones del síndrome, recibiendo en cada una de ellas diferentes nombres. Fue hasta 1946 cuando Gómez definitivamente la identificó y le asignó el nombre de desnutrición, describiendo los diferentes grados de intensidad del desorden y dando como una causa común un aporte o asimilación deficiente de alimento por el organismo (Cravioto y Vega-Franco, 1995). Gómez clasificó la desnutrición en tres grados, dependiendo del porcentaje de pérdida de peso corporal, esta clasificación es muy útil actualmente para fines clínicos y de investigación.

Desnutrición de primer grado (o leve).-Desnutrición moderada o que ha actuado por poco tiempo. Dentro de esta clase se clasifica a los niños que tienen un déficit corporal del 10% al 24% del promedio correspondiente para su edad.

Desnutrición de segundo grado (o moderada).- Es más marcada que la anterior y el déficit de peso es del 25% al 39% del promedio correspondiente para la edad, frecuentemente requiere hospitalización.

Desnutrición de tercer grado, conocida también como Desnutrición calórico proteica (DCP) o severa: En ella el organismo ha agotado casi todas las reservas, para su sobrevivencia, el déficit de peso es mayor al 40% del promedio correspondiente a su edad, en el caso del tipo marasmo. En el niño con DCP tipo kwashiorkor, el déficit de peso es menor, debido a que presenta edema. Los daños causados a nivel somático, funcional e incluso psicológicos suelen ser serios, requieren hospitalización. Estos niños tienen una alta tasa de mortalidad.

Actualmente se considera que otros índices antropométricos son útiles para medir el estado nutricional y crecimiento del niño (Suskind y col., 1990). La altura para la edad provee información en términos del crecimiento lineal, mientras que el peso por altura refleja la armonía del crecimiento y es particularmente sensible a disturbios del crecimiento (Onís y col., 1993).

Antes de 1950, la proporción de muertes entre los niños que ingresaban a los hospitales con desnutrición severa era seis de cada diez. Para 1960 la proporción descendió drásticamente a cinco de cada cien; sin embargo no se puede decir lo mismo con respecto al número de casos que presentaron este síndrome. Cravioto consideró que “La medicina actual reduce la mortalidad causada por la desnutrición , pero no la morbilidad” (Watts, 1976; Cravioto y DeLicardie, 1976). En 1982, estudios sobre la mortalidad infantil en América Latina, revelaron que la desnutrición es responsable directa o indirectamente de más de un tercio de las muertes de niños de 0 a 5 años (Arrieta y Cravioto, 1982). En 1988 se había calculado que en México existía un 16.3 % de niños menores de cinco años, con peso bajo y, un 27 % con baja estatura. De acuerdo a lo estimado en 1993, el riesgo de tener bajo peso es 1.5 veces más en Asia que en África, y 2.3 veces más en África que en América Latina (Onís y col., 1993). En general cerca de 195 millones de niños en el mundo son desnutridos. En América Latina se ha estimado que 12 millones de niños consumen dietas, con una cantidad de nutrientes significativamente menor a la recomendada por la Academia Nacional de Ciencias de los E.U.A. (Brown y Pollit, 1996).

2. Estudios en modelos animales

Las investigaciones realizadas con animales de laboratorio han sido de gran importancia para el conocimiento y el tratamiento de muchas enfermedades, se considera incluso que un alto porcentaje (alrededor del 80%) de los principales avances médicos realizados en este siglo se han logrado gracias a los experimentos realizados en animales. Aunque los modelos experimentales no son perfectos, son una herramienta muy poderosa para el estudio de diferentes padecimientos y permiten además probar diferentes tratamientos potenciales (Senior, 1995).

Los estudios en niños desnutridos son indispensables, pues es en ellos en los que es necesario conocer los efectos causados por la DCP. Sin embargo, por razones éticas, diversos estudios, no es posible realizarlos en humanos, además la existencia de otros factores que generalmente acompañan a la desnutrición, como son las infecciones, pueden alterar o enmascarar los efectos causados por el padecimiento. Por las razones anteriormente expuestas, es necesario proponer y realizar estudios en animales desnutridos experimentalmente como modelos ya que de esta manera es posible controlar diversas variables.

Para el estudio de los efectos causados por la desnutrición, los modelos animales de laboratorio han sido ampliamente usados, ya que ofrecen la facilidad de controlar varios factores extranutricionales, los cuales afectan al humano. Una ventaja relacionada de los modelos animales es la posibilidad de realizar estudios tanto in vivo como in vitro. Por último, el corto promedio de vida de los animales y el menor costo han hecho atractiva la experimentación en animales para los investigadores (Galler y Kanis, 1987).

Para el estudio de los efectos causados por la desnutrición, los modelos en animales de laboratorio han sido ampliamente usados, se han desarrollado trabajos principalmente en ratas y ratones. Otros animales estudiados son: conejo, cerdo y mono (Ortiz, 1987).

Además, los modelos animales han sido útiles para estudiar los efectos de la desnutrición en diferentes grupos de edades, desde los estados prenatales hasta edades avanzadas ya que la edad es otro factor que modula el efecto de la desnutrición (Winick y Noble, 1966; Lebenthal y Rossi, 1983); los efectos específicos en cada periodo pueden o no ser similares y/o reversibles (Lebenthal y Rossi, 1983). Varios estudios han demostrado la importancia del periodo de la lactancia, el cual es crítico en los procesos de crecimiento y desarrollo, puesto que los efectos de

la desnutrición durante este periodo son más severos que los observados en adultos (Winnick y Noble, 1966; Fló y col., 1991).

periodo

Se han aplicado una variedad de métodos para inducir la desnutrición en animales fetales o lactantes. Los métodos usados más frecuentemente incluyen:

- 1) alimentación de la madre con una dieta baja en proteínas durante la gestación o la lactancia
- 2) alimentación adecuada en composición pero baja en cantidad
- 3) reducción del número de glándulas mamarias disponibles para las crías lactantes
- 4) incremento del tamaño de la camada (inducción por competencia de alimento)
- 5) rotación de las crías entre nodrizas lactantes y no lactantes o entre nodrizas lactantes y una incubadora
- 6) alimentación artificial de las crías en un ambiente controlado.

Básicamente son dos los métodos utilizados para inducir desnutrición durante la lactancia en animales experimentales. Uno está basado en la baja calidad de la leche, donde las crías son alimentadas por una madre desnutrida (Marín y col., 1995). El otro método está basado en la reducción de la cantidad de alimento, la desnutrición es inducida por incremento del número de crías por nodriza. Por lo tanto, la cantidad de leche que cada cría puede consumir es menor (Widowson y McCance, 1960; Benedetti y col., 1992; Ortiz y col., 1996).

Se han estudiado los efectos en diferentes campos como son: bioquímico (Skullman y col., 1994), celular (Betancourt y col., 1992), inmunológico (Feledi y col., 1993), citogenético (Alu y Murthy, 1994; Ortiz y col. 1995), conductual (Yoshino y col., 1994) y desarrollo neurológico (Cintra y col., 1994), crecimiento y desarrollo, mutaciones génicas (Cortés, 1993).

3. Estudios de los efectos causados por la desnutrición

3.1. Efectos a nivel fisiológico y bioquímico

Parte del gran número de investigaciones que se han realizado sobre los efectos de la desnutrición, se han llevado a cabo a nivel bioquímico, ya que éstos son reflejados a nivel fisiológico en los niños o en los organismos desnutridos.

Algunos estudios han demostrado que durante la desnutrición, baja la síntesis de albúmina y otras proteínas (Dramaix y col., 1993). También se ha observado que la disposición de proteínas está relacionada con la ganancia de peso y el crecimiento, cuando baja la tasa de crecimiento, baja la ganancia de peso y por lo tanto hay pobre disposición de proteínas. Sin embargo hay evidencias de que, individuos en los cuales hay pobre disposición de proteínas (como pérdida de nitrógeno) y pobre ganancia de peso, son capaces de mantener un crecimiento lineal. Si el crecimiento esquelético normal es dependiente de la disposición de proteínas, ¿cómo se mantiene el crecimiento en la presencia de una inadecuada deposición de proteínas? Una de las posibilidades propuestas es que, las proteínas se redistribuyan (es decir los aminoácidos para sintetizarlas) de órganos viscerales o el músculo hacia el esqueleto (Baur y col., 1991).

En otros trabajos, han encontrado relación de la desnutrición con las siguientes alteraciones: baja concentración de vitamina E, zinc, selenio y glutatión; una proporción reducida de NADPH/NADP⁺; baja actividad de glutatión peroxidasa y baja actividad inducible de glutatión-S-transferasa. Se han reportado altas concentraciones de ferritina circulante y hierro hepático como fuentes de estrés oxidativo. El glutatión participa en la síntesis de cisteinil leucotrieno, y se ha observado que a pesar de las bajas concentraciones de glutatión, puede el organismo seguir sintetizando el cisteinil leucotrieno. El glutatión también participa en otras funciones metabólicas como son: mantenimiento del estado azufrado de las proteínas, protección de las células a los agentes oxidantes y a los xenobióticos electrofílicos, locomoción de neutrófilos y modulación de receptor neuronal. Se ha encontrado que los niños con desnutrición tipo kwashiorkor y con tipo marasmo tienen niveles bajos de glutatión en forma reducida en los eritrocitos. Becker y colaboradores (1995) encontraron que los pacientes no tenían mecanismos compensatorios tales como un incremento en las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Consideran, además, que el desplazamiento de glutatión en la DCP puede estar directamente involucrado en la fisiopatología. Sin embargo, para evitar daño, se propone que se debe conocer más en relación a las funciones metabólicas que son influenciadas positivamente o negativamente por el glutatión.

El ácido linoleico y α -linoleico son ácidos grasos esenciales (AGE), el humano debe consumirlos de otras fuentes, ya que de ellos se derivan los ácidos grasos que tienen cadenas de 18, 20 y 22 carbonos y que presenten dos y seis enlaces dobles. Se ha demostrado una relación directa entre una dieta adecuada de proteínas y el metabolismo de los ácidos grasos esenciales. Las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados derivados de AGE podría modificar la estructura y función de la membrana celular, provocando un daño permanente, especialmente durante el periodo vulnerable de rápido crecimiento celular en el cerebro (antes de

18 meses) (Marín y col., 1991). Cedelhorm y col., por otro lado hicieron un estudio en niños desnutridos en donde encontraron que existe correlación entre las bajas concentraciones de AGE y la alteración en la hipersensibilidad cutánea (Cedelhorm y col., 1994).

Varios estudios han demostrado que la producción y concentración de hormonas están alteradas en los niños desnutridos. La hormona tiroidea, glucagón y la somatomedina se encuentran disminuidas, mientras que la hormona del crecimiento aumenta en concentración. La insulina y los glucocorticoides se han encontrado en concentraciones normales, reducidas o elevadas con una reducción significativa en la afinidad por su receptor (Brown y Brasel, 1990). Picarel-Blanchort y col. encontraron que en las ratas con una alimentación deficiente en calorías y proteínas tenían niveles de insulina significativamente menores a las ratas alimentadas adecuadamente, y presentaron una pobre respuesta de insulina a la glucosa. Además observaron que la velocidad del metabolismo de la glucosa fue más alto, por lo cual sugieren un incremento de la sensibilidad a la insulina. (Picarel-Blanchot y col., 1995).

La presencia del hígado graso observado en pacientes desnutridos, puede explicarse por medio de los siguientes mecanismos: incremento en la liberación de ácidos grasos hacia el hígado; alteración en la β -oxidación, expresión alterada de lipoproteínas; toxicidad en el hepatocito (Suskind y col., 1990).

Otros grupos de investigación se han interesado por las deficiencias de vitaminas y minerales encontradas durante la DCP ya que contribuyen a la alteración de la homeostasis así como también a los procesos metabólicos, inmunes y endócrinos (Albrecht y Pélissier, 1995). Velázquez y colaboradores, en su reporte de 1995, se enfocan en la biotina, una vitamina que funciona como cofactor de las carboxilasas, como la piruvato carboxilasa, la propionil CoA carboxilasa y otras. Las implicaciones de la deficiencia de esta vitamina son obvias, pues afectaría directamente a la obtención de energía en el niño desnutrido. Este grupo de trabajo ha encontrado evidencia de deficiencia de biotina en el plasma de algunos pacientes con DCP, por lo cual estudiaron las actividades de carboxilasas en linfocitos y sus respuesta al suplemento de biotina. Aunque existió gran variabilidad en los pacientes, observaron que un buen porcentaje de niños con desnutrición severa tuvieron actividades de propionil CoA carboxilasa deficientes. También encontraron que el mayor incremento relativo en la actividad de las carboxilasas fue visto en los individuos con menor actividades de carboxilasas y que además, recibieron el suplemento de biotina (Velázquez y col., 1995).

3.2. Efectos sobre la proliferación celular

Algunos estudios a nivel celular se han enfocado hacia el análisis de la proliferación celular. En estos trabajos, el ADN es la molécula que ha dado mayor información acerca de los cambios que ocurren durante el ciclo de vida de las células y ha sido útil para determinar la cinética de la proliferación celular y el tiempo de duración del ciclo celular. Se ha podido obtener esta información por medio de la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), un análogo de la timina que al añadirse al cultivo se incorporó a las cadenas de ADN durante su duplicación. Cuando se tiñeron los cromosomas con Giemsa, se logró la tinción diferencial de las cromátidas hermanas en relación a la cantidad de BrdU incorporada. Con esta metodología se ha analizado, la duración del ciclo celular en células de médula ósea de ratas desnutridas, tanto in vivo (Ortiz y Betancourt, 1984), como in vitro (Betancourt y col., 1992), y se ha encontrado un incremento de la duración del ciclo celular en los organismos desnutridos.

Por otro lado, en cultivos de linfocitos de niños desnutridos, se observaron periodos más cortos del ciclo celular, en comparación con los niños bien nutridos (Mutchinick y col., 1979; González y col., 1990). Sin embargo, en un trabajo llevado a cabo por Ortiz y col., en 1995 (a), se demostró que este aparente acortamiento del ciclo se debe a que una fracción de linfocitos tiene una respuesta a la fitohemaglutinina más rápida, que se relaciona con un periodo de latencia menor, esto es, un tiempo de transición de la fase G_0 a G_1 más corto. En ese mismo trabajo se observó además, que la fracción de células en activa proliferación es menor y que el incremento en la duración del ciclo celular y el menor porcentaje de linfocitos que responden al mitógeno persisten en los cultivos de niños desnutridos aún después de un periodo de recuperación nutricional de dos a seis meses.

Recientemente, Gómez y col. (1996) con la metodología de porcentaje de mitosis marcadas, por incorporación de timidina tritiada, determinaron en células de la médula ósea de ratas desnutridas durante la lactancia, que el incremento en la duración del ciclo celular es debido al incremento en la duración de la fase $G_1+1/2M$, lo que indica alteraciones en la síntesis de proteínas requeridas en actividades específicas para el desarrollo de esta fase del ciclo celular y la transición a la fase de síntesis del ADN. Una observación interesante en este trabajo es que no se observaron diferencias en la duración de la fase S (de síntesis de ADN) e inclusive ésta parece ser más breve en las células de las ratas desnutridas.

3.3. Estudios del efecto a nivel cromosómico

También se han realizado estudios con métodos citogenéticos como son: la frecuencia de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, y recientemente se ha estudiado la frecuencia de micronúcleos.

Las aberraciones cromosómicas son anomalías encontradas en los cromosomas de una célula, las cuales pueden ser numéricas o estructurales. Con los estudios de aberraciones cromosómicas se han obtenido diferentes resultados. Algunos autores encontraron diferencias significativas entre los organismos desnutridos y los testigos (Vijayalaxmi, 1975; Alu y Murthy, 1993), pero en otros estudios no se observaron diferencias en las aberraciones presentes entre ambos grupos (Thorburn y col., 1972).

El estudio de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) es complementario al estudio de las aberraciones, pues implica la aparición de daño en el material genético y su reparación por medio de ruptura y reunión del ADN. En un trabajo realizado in vivo, en células de médula ósea de ratas desnutridas durante la lactancia se observó un incremento en la frecuencia de ICH (Betancourt y col., 1986). Un comportamiento similar fue observado por Murthy y Srikantia en 1981, pero el estudio fue realizado en ratones adultos. En un estudio realizado por González en 1984, los linfocitos de niños desnutridos no mostraron aumento en la frecuencia de ICH por célula, al igual que en otro trabajo de Mutchinick en 1979. Mientras que, otros autores sí observaron aumento en la frecuencia de ICH en los linfocitos de niños desnutridos (Murthy y col., 1980; Ortiz y col., 1994).

Otro ensayo a nivel citogenético es el estudio de la frecuencia de micronúcleos, los cuales son fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no son integrados en el núcleo principal durante la división, por lo tanto son considerados como un buen indicador de daño cromosómico. La eficiencia en la detección de los micronúcleos se ha incrementado con el uso de la metodología de inhibición de la citocinesis. En linfocitos de bazo de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, se ha evaluado la frecuencia de micronúcleos y se observó una mayor frecuencia en las células de las ratas desnutridas en relación a la observada en ratas bien nutridas (Ortiz y col., 1995b).

3.4. Estudios del efecto a nivel del material genético

Recientemente, Betancourt y colaboradores (1995) realizaron un estudio en linfocitos de niños desnutridos, en el cual se observó, además del efecto causado por la desnutrición, el efecto producido por las enfermedades infecciosas y los medicamentos administrados. Para este fin el trabajo se realizó por medio del ensayo de electroforesis unicelular o del cometa, el cual revela el daño al ADN. Los resultados mostraron que las infecciones y la administración de medicamentos son factores importantes que pueden causar daño al ADN de niños desnutridos, en este trabajo se propone profundizar sobre el efecto de las diferentes infecciones, medicamentos y grados y tipos de desnutrición. Además, se considera importante, tomando en consideración las ventajas de los estudios en modelos animales, realizar investigaciones complementarios en ellos, se sugieren en particular, ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, para evaluar el efecto de la desnutrición por sí misma.

4. Detección de daño al ADN por medio de electroforesis unicelular.

4.1. Desarrollo de la metodología

El desarrollo de técnicas que permitan la detección de una manera sensible el daño al ADN es muy importante en diversos campos. En los últimos años se han desarrollado metodologías para mostrar los rompimientos en la molécula del ADN, pero manteniendo la individualidad de las células.

Rydberg y Johanson en 1978 (Citado en Tice, 1995) desarrollaron una metodología para cuantificar directamente el daño al ADN manteniendo la individualidad de las células. Este ensayo requería que las células embebidas en agarosa, fueran puestas en un portaobjetos, se les diera un tratamiento de lisis para romper membranas y un tratamiento alcalino para permitir el desenrollamiento del ADN; posteriormente, se neutralizaba y se teñía al ADN con naranja de acridina. Usando un fotómetro, observaban y medían el radio de la fluorescencia verde (indicando ADN de doble hebra) a la roja (indicando ADN de una sola hebra). Para probar la sensibilidad para detectar el daño en células individuales, Ostling y Johanson (citado en Tice 1995) desarrollaron en 1984 una técnica de electroforesis en microgel. En esta técnica, conocida comúnmente como el ensayo del cometa, las células embebidas en un gel de agarosa fueron colocadas en un portaobjetos y se les dio un tratamiento de lisis con una solución que contenía detergente y altas concentraciones de sales, después de esto fueron puestas en un campo eléctrico

(electroforesis) bajo condiciones neutras. Las células con un aumento en el daño mostraron un incremento en la migración del ADN hacia el ánodo. La migración fue cuantificada por medio de un intercalante fluorescente, bromuro de etidio. Sin embargo, por medio de este ensayo sólo se pueden ver las rupturas de doble hebra en la cadena de ADN, por tanto su utilidad se ha limitado (Tice, 1995).

En 1988, Singh y colaboradores propusieron otra técnica de electroforesis unicelular, en la cual se da un tratamiento alcalino antes de la electroforesis, para permitir que la molécula de ADN se desenrolle. Esta última modificación, permite que migre también el ADN que contiene la ruptura de sólo una de sus hebras. La electroforesis unicelular alcalina en gel (o ensayo del cometa) es relativamente rápida, simple y altamente sensible, para medir y analizar principalmente rompimientos de una sola hebra de ADN, aunque también se pueden detectar rompimientos de dos hebras (Singh y col., 1988, Tice, 1995).

4.2. Principios de la electroforesis unicelular alcalina

La electroforesis unicelular alcalina es una adaptación de otros métodos, como la sedimentación del nucleoide, y ensayo del halo. Durante el desarrollo del ensayo, se aprovechan algunas características de la molécula para hacer visibles los rompimientos. Las moléculas del ADN de las células eucariontes están superenrolladas y empaquetadas, lo cual permite que estén contenidas en el núcleo. Los rompimientos de una sola hebra, liberan el superenrollamiento e inducen a una estructura relajada. Si las células son permeabilizadas con detergente, y las proteínas son extraídas con gran cantidad de sales, el ADN queda en una estructura parecida al núcleo, denominada nucleoide, pero al existir un rompimiento, la estructura alterada del ADN, forma un halo alrededor del nucleoide. Además, si el nucleoide se coloca en un campo eléctrico, y se tiñe posteriormente con bromuro de etidio, en lugar de observarse el halo, se forma una estela, lo cual da una apariencia de cometa. Se ha encontrado que la longitud de la estela refleja la cantidad de rompimientos en una célula. También se ha encontrado que la intensidad de la fluorescencia se incrementa marcadamente con el incremento en la frecuencia de rompimientos (McKelvey-Martin y col., 1993).

La metodología propuesta por Singh ha tenido varias modificaciones, para aumentar la sensibilidad, ya sea para detectar mejor los rompimientos de una sola hebra, o los sitios sensibles a un medio alcalino. Dentro de las variables que afectan la sensibilidad se encuentran: concentración de la agarosa, composición de la solución de lisis, composición y pH del

amortiguador de electroforesis y condiciones de electroforesis (voltaje, corriente y duración) (Tice, 1995). En el cuadro 1 se señalan algunas características y variables que afectan el ensayo del cometa.

Cuadro 1.- Características y variables que presenta la electroforesis unicelular

Características	Variables que afectan la sensibilidad
Las células se mezclan con agarosa de bajo punto de fusión.	La concentración de agarosa de bajo punto de fusión.
La mezcla se coloca en un portaobjetos totalmente esmerilado.	Composición de la solución de lisis.
Las células son lisadas por detergentes y altas concentraciones de sales.	La composición y pH del amortiguador de electroforesis.
El ADN liberado se corre en electroforesis por corto tiempo bajo condiciones neutras o alcalinas.	Condiciones de electroforesis (voltaje, amperaje y duración)

El ensayo es ampliamente usado en estudios in vitro e in vivo para detectar daño y medir la capacidad de reparación en el ADN inducido por varios agentes, teniendo como modelo células de mamíferos. Las células provenientes del humano, como los linfocitos y fibroblastos, son las más estudiadas por medio de este ensayo (Singh y col., 1990; Vijayalaxmi y col., 1992; McKelvey-Martin y col., 1993; Betti y col., 1994). Sin embargo, algunos investigadores han encontrado de gran utilidad la electroforesis unicelular, para realizar estudios en animales, como son la rata y el ratón, y en diferentes tipos celulares como son: fibroblastos, linfocitos, células de la mucosa gástrica, de cerebro, hígado, bazo y de la mucosa intestinal (McKelvey-Martin y col., 1993). Las ventajas que presenta el ensayo del cometa se pueden resumir en el cuadro 2.

Cuadro 2.- Ventajas presentadas por la electroforesis unicelular.

- Alta sensibilidad
- Datos de células individuales
- Requiere de cantidades mínimas de muestra
- Relativamente fácil de realizar
- Se obtienen resultados en poco tiempo
- Se puede realizar en cualquier tipo celular, en cualquier especie animal.
- Posible identificación de tipos celulares
- Posible análisis automatizado

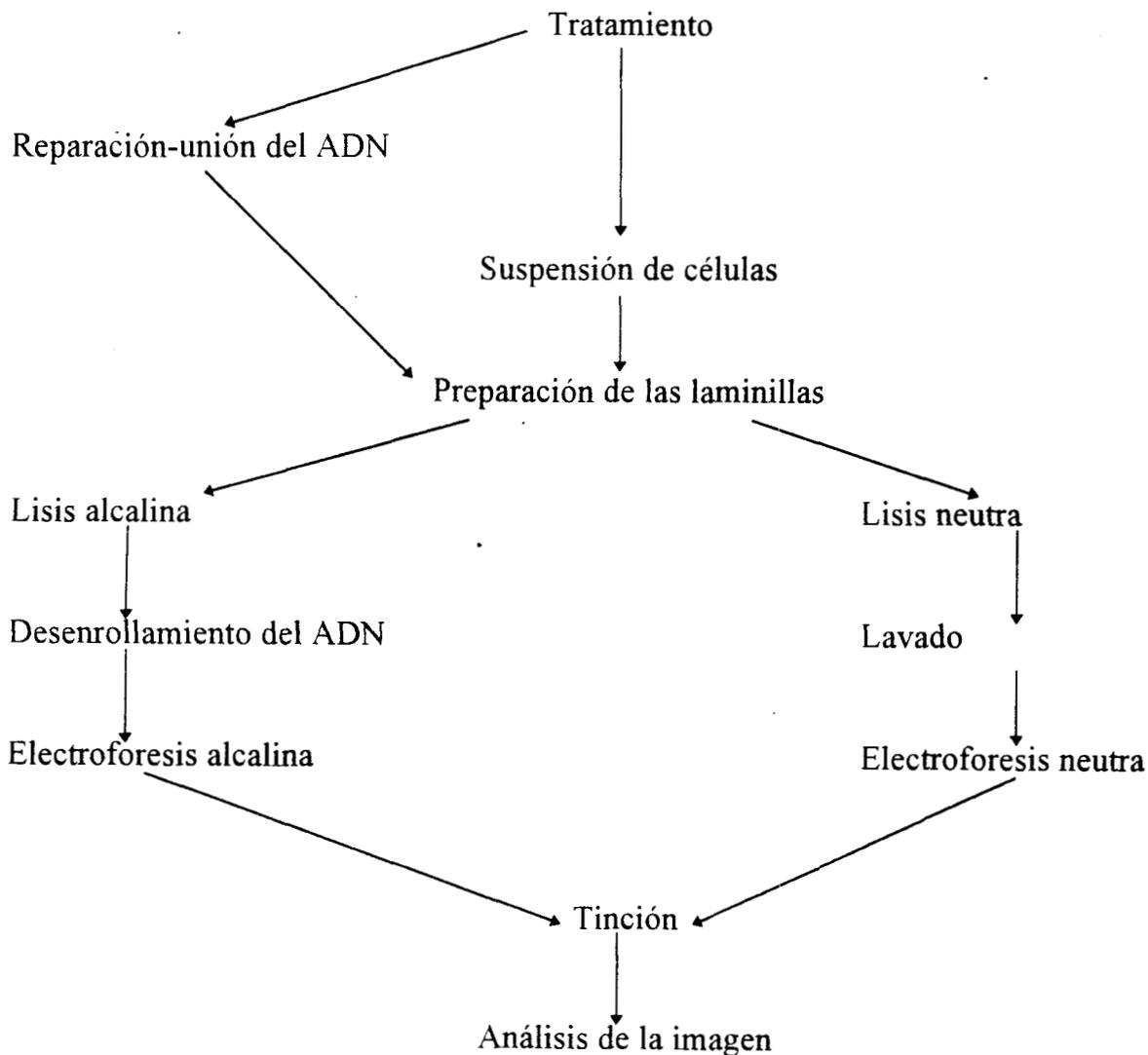
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SERVICIOS
SOCIALES - BIBLIOTECA

Una de las ventajas más importantes es la capacidad para detectar daño en cada célula, haciendo posible identificar subpoblaciones resistentes o sensibles a agentes dañinos para el ADN; además la sensibilidad para detectar daño al nivel de la célula individual es comparable a la obtenida en otros métodos los cuales miden el daño promedio para una población de células (Olive y col., 1992; Tice, 1995).

Otra ventaja que presenta es la facilidad para aplicar en combinación otras técnicas, y así obtener una mayor información de las células. Un ejemplo de lo anteriormente dicho es el trabajo de Strauss y col. (1994). En su estudio aplicaron principios de la técnica de separación inmunomagnética para distinguir en una electroforesis, a nucleoides correspondientes a los linfocitos T. En la metodología ellos mencionan un paso de marcaje de las células por medio de microesferas cubiertas con anticuerpos fluorescentes contra el antígeno de linfocitos T, para posteriormente hacer el ensayo del cometa, como lo describe Singh y col. (1988) con algunas modificaciones (Singh y col., 1990; Vijayalaxmi y col., 1992). El uso de las microesferas permite que se mantenga la marca debido a que quedan atrapadas en el gel, y por lo tanto no se pierden en los pasos de lisis y tratamiento alcalino; además, se comprobó que no afectan a la migración del ADN en la electroforesis. Las ventajas que representa esta modificación son obvias, pues al mismo tiempo que se detecta el daño al ADN, se pueden identificar subpoblaciones celulares, y esto ayudaría a detectar si una subpoblación tiene sensibilidad diferente a agentes causantes de daño, o si tienen diferente capacidad de reparación del mismo.

Olive y Banáth en 1992 lograron establecer una metodología de electroforesis unicelular, en la cual es posible distinguir a los nucleoides pertenecientes a células proliferantes de las no proliferantes. Esto lo lograron directamente por la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN y tratamiento de los cometas con anticuerpos anti-BrdU conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), con una posterior tinción de los cometas con yoduro de propidio (PI). Los cometas que contuvieran al anti-BrdU y PI tuvieron un color amarillo, a diferencia de las células no proliferantes (por lo tanto sin la marca de anti-BrdU) que tuvieron un color rojo.

Esquema General del protocolo del ensayo del cometa



4. 3. Estudios de daño inducido por radiación

La radiación ionizante es un agente ambiental ubicuo, que al interactuar con el ADN celular produce una variedad de lesiones primarias, tales como rompimiento de una sola hebra, de doble hebra, unión cruzada ADN-ADN y ADN-proteínas, y daño a las bases púricas y pirimídicas. Mientras varias de estas lesiones pueden estar involucradas en la muerte celular por radiación, rompimientos sin reparar comúnmente dirigen hacia una muerte celular (Olive y col., 1992). La evaluación de estas lesiones es un paso esencial para examinar la secuencia de eventos que desembocarían en efectos mutagénicos, carcinogénicos y letales de la radiación. Además, la radiación ionizante ha sido muy útil para buscar metodologías más sensibles para detectar daños pequeños al ADN, evitando así complicaciones de metabolismo implícitas en los fármacos, como son permeabilidad de la membrana, distribución intracelular y flujo de la droga, siendo ideal también porque permite dar rápidamente una dosis exacta a todas las células de una población (Fairbairn y col., 1995). Es por estas razones que los primeros trabajos en donde se aplica la técnica del cometa se realizaron con radiación ionizante como agente inductor de daño.

Cuando Singh y colaboradores (1988), propusieron la técnica de electroforesis unicelular alcalina, lograron correlacionar la longitud de la migración del ADN con la magnitud del daño presente en cada célula, expuesta a radiación X, en una exposición de 0.25 Gy. En 1992, Vijayalaxmi y colaboradores hicieron algunas modificaciones a esta metodología, permitiendo que la longitud del cometa así como también la distribución del daño entre las células, mostraran una respuesta en función de la dosis de la radiación y la duración del tratamiento del álcali. Con estas últimas modificaciones lograron detectar daño en dosis tan bajas de radiación ionizante como 0.05 Gy.

La detección del daño al ADN producida por radiación ionizante ha permitido estudiar los mecanismos de reparación ya sea en células con algunas alteraciones, o probando diferentes agentes protectores o inductores de daño (Rosselli y col., 1995; Nocentini, 1995; Müller y col., 1996). Otros trabajos han permitido observar que los tejidos responden de manera diferente a una dosis determinada, deduciendo de esta manera, que las células provenientes de diferentes tejidos pueden tener mayor protección al agente, o tal vez tienen mecanismos de reparación más eficientes (Fenech y col., 1991).

4. 4. Estudios de daño inducido por agentes químicos

Existe considerable interés acerca de los efectos potencialmente genotóxicos que resulten de la exposición a sustancias existentes en la naturaleza o hechos por el hombre, ya que la acumulación de daño genético involucrado en procesos celulares tales como división, reparación del ADN y muerte celular, tiene un reflejo en la aparición de cáncer o en la vejez (Fenech y Rinaldi, 1994).

El ensayo del cometa ha sido de gran utilidad en el área de la genética toxicológica, y gran número de investigadores han utilizado la versión alcalina para evaluar el efecto genotóxico in vivo y/o in vitro de sustancias químicas, permitiendo evaluar también la reparación. Como el ensayo del cometa se puede llevar a cabo usando técnicas de microcultivo, resulta ser muy valioso cuando sólo se dispone de cantidades muy limitadas del químico en prueba (Tice, 1995; Monteith y Vanstone, 1995).

4.4.1. Agentes alquilantes

Desde 1962, cuando la 7-metilguanina se encontró como un producto in vivo, de la dimetilnitrosamina administrada a ratas, la identificación de sitios modificados por agentes alquilantes ha incrementado que ahora se conoce que todos los oxígenos y nitrógenos de los nucleósidos en el ADN y ARN pueden ser modificados. Sin embargo, cada reactivo produce patrones característicos de alquilación, tanto in vitro como in vivo. (Singer, 1989).

Numerosos medicamentos utilizados en la quimioterapia son agentes alquilantes, por lo que también son muy estudiados. En 1992, Tice y colaboradores estudiaron el efecto de la combinación de algunos agentes alquilantes sobre linfocitos de sangre periférica en pacientes con cáncer mamario, por medio del ensayo del cometa; de este modo trataron de hacer una evaluación de la quimioterapia aplicada a los pacientes. Los autores propusieron la electroforesis unicelular alcalina como una posibilidad para hacer un seguimiento de los niveles de daño al ADN en pacientes tratados con agentes genotóxicos. Además, se ha reconocido que la heterogeneidad en la respuesta del medicamento representa un gran obstáculo para el efecto curativo de la quimioterapia (Schöber y col., 1994).

Otros autores han recalcado la importancia de la evaluación de la exposición ocupacional, ya que muchos agentes alquilantes se encuentran en el ambiente de trabajo en numerosas

industrias (Oesch y col., 1995). Las modificaciones producidas por este tipo de sustancias pueden resultar en mutaciones y eventualmente la carcinogénesis. Las células contrarrestan estas lesiones por un grupo de enzimas de reparación que reconocen las bases modificadas, lo cual puede producir sitios sin bases púricas o pirimídicas (Fortini y col., 1996).

5. Tejidos hematopoyéticos y sangre

Las células de la sangre tienen una vida media corta y deben sustituirse continuamente a partir de fuentes situadas fuera de la circulación. El proceso de formación de las células de la sangre se llama hematopoyesis, y los órganos donde tiene lugar se denominan órganos hematopoyéticos. Los órganos hematopoyéticos principales de los mamíferos adultos son la médula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos y el timo (Cormack, 1988).

Las dos subdivisiones principales de los tejidos hematopoyéticos son: tejido mieloide y tejido linfoide. El tejido mieloide produce los eritrocitos, plaquetas y la mayoría de los leucocitos, el cual corresponde a la médula ósea roja. El tejido linfoide está representado por el timo, folículos linfáticos, ganglios linfáticos y bazo. Una característica de los tejidos linfoides es que presentan poblaciones numerosas de linfocitos, puesto que son tejidos que participan en la producción de tales células o en las respuestas inmunitarias, o en ambos procesos. Esta subdivisión no es tan estricta, pues una clase importante de linfocitos son producidos en la médula ósea. Por otro lado, prenatalmente en el hombre (y tanto postnatalmente y prenatalmente en ratón y rata), el bazo sirve como asiento de una activa hematopoyesis mieloide, aunque se considera como órgano linfoide (Cormack, 1988; Fawcett, 1992).

5.1. Médula ósea

La médula ósea es el tejido más importante de los órganos hematopoyéticos, pues es el lugar principal de la hematopoyesis. Esta ocupa las cavidades cilíndricas de los huesos largos y los intersticios de la esponjosa de los cuerpos vertebrales, las costillas, el esternón y los huesos planos del cráneo y de la pelvis (Fawcett, 1992).

Dentro de los confines de los huesos, la médula ósea existe como un tejido ricamente celular y con sistema muy desarrollado de senos venosos de pared muy delgada (Fawcett, 1992).

Dos componentes pueden reconocerse en la médula: las células hematopoyéticas que comprenden la mayoría de los elementos celulares y un componente de estroma altamente organizado que apoya la proliferación de las células hematopoyéticas. Las células hematopoyéticas están transitoriamente en la médula y cuando maduran van hacia el torrente sanguíneo. El estroma, sin embargo permanece y sirve como andamiaje sobre el cual las células hematopoyéticas pueden diferenciarse y madurar. La hematopoyesis efectiva es el producto de la interrelación entre estos dos componentes (Tavassoli y Mendel-Yoffey, 1983).

Las células hematopoyéticas tienen una alta radiosensibilidad en comparación a otros tejidos (Kreja y col., 1996), sin embargo las células de la médula ósea son capaces de reconstruir por completo el sistema hematopoyético de un animal letalmente irradiado (Golub, 1982). Además todas las células sanguíneas son derivadas de una sola célula común, la célula basal hematopoyética (Tavassoli y Mendel-Yoffey, 1983).

5.2. Bazo

El bazo es un órgano abdominal situado en el hipocondrio izquierdo, por debajo del diafragma; está revestido en gran extensión por el peritoneo visceral; está unido al estómago, al diafragma y al riñón izquierdo por medio de pliegues peritoneales, llamados ligamentos gastroesplénico, frenicoesplénico y esplenorrenal (Fawcett, 1992). Este órgano está constituido por dos componentes, la pulpa roja y la pulpa blanca, las cuales deben su color a la que la primera contiene gran cantidad de eritrocitos y la segunda por presencia de los folículos linfoides que contienen gran cantidad de linfocitos (Cormack, 1988).

El bazo tiene función hematopoyética mieloide durante los últimos días de gestación y las primeras semanas de la vida postnatal en el ratón. En el hombre la hematopoyesis es detectable en aproximadamente a las 12 semanas de gestación. (Tavassoli y Mendel-Yoffey, 1983). La capacidad de regenerar células hemáticas del linaje mieloide se conserva durante toda la vida adulta, pero solo se expresa en condiciones anormales, por ejemplo, una anemia hemolítica severa (Cormack, 1988). Durante la edad adulta, se convierte en el principal sitio de destrucción de las células rojas. (Fawcett, 1992; Krishna, 1990). Además, el bazo es el órgano linfático cuya estructura facilita las respuestas inmunitarias a antígenos que han llegado a la sangre circulante y participa principalmente en la formación de anticuerpos (Cormack, 1988).

5.3. Sangre

La sangre es considerada como un tejido líquido constituido por eritrocitos (células sanguíneas rojas) y leucocitos (células sanguíneas blancas), suspendida en el plasma sanguíneo. Circula por el sistema vascular, transportando oxígeno desde los pulmones y sustancias nutritivas desde el tracto digestivo, hacia los otros tejidos del cuerpo; y transportando, para su excreción, CO₂ a los pulmones y productos de desecho nitrogenados a los riñones. La sangre lleva a cabo un constante intercambio de sustancias entre los componentes líquidos de la sangre y el líquido tisular, el cual es esencial para la supervivencia de las células en todos los órganos (Fawcett, 1992).

Aunque antes se pensaba que todas las células de la sangre llevaban a cabo sus funciones en el torrente circulatorio, pronto se demostró que no es así. Las plaquetas y los eritrocitos, células sin núcleo, llevan a cabo todas sus funciones en la sangre. Los leucocitos, células nucleadas, están transitoriamente en la sangre, pues emigran de modo constante a través de las paredes de los capilares y de las vénulas hacia el tejido conjuntivo, en donde desempeñan su función (Fawcett, 1992; Cormack, 1988).

5.4. Estudios citogenéticos en tejidos hematopoyéticos y en sangre

Numerosos estudios citogenéticos se han llevado a cabo en células provenientes de sangre periférica, médula ósea y bazo, para evaluar genotoxicidad bajo condiciones *in vivo* o *in vitro*, debido a las ventajas que ofrecen. Como ejemplo se mencionarán aquí algunos trabajos realizados en estos tipos de células.

Una prueba citogenética que ha sido muy útil para evaluar el potencial mutagénico de diversos agentes es la evaluación de aberraciones cromosómicas. Gollapudi y col en 1986, utilizaron este ensayo para evaluar la falta de ácido fólico en linfocitos de ratas. Algunos autores han estudiado las aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratas (Sinha y col., 1989). Otros han estudiado el efecto de algunas sustancias, utilizando este ensayo en cultivos de linfocitos humanos (Khalil y col., 1990).

En 1988 Sinha y colaboradores llevaron a cabo un trabajo en donde evaluaron la frecuencia de ICH basales en linfocitos de sangre periférica humana y de rata en diferentes medios de cultivo, en donde propone que las células sanguíneas de rata son un buen sistema de

prueba, pues son de relativamente fácil acceso. Algunos estudios se han llevado a cabo para ver el efecto citogenético producido in vivo por radiación gama (Morales-Ramírez y col., 1984), agua tritiada (Ikushima y col., 1984), o carcinógenos químicos (Shelby y col., 1989) en células de médula ósea de ratón. Krishna, en su reporte de 1986, recalcó la utilidad de hacer estudios en ensayos de ICH, tanto in vivo como in vitro, en células de médula ósea y bazo de ratón y hámster Chino como una herramienta sensible para la detección de agentes genotóxico (Krishna y col., 1986). Vian y col. (1993) llevó a cabo un trabajo en donde probó el efecto genotóxico de diferentes sustancias sobre linfocitos humanos; este autor hace hincapié en las ventajas que ofrecen los linfocitos humanos como sistema de prueba como son: en principio provienen de humanos, son células semisincronizadas y que pueden ser fácilmente estimuladas para dividirse.

Krishna y colaboradores (1990) estudiaron la genotoxicidad de la dimetilnitrosamina, utilizando el ensayo de micronúcleos, tanto en células de médula ósea como en células de bazo, para obtener información complementaria entre ambos tejidos e investigar diferencias entre ambos tejidos. Fenech y colaboradores, en 1991, llevaron a cabo un trabajo sobre el efecto de la radiación en el cuerpo entero de ratón, en donde propusieron a los linfocitos de sangre periférica y células de bazo de ratón como un buen modelo para estudiar la inducción de micronúcleos. Benning mencionó que la principal ventaja del bazo en estudios in vivo, es su ubicación dentro del cuerpo (Benning y col., 1992). Fenech y Rinaldi hicieron un trabajo en 1994, en donde ven la relación de micronúcleos en linfocitos humanos y los niveles de vitamina C, E, B₁₂ y ácido fólico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la línea de investigación "Efectos a nivel celular y genético causados por la desnutrición", se han realizado varios estudios en diferentes tipos celulares a nivel celular y citogenético como son la proliferación celular, la frecuencia de ICH y la frecuencia de micronúcleos en donde se han observado diferencias entre las ratas desnutridas experimentalmente y las bien nutridas. Para entender los efectos causados por la DCP, ha sido de gran utilidad realizar estudios en un modelo animal. El modelo experimental en ratas, en el cual se induce la desnutrición, ofrece la ventaja de controlar variables que pudieran enmascarar o alterar los efectos de la desnutrición, como puede ser el caso de la presencia de una infección; también ofrece la ventaja de poder hacer estudios que desde el punto de vista ético tienen limitaciones para realizarse en humanos.

Actualmente, es de interés estudiar el probable daño en el ADN producido por la desnutrición y evaluar si éste se presenta en diferentes tipos celulares, en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. Para este fin se realiza el estudio en células de médula ósea, debido a su importancia en la función hematopoyética, en células de bazo, por su importancia en la maduración de los linfocitos y en células de sangre periférica, por su importancia en el funcionamiento del sistema inmune. Debido a la heterogeneidad celular de los tejidos seleccionados, se hace la separación de los linfocitos de bazo y sangre y de la serie linfoide de médula ósea, para observar su respuesta a la DCP.

OBJETIVO

222479

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el daño en el ADN por medio de electroforesis unicelular, en diferentes células, de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia.

HIPÓTESIS

Si la DCP es capaz de causar daño a nivel de ADN en células provenientes de ratas desnutridas experimentalmente, es posible detectarlo por medio de la electroforesis unicelular.

Si la DCP causa el daño, las células pueden tener sensibilidad diferente, dependiendo del tipo celular y del tejido del cual provengan.

MATERIAL Y METODOS

1. Desnutrición Experimental Durante la Lactancia

Se emplearon ratas de la cepa Wistar de la colonia del Bioterio de la UAM-I. Las ratas, al día siguiente de su nacimiento, se distribuyen en dos lotes: lote experimental (desnutridas) y lote testigo (bien nutridas). La desnutrición se indujo por competencia de alimento durante la lactancia, y para lograrlo se colocaron 15 crías con una nodriza (lote experimental) y el lote testigo cinco crías con su nodriza. Se determinó el incremento en peso cada dos días hasta los 21 días de edad (día del destete). (Ortiz y Betancourt, 1984).

Se consideraron ratas con desnutrición severa aquellas que tuvieron un déficit mayor al 40% en relación a ratas bien nutridas de la misma edad. El número de ratas en este estudio fue de al menos diez bien nutridas y diez desnutridas.

2. Obtención de células

2.1. Extracción de Sangre

Las ratas de 21 días de edad, se anestesiaron con éter, y con una jeringa heparinizada se les extrajo la sangre por punción cardiaca.

2.2. Extracción de Médula Ósea

Las ratas se sacrificaron con una sobredosis de éter. Posteriormente se disectó el fémur, se cortaron las dos cabezas del fémur, y se introdujo la aguja de una jeringa con 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, libre de Ca^{++} y Mg^{++} , Microlab) libre de calcio y magnesio y se extrajo la médula ósea. Se resuspendió suavemente con una pipeta pasteur. Se extrajo la médula ósea de 10 ratas bien nutridas y 10 ratas desnutridas.

2.3. Extracción de Bazo

Se disectó el bazo y se colocó en una caja con PBS con 20 mM de EDTA (Sigma). El tejido se cortó con tijeras de disección, hasta lograr cortarlo en trozos muy pequeños, permitiendo así que las células se resuspendieran en PBS. Se extrajo el bazo de 12 ratas bien nutridas y 11 desnutridas.

2.4. Separación de Linfocitos

En un tubo de centrifuga se añaden 2 ml de linfograd (Microlab), después se añadió la suspensión celular en PBS, cuidando de que no se mezclaran las dos soluciones. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos. Los linfocitos separados quedaron en la interfase de las dos soluciones. Los linfocitos se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y el paquete celular se resuspendió en PBS. La separación de linfocitos se hizo para la sangre (9 ratas BN y 9 DN), el bazo (10 ratas BN y 10 DN), y con el mismo método se separó la serie linfoide de la médula ósea (10 ratas BN y 10 DN).

Se trató que de una misma rata se obtuvieran todas las células antes mencionadas, sin embargo por diferentes razones, esto no fue posible.

2.5. Congelamiento de las células sanguíneas

Las células se colectaron, centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en una solución de 90% de suero fetal de ternera inactivado por calor (60°C durante 30 minutos) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma). Se colocó la suspensión celular en un criotubo y se guardó en un ultracongelador a -40°C.

2.6. Descongelamiento

El criotubo con las células congeladas se descongeló y fue centrifugado inmediatamente a 1200 rpm durante 10 minutos. Se quitó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 3 ml de PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} y se centrifugó por 10 min a 1200 rpm.

2.6. Viabilidad

La viabilidad se midió en todas las muestras por medio del método de incorporación de azul tripano (Microlab). Las células vivas se observaron al microscopio sin teñir, mientras que las muertas se tiñeron completamente.

3. Ensayo de Electroforesis Unicelular

3.1. Preparación de geles

El ensayo se basó en la descripción de Singh y col. (1988), con algunas modificaciones.

Se prepararon agarosa de bajo punto de fusión y agarosa regular al 0.5% y 0.75% respectivamente, en amortiguador de sales de fosfatos (PBS, Microlab) libre de calcio y magnesio, se calentaron en horno de microondas para disolver (30 segundos aproximadamente).

Se colocaron 120 μ l de agarosa regular en un portaobjetos completamente esmerilado (marca Fisher finest) y se colocó un cubreobjetos, cuidando de no formar burbujas y se dejó solidificar por aproximadamente 10 minutos. Después de que solidificó la capa de agarosa, se removió el cubreobjetos y se agregaron sobre el portaobjetos 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión conteniendo aproximadamente 10^5 células. Se colocó un cubreobjetos y se dejó enfriar sobre hielo, para que se solidificara rápidamente, aproximadamente 5 minutos. Se removió el cubreobjetos y se añadieron 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión, se dejó solidificar sobre hielo por 5 minutos aproximadamente. El cubreobjetos se quitó y la preparación se dejó inmerso en una solución de lisis que fue preparado como sigue: NaCl 2.5 M (Técnica Química), EDTA (Sigma) 100 mM, sarcosinato de sodio al 1% (Sigma) y Tris 10 mM (Sigma), a un pH de 10.0, y se agregó Tritón X-100 al 1% (v/v)(Sigma) y DMSO al 10%.

Después de una hora a 4°C, las preparaciones se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una caja de electroforesis horizontal (Biorad). Los reservorios se llenaron con amortiguador de electroforesis preparado con NaOH 300 mM (Técnica Química) y EDTA 1 mM en agua desionizada, la solución cubrió a las preparaciones y se permitió el desenrollamiento del ADN por exposición a un medio alcalino durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se conectó

la fuente de poder, se ajustó a 25 volts y 300 miliamperes, y se dejó correr la electroforesis durante 15 minutos. Después del tiempo de electroforesis, las preparaciones se retiraron de la cámara, se colocaron en una superficie y se gotearon hasta que se cubrieron con amortiguador de neutralización (Tris 0.4 M, se ajustó el pH con HCl a 7.5), dejándolos por 5 minutos. Se repitió el proceso dos veces más.

Las preparaciones se hicieron por triplicado en cada muestra de células. Todas fueron codificadas en el momento de elaborarlas para ser analizadas en ciego.

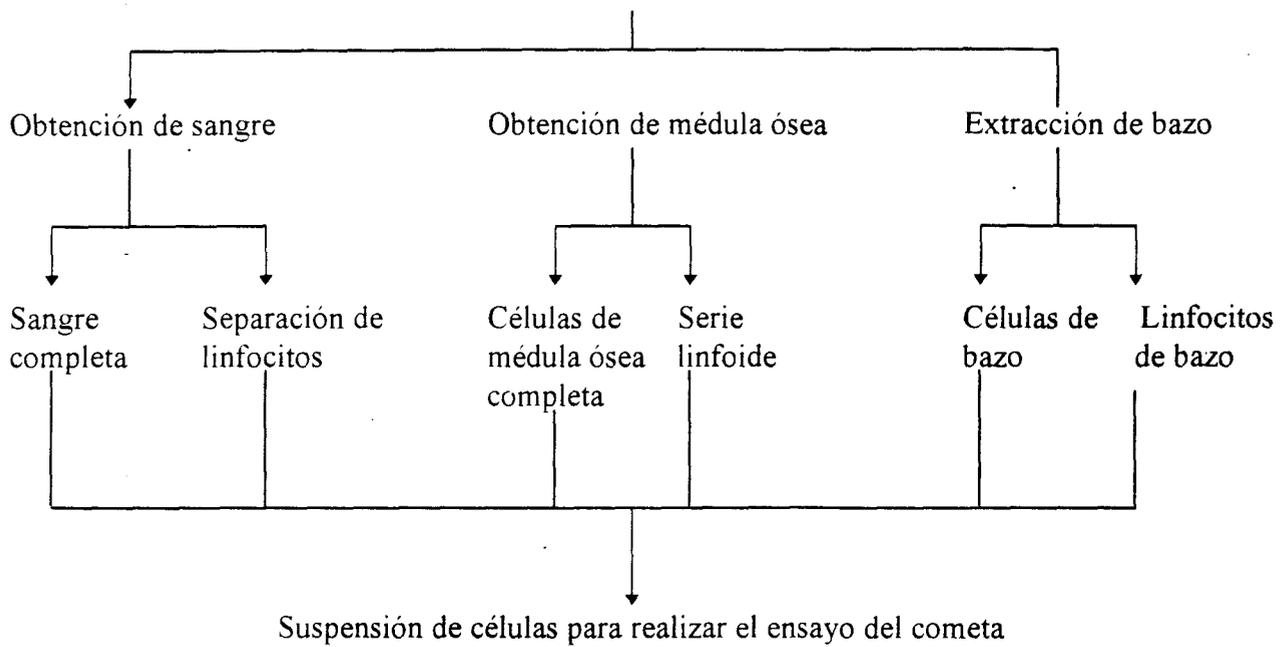
3.2. Tinción de las Células y Observación

Para la tinción de las electroforesis se utilizaron 50 μ l de una solución de bromuro de etidio en una concentración de 2 μ g/ml en agua destilada, . Las observaciones se hicieron con un objetivo 40x en un microscopio de epifluorescencia (Olympus), equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Se contaron 100 células por tejido, 50 células en dos preparaciones, y se contó una tercera cuando se observó disparidad en alguna de las dos preparaciones contadas. La longitud de la cola se midió a partir de del límite del nucleoide hasta el final de la cola. La longitud fue medida por medio de un analizador de imágenes marca Synoptics, por medio del programa VIDS.

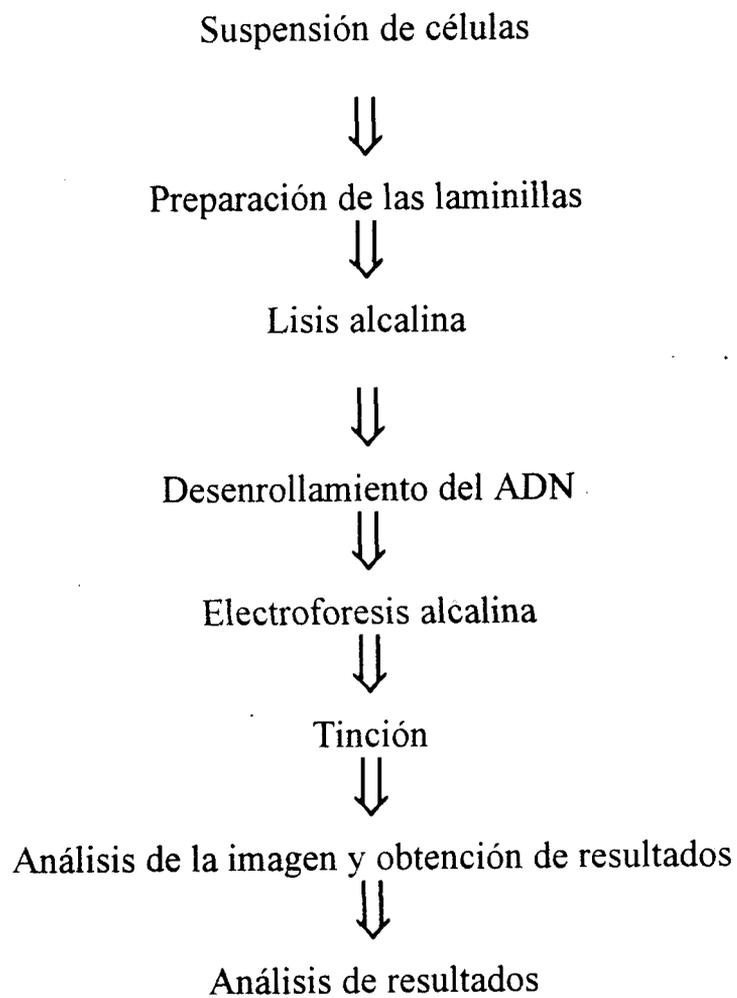
Los siguientes esquemas resumen la metodología que se realizó en el presente trabajo.

Desnutrición y obtención de células

Desnutrición experimental durante la lactancia



Esquema General del protocolo del ensayo del cometa



4. Análisis de Resultados

Se obtuvo el promedio de migración de ADN por rata, para determinar diferencias entre los grupos en la longitud de la estela, la cual se relaciona con el nivel de daño. El análisis estadístico se realizó por medio de las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney, comparándose el efecto de la desnutrición sobre el daño al ADN y la sensibilidad diferencial de cada tipo celular. Además, los nucleoides fueron clasificados por intervalos, según el grado de migración que presentaron y fueron comparados por medio de la prueba de X^2 .

También se obtuvo el coeficiente H, que se calcula dividiendo la varianza sobre el promedio. El coeficiente H es una medida de dispersión, en relación a la variabilidad intercelular, que indica la homogeneidad en los datos cuando el valor de H es bajo o la heterogeneidad en los datos cuando es alto. Se hizo el análisis estadístico por medio de las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

1. Peso de las ratas

Se estudiaron 16 ratas bien nutridas (BN) y 16 ratas desnutridas (DN). Los pesos de las ratas de ambos grupos, a los 21 días de edad, se muestran en el Cuadro 1; el promedio para ratas testigo fue de 50.1 ± 7.2 g, mientras que en las DN fue de 25.0 ± 3.0 g, siendo estadísticamente diferentes. También en este cuadro se muestra el déficit de peso en las ratas DN, el cual es en promedio de $50.7 \% \pm 5.7$ y varía dentro de un intervalo de 40.1 a 59.1%, considerándolas de esta manera como ratas con desnutrición grave.

Al momento de hacer las camadas experimentales (DN) y las camadas testigo (BN), el peso de las ratas a un día de nacidas no mostraron diferencia estadística; sin embargo, durante el periodo de la lactancia y al final de ella (21 días), se observa que el incremento de peso fue mucho menor en el grupo experimental, en comparación al grupo testigo.

2. Viabilidad

La viabilidad se midió en todas las muestras de los diferentes tipos celulares, tanto en ratas bien nutridas como en las desnutridas. En todos los casos se observó una alta viabilidad, con un porcentaje mayor o igual al 90 % de células vivas.

3. Daño al ADN

El cuadro 2 muestra el promedio de migración del ADN en las células de bazo en 12 ratas BN y 11 ratas DN, así como también el error estándar (E.E.) y el coeficiente de dispersión H. El promedio de migración en 12 ratas BN fue de $12.30 \mu\text{m}$ con un E.E. de 1.18, con un intervalo de 5.18 a $18.80 \mu\text{m}$, mientras que en las DN el promedio fue de $18.25 \mu\text{m}$, con un intervalo de 9.63 a $36.33 \mu\text{m}$, y un E.E. de 2.29. Los grupos se compararon por medio de la prueba no paramétrica, U de Mann- Withney. Al comparar ambos grupos se encontró que diferencia estadística, siendo mayor la migración en el grupo DN ($p < 0.05$). Al hacer la comparación del coeficiente H, no se observó diferencia, por lo cual se puede decir que en ambos grupo existe la misma variabilidad.

El cuadro 3 muestra que el grupo de ratas BN (n= 10) tuvo una migración de 5.81 μm , dentro de un intervalo de 1.41 a 11.14 μm , en células de médula ósea, y un E.E. = 0.98, mientras que el grupo DN (n= 10) tuvo una migración de 13.41 μm , más del doble con respecto al grupo BN, con valores desde 7.50 a 35.93 μm y un E.E. = 2.67. El grupo de las DN (n= 10) mostró tener mayor migración del ADN que en el grupo de BN ($p < 0.05$). Al comparar el coeficiente H, no se encontró diferencia estadística entre ambos grupos.

CUADRO 1. Peso de las ratas bien nutridas y desnutridas a los 21 días de edad.

Bien nutridas		Desnutridas	
Rata	Peso en g	Peso en g	Déficit (%)
1	45.3	27.2	45.7
2	62.5	22.5	55.1
3	47.1	23.1	53.9
4	56.1	21.4	57.3
5	50.6	22.7	54.7
6	47.3	28.0	44.1
7	40.2	20.9	58.3
8	57.8	25.3	49.5
9	57.8	30.0	40.1
10	47.2	20.5	59.1
11	51.2	26.1	47.9
12	49.3	25.1	49.9
13	44.1	24.0	52.1
14	62.1	28.1	43.9
15	52.3	26.6	53.1
16	44.4	27.0	46.1
Prom.=	50.1	25.0	50.7
D.E.	7.2	3.0	5.7

CUADRO 2. Promedios de migración del ADN en células de bazo de ratas bien nutridas y desnutridas a los 21 días de edad.

Bien nutridas				Desnutridas			
Rata n=12	migración (μm)	E.E.	H	Rata n=11	migración (μm)	E.E.	H
1	5.18	1.72	56.95	1	9.63	1.53	36.63
2	6.85	1.46	30.98	2	12.99	2.46	46.57
3	9.27	2.13	49.03	3	13.68	2.53	70.64
4	9.52	1.90	38.03	4	13.79	1.93	37.41
5	11.90	2.03	34.93	5	13.89	2.20	51.26
6	12.32	2.71	59.49	6	14.11	2.16	33.22
7	12.75	2.40	45.09	7	18.07	3.34	61.22
8	13.68	1.92	27.09	8	21.48	2.83	38.43
9	14.12	2.56	47.64	9	21.57	2.58	30.76
10	15.88	1.92	23.66	10	25.27	3.76	72.03
11	17.31	3.45	68.65	11	36.33	2.76	21.47
12	18.80	3.27	56.82				
Prom.=	12.30	1.18	44.86		18.25	2.29	45.42
E.E.=			4.08				5.39

222479

CUADRO 3. Promedios de migración del ADN en células de médula ósea de ratas bien nutridas y desnutridas a los 21 días de edad.

Bien nutridas				Desnutridas			
Rata n=10	migración (μm)	E.E.	H	Rata n=10	migración (μm)	E.E.	H
10	1.41	6.63	35.12	1	7.50	1.76	41.13
6	3.12	1.05	43.28	6	7.73	1.45	41.15
1	3.38	1.21	23.56	10	8.15	1.70	35.58
11	4.12	0.98	36.72	3	9.17	1.72	48.33
3	5.16	1.79	31.12	4	9.94	1.96	38.84
5	5.70	1.45	35.66	9	12.53	1.62	21.76
2	5.84	1.17	62.10	7	12.84	2.53	50.32
12	8.89	2.05	47.64	2	13.64	2.01	29.75
8	9.38	1.84	36.20	11	16.64	2.17	28.31
9	11.14	1.75	41.17	8	35.93	2.82	22.13
Prom.=	5.18	0.98	39.26		13.41	2.67	35.73
E.E.=			3.24				3.18

El promedio de migración de los leucocitos de sangre se muestran en el cuadro 4. El promedio de migración en el grupo BN (n=10) fue de 19.39 μm y E.E. = 1.98, con valores que van de 11.82 a 29.31 μm . El grupo DN (n=10) tuvo en promedio, una migración del ADN de 44.35 μm (más del doble), con valores desde 12.80 hasta 88.80 μm , y E.E. de 7.70. Los coeficientes H fueron de 38.19 con un E.E. en ratas bien nutridas, y 30.89 con un E.E. de 3.48 en ratas desnutridas. Los datos de este cuadro muestran que las ratas DN tienen significativamente mayor migración que la observada en las ratas BN ($p < 0.05$). Al comparar el coeficiente H, se observa que no hay diferencia estadística.

CUADRO 4. Promedios de migración del ADN en leucocitos de sangre de ratas bien nutridas y desnutridas a los 21 días de edad.

Bien nutridas				Desnutridas			
Rata	migración (μm)	E.E.	H	Rata	migración (μm)	E.E.	H
6	11.82	2.38	47.88	7	12.80	1.57	28.63
7	11.89	1.87	46.02	6	14.59	1.96	39.16
12	16.63	1.74	18.13	1	23.34	4.20	46.30
2	16.87	2.35	32.63	10	36.76	3.05	25.75
11	17.39	2.36	31.95	5	42.61	4.10	42.61
13	17.53	2.96	49.08	12	45.90	3.60	28.80
3	19.77	2.12	34.85	4	46.52	3.50	26.17
14	22.97	2.86	36.41	13	62.20	2.20	11.90
5	29.77	4.22	37.69	14	70.00	3.10	19.10
15	29.31	4.96	47.22	3	88.80	8.50	40.50
Prom.=	19.39	1.98	38.19		44.35	7.70	30.89
E.E.=			3.05				3.48

Los datos de la migración en nucleoides de linfocitos de bazo se muestran en el cuadro 5. Aquí se puede observar que las ratas BN tuvieron 10.57 μm de daño en promedio (n=10), con un intervalo de 1.39 a 37.90 μm , y un E.E.= 3.66. Las ratas DN mostraron un promedio de migración de 20.94 μm (n= 10), y un E.E.= 5.67, con un intervalo de 2.40 a 49.90 μm . Los valores del coeficiente H fueron de 30.23 con un E.E. = 2.80 en el grupo BN, y 30.84 con un E.E.= 3.47 en el grupo DN. El daño mostrado por las ratas desnutridas, fue casi el doble en comparación con las ratas bien nutridas, lo cual dió una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El coeficiente de dispersión no fue significativamente diferente entre ambos grupos.

CUADRO 5. Promedios de migración del ADN en linfocitos de bazo de ratas bien nutridas y desnutridas a los 21 días de edad.

Bien nutridas				Desnutridas			
Rata	migración (µm)	E.E.	H	Rata	migración (µm)	E.E.	H
2	1.39	0.68	17.29	15	2.40	1.57	28.63
1	1.69	0.69	28.20	4	5.01	1.96	39.16
6	3.38	1.10	35.96	1	6.13	4.20	46.30
16	4.84	1.49	46.05	6	9.12	3.05	25.75
5	5.08	1.27	31.74	9	11.44	4.10	42.61
10	5.43	1.83	30.82	16	14.77	3.60	28.80
8	8.22	1.44	25.17	7	26.71	3.50	26.17
12	16.70	2.61	40.85	11	36.63	2.20	11.90
11	21.12	3.34	25.35	2	47.26	3.10	19.10
9	37.90	2.81	20.92	8	49.90	8.50	40.05
Prom.=	10.57	3.66	30.23		20.94	5.67	30.84
E.E.=			2.80				3.47

Los datos del cuadro 6 muestra el daño al ADN en médula ósea separada. El grupo BN tuvo una migración de 8.83 µm, con valores desde 2.78 µm hasta 26.02 µm y un E.E.= 2.18. El grupo DN muestra una migración de 16.23 µm, con un valor mínimo de 3.21 µm y un máximo de 47.27 µm, y un E.E.= 4.28. En este cuadro se puede ver que las ratas desnutridas tienen mucho mayor daño (casi el doble) en promedio que el grupo de ratas bien nutridas ($p < 0.05$). Con respecto al coeficiente H, no se encontró diferencia significativa entre el grupo BN (Promedio de 38.17, E.E. = 5.48) y el grupo DN (40.59 en promedio, E.E.= 5.05)

El cuadro 7 muestra la migración en los linfocitos de sangre, tanto en ratas BN como ratas DN. En el grupo BN se observa un valor mínimo de 21.35 µm y un máximo de 54.90 µm, con un promedio de 38.22 µm y un E.E.= 4.21. El grupo DN tuvo como mínimo 31.66 µm y un máximo de 70.77 µm, con un promedio de 55.08 y un E.E. = 5.38. Con estos datos se puede observar que las células de las ratas desnutridas tienen mayor daño al ADN que las ratas bien nutridas ($p < 0.05$). El coeficiente H no fue diferente estadísticamente entre el grupo BN y (promedio= 15.27, E.E.= 3.74) y el grupo DN (promedio= 10.95, E.E.= 3.04). El valor menor de coeficiente H indica una mayor homogeneidad en daño entre las células con mayor daño.

CUADRO 6. Promedios de migración del ADN en médula ósea separada de ratas bien nutridas y desnutridas a los 21 días de edad.

Bien nutridas				Desnutridas			
Rata	migración (μm)	E.E.	H	Rata	migración (μm)	E.E.	H
16	2.78	1.48	78.70	9	3.21	1.43	63.83
1	3.72	1.34	46.62	15	4.10	1.43	49.93
6	4.80	1.36	38.36	7	8.34	1.65	41.63
10	6.11	1.62	42.96	1	8.82	1.73	50.99
2	6.20	1.00	17.32	4	10.96	2.10	41.63
5	7.39	1.38	25.76	11	13.85	1.88	26.69
8	7.49	1.60	34.20	10	14.61	2.09	29.71
11	11.63	1.57	32.02	6	21.03	4.15	45.81
12	12.17	1.90	44.58	8	30.12	5.28	49.01
9	26.02	2.35	21.19	16	47.27	1.78	6.69
Prom.=	8.37	1.99	38.17		20.94	5.67	40.59
E.E.=			5.48				5.05

CUADRO 7. Promedios de migración del ADN en linfocitos de sangre ratas bien nutridas y desnutridas a los 21 días de edad.

Bien nutridas				Desnutridas			
Rata	migración (μm)	E.E.	H	Rata	migración (μm)	E.E.	H
2	21.35	2.79	36.63	7	31.66	2.22	15.57
12	22.45	2.19	21.41	1	36.28	3.34	30.78
5	30.69	2.40	18.77	6	39.62	2.19	11.50
6	34.09	1.66	8.09	3	55.48	1.46	3.87
11	34.41	2.78	22.45	10	55.50	2.74	13.50
9	45.79	1.76	6.76	9	61.01	2.92	13.97
8	45.89	2.87	17.95	16	68.10	1.51	3.33
16	54.38	1.24	2.85	4	77.28	1.33	2.29
17	54.90	1.18	2.54	2	70.77	1.62	3.74
Prom.=	38.22	4.21	15.27		55.08	5.38	10.95
E.E.=			3.74				3.04

Cuando se compararon todos los grupos se encontró diferencia estadística significativa en la migración de ADN ($p < 0.05$). Esta diferencia se observó que es debido a la desnutrición, como se considera en los párrafos anteriores. Sin embargo, también se observó que el tipo celular contribuye, es decir que un tejido muestra más daño que otro. Se encontró que tanto en ratas bien nutridas como en ratas desnutridas, el tejido que muestra menos daño es la médula ósea completa, mientras que en los leucocitos de sangre es mayor (Cuadro 8). Además, se comparó entre tejido completo y células separadas, observándose que las células de médula ósea separada y los linfocitos de bazo y sangre tienen mayor migración en comparación a las células no separadas ($p < 0.05$).

CUADRO 8. Promedio de migración (μm) del ADN en los diferentes tipos celulares de ratas bien nutridas y desnutridas

Tipo celular	Bien nutridas		Desnutridas	
	Prom.	E.E.	Prom.	E.E.
Bazo	12.30	1.18	18.25	2.29
Médula ósea	5.81	0.98	13.41	2.67
Leucocitos de sangre	19.39	1.98	44.35	7.70
Linfocitos de bazo	10.57	3.66	20.94	5.67
Serie linfoide de médula ósea	8.83	2.14	16.23	4.28
Linfocitos de sangre	38.22	4.20	55.08	5.38

Cuando se compararon los coeficientes de dispersión entre los diferentes tejidos, se encontró que los leucocitos de sangre tienen menor dispersión que las células de bazo en ratas desnutridas ($p < 0,05$). También se encontró que los linfocitos de sangre tienen un valor H significativamente menor que los linfocitos de bazo y la serie linfoide de médula ósea en ratas DN ($p < 0.05$). En el caso de las ratas bien nutridas, se encuentra que los leucocitos de sangre tienen menor dispersión que en bazo ($p < 0.05$), además esta diferencia se mantiene en los linfocitos aislados de ambos ($p < 0.05$).

Las Figuras del 1 al 6 muestran la distribución en porcentaje, de la migración del ADN en células de cada tipo celular. Se puede observar que en el caso del bazo y la médula ósea, el porcentaje de nucleoides con una migración menor a 20 μm es cercana al 80 % en casi todas las ratas bien nutridas, mientras que en las ratas desnutridas disminuye este porcentaje en algunas. En el caso de los leucocitos de sangre, se puede ver que el porcentaje de nucleoides con una migración menor o igual a 20 μm varía en las ratas bien nutridas, aproximadamente desde un 40% hasta cerca del 80 %. Sin embargo, en el caso de las ratas desnutridas se observa que este porcentaje disminuye a menos del 40 % en varias de ellas. Además se puede ver que en casi todas las ratas existen dos picos en la distribución.

En el caso de los linfocitos de bazo y la serie linfoide de médula ósea también se observa el mismo comportamiento mostrado por las células sin separar. En el caso de los linfocitos de sangre se observa que el porcentaje de nucleoides con migración menor a 20 μm disminuye en las ratas bien nutridas en comparación a los leucocitos de sangre. Además es evidente que en las ratas desnutridas se desplaza la distribución en cuanto a la migración, indicando que aumenta el porcentaje de nucleoides con una mayor migración del ADN, y se observa que desaparece uno de los picos observados en las leucocitos.

Figura 1a. Distribución (%) de la migración en células de bazo en ratas bien nutridas

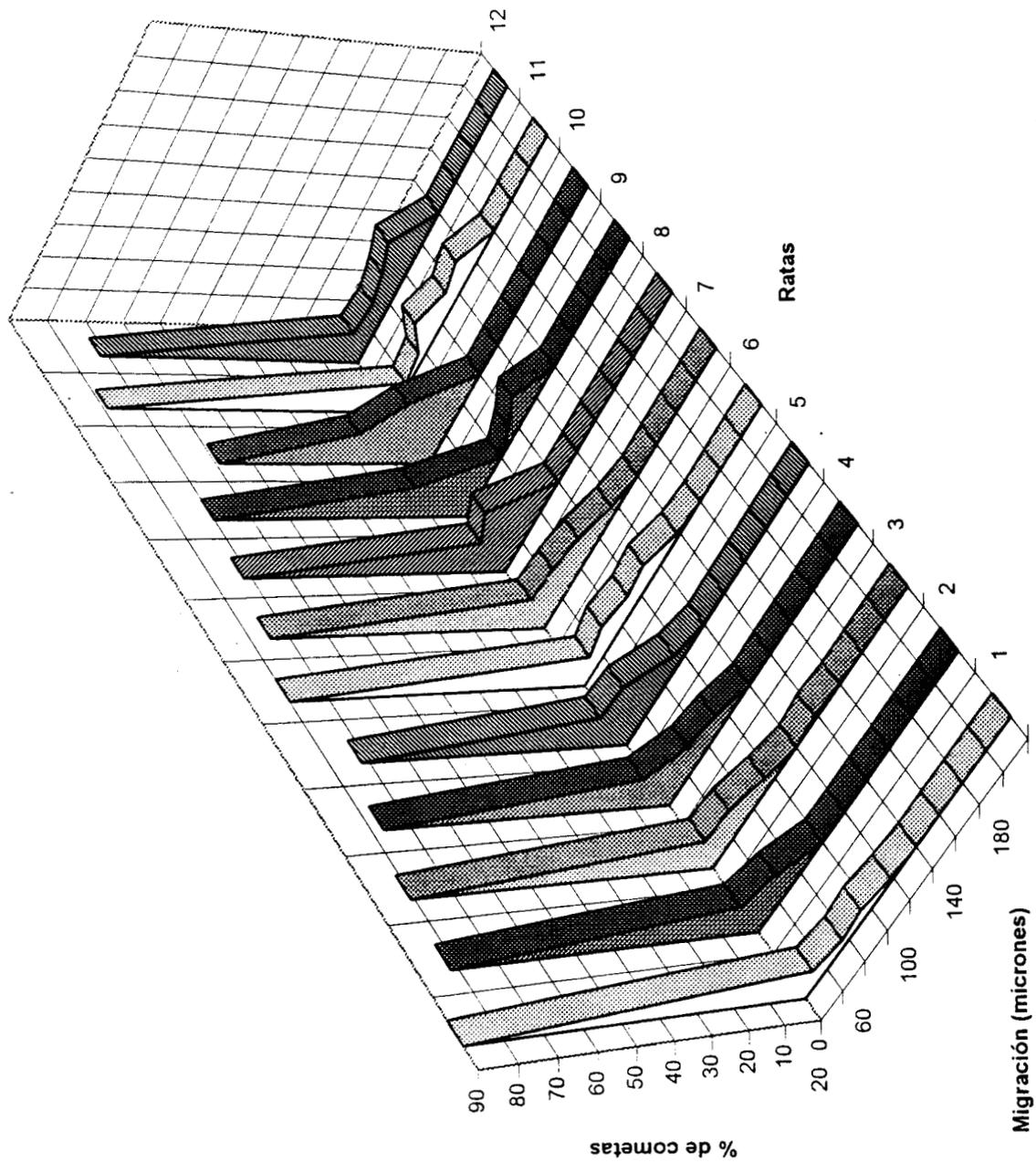


Figura 1b. Distribución (%) de la migración en células de bazo en ratas desnutridas

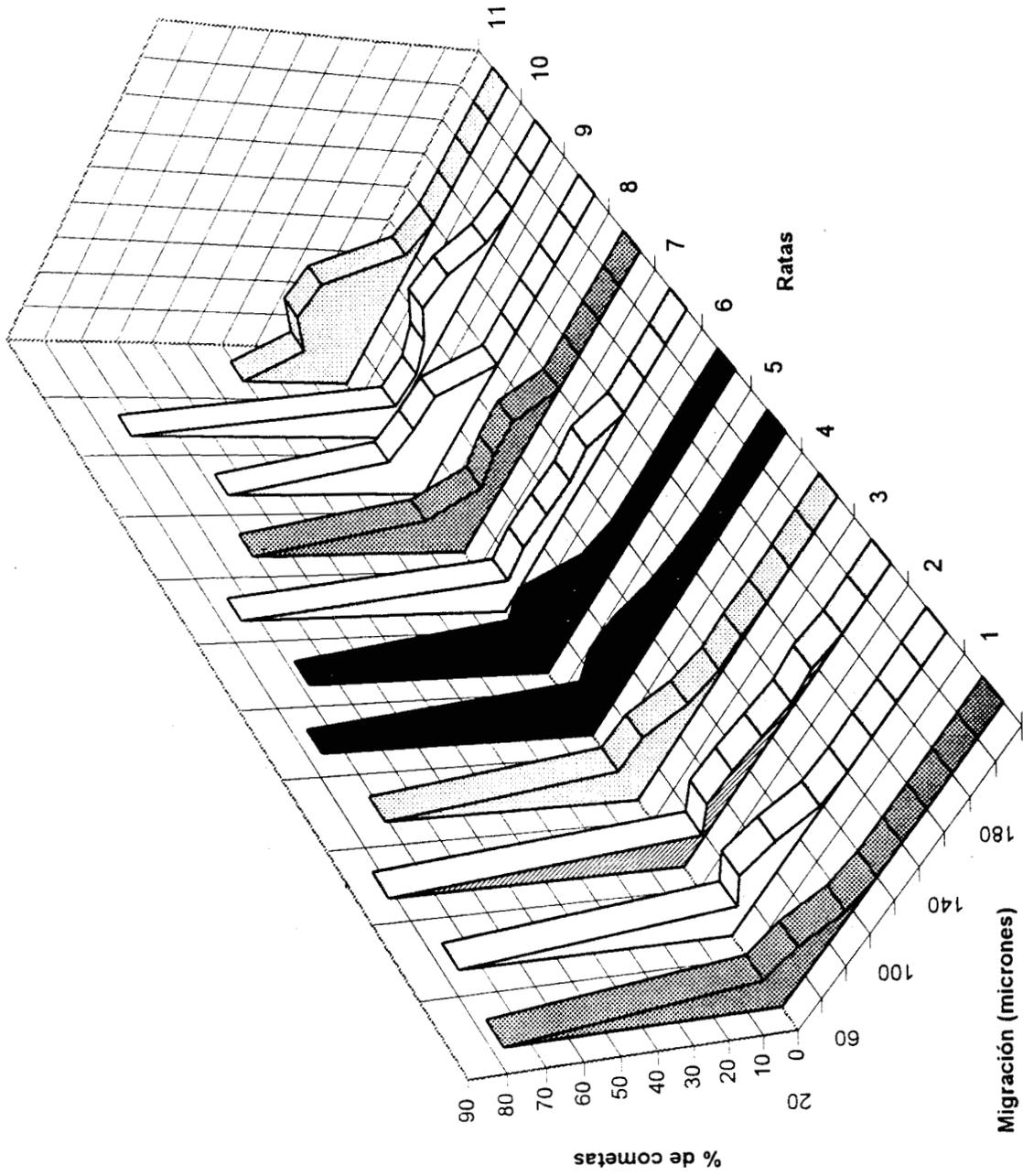


Figura 2a. Dsistribución (%) de la migración en células de médula ósea en ratas bien nutridas

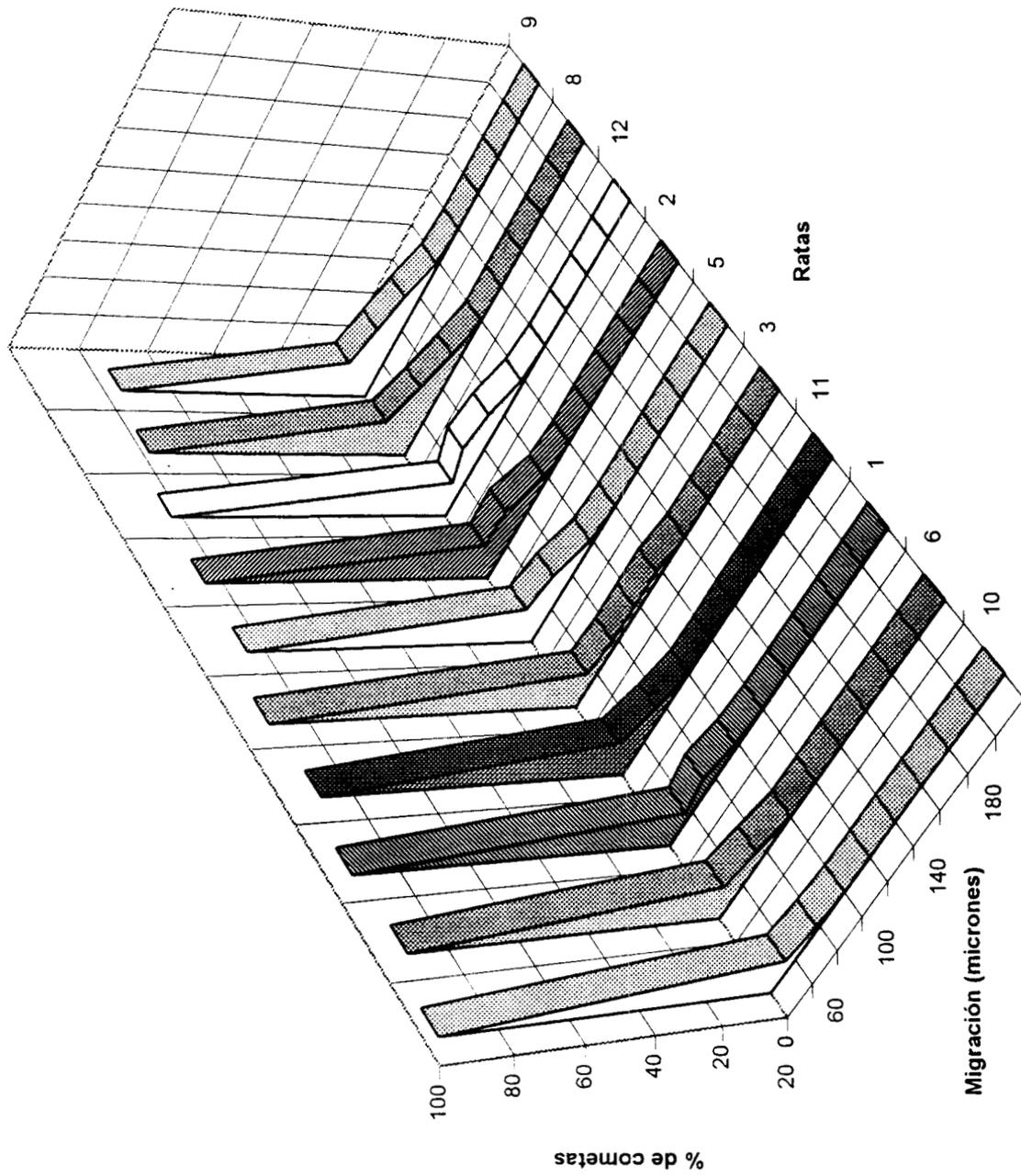


Figura 2b. Distribución (%) de la migración en células de médula ósea en ratas desnutridas

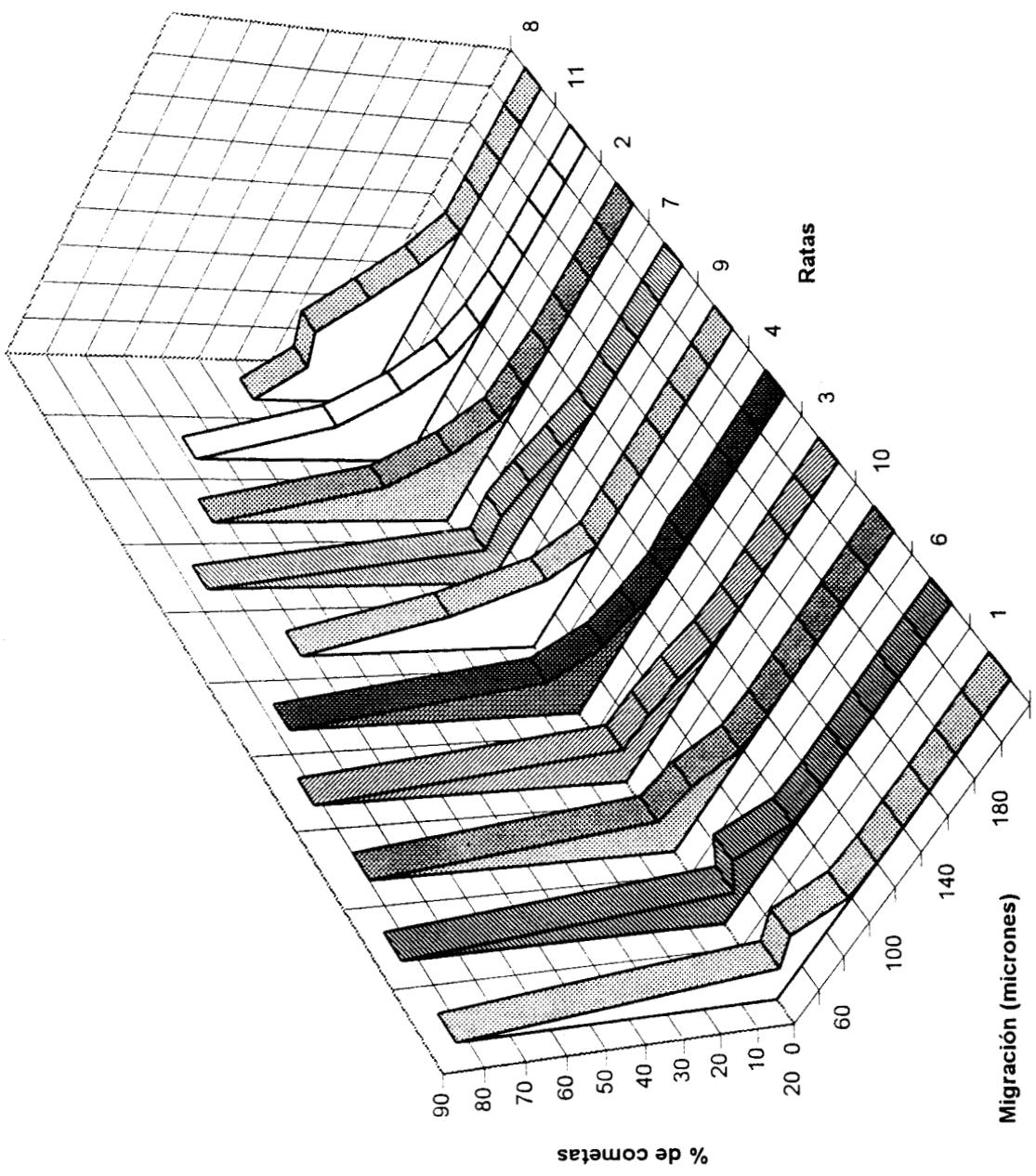


Figura 3a. Distribución (%) de la migración en leucocitos de sangre en ratas bien nutridas

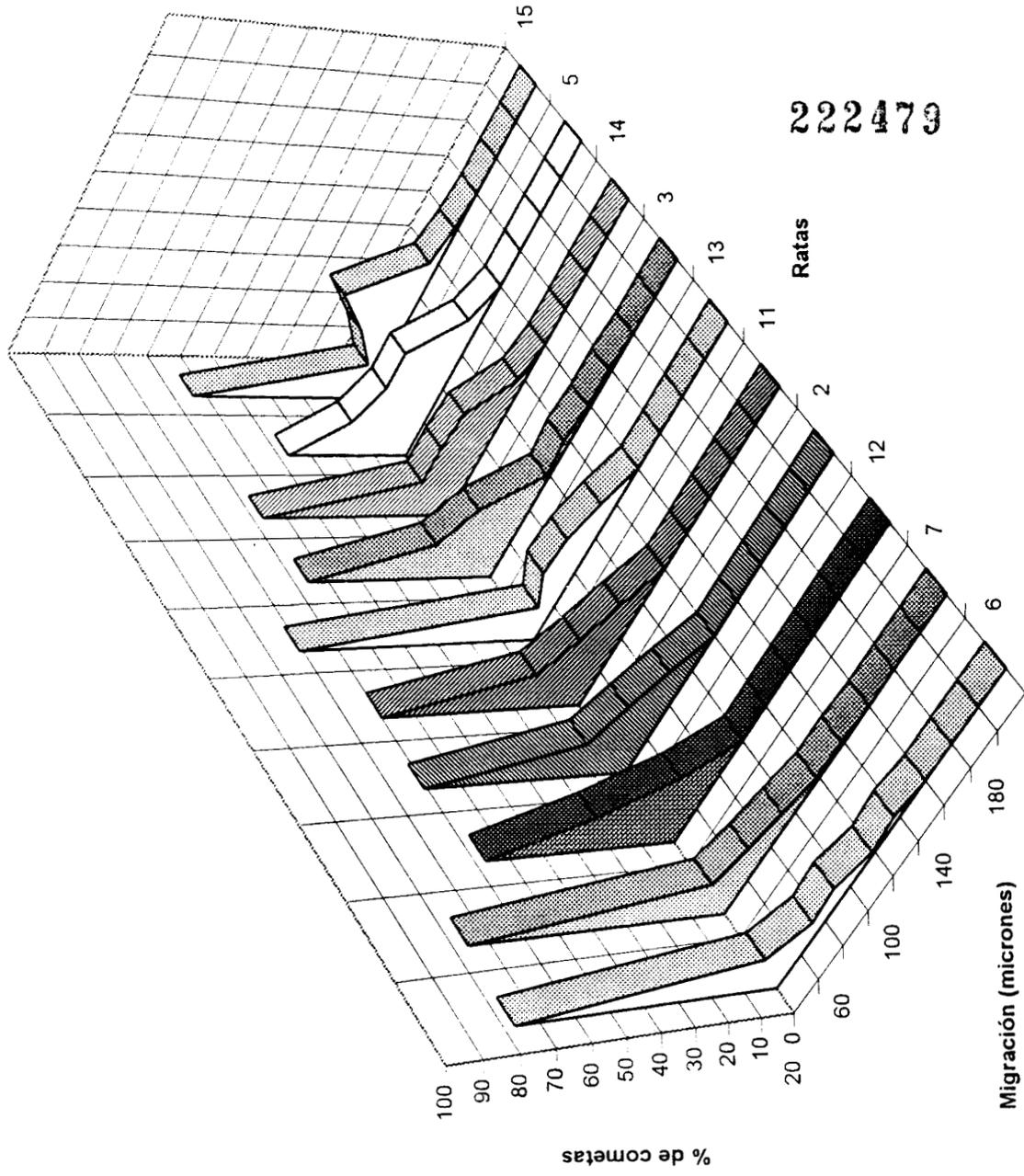


Figura 3b. Distribución (%) de la migración en leucocitos de sangre en ratas desnutridas

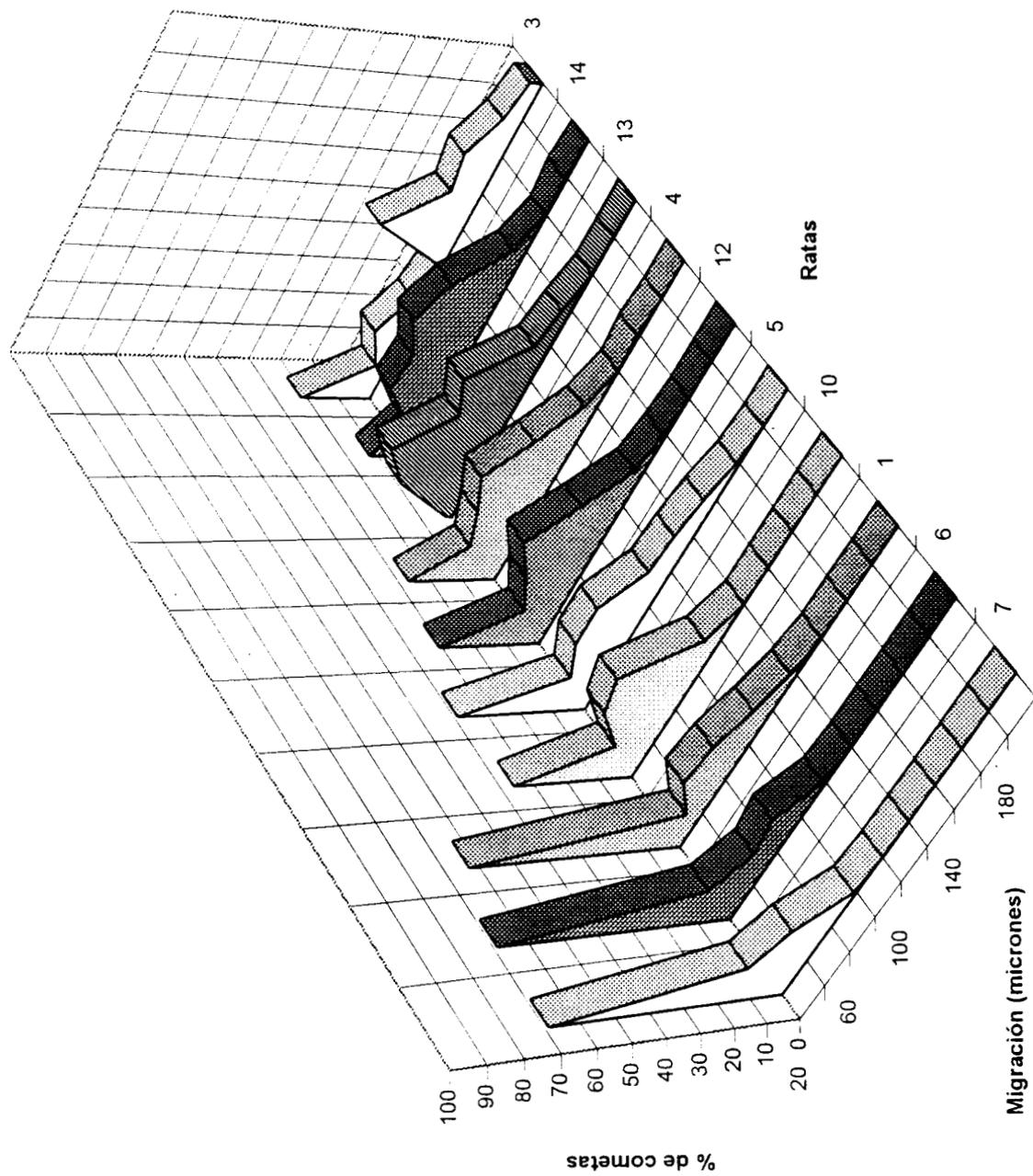


Figura 4a. Distribución (%) en la migración en linfocitos de bazo en ratas bien nutridas

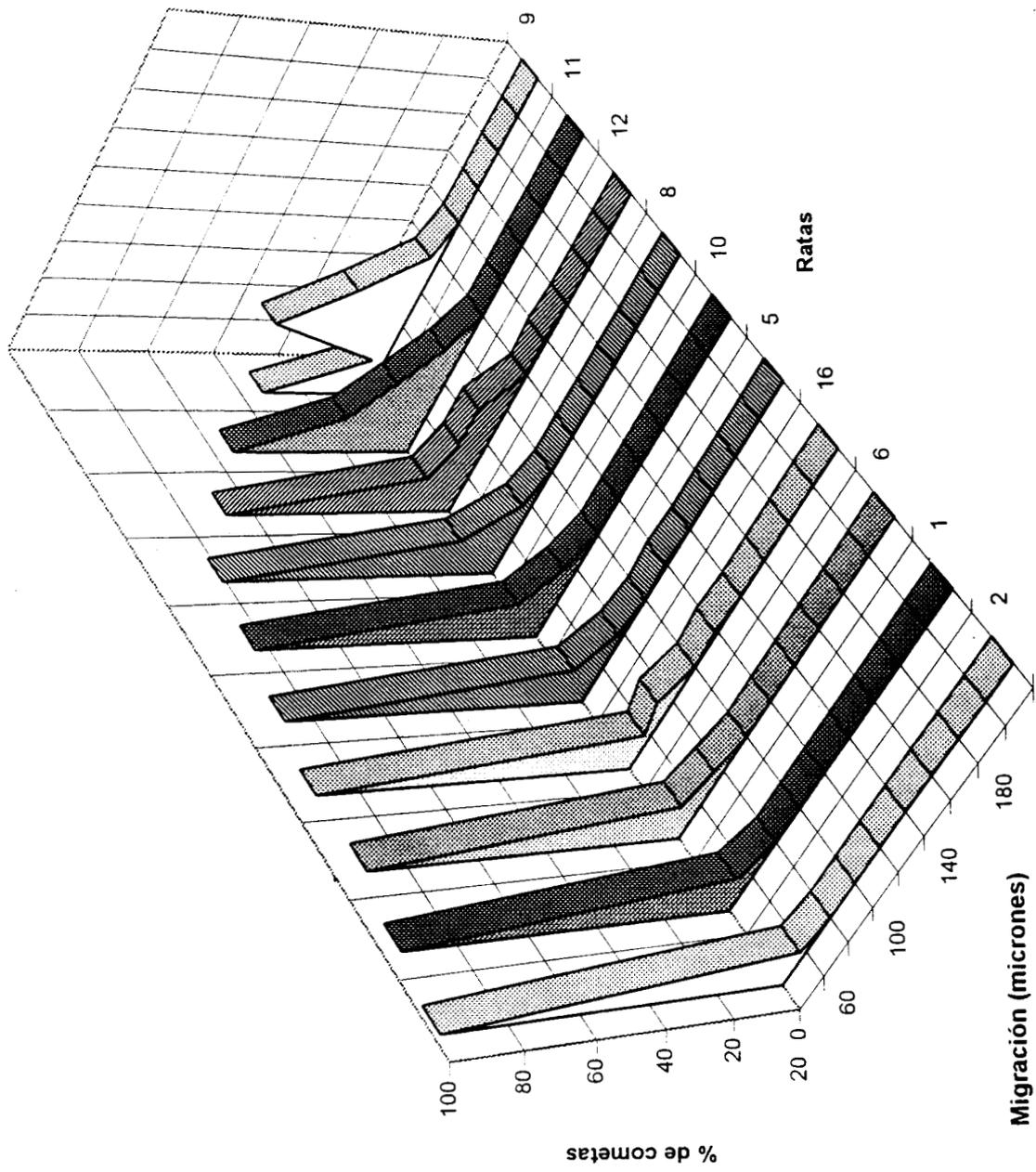


Figura 4b. Dsistribución (%) en la migración en infocitos de bazo de ratas desnutridas

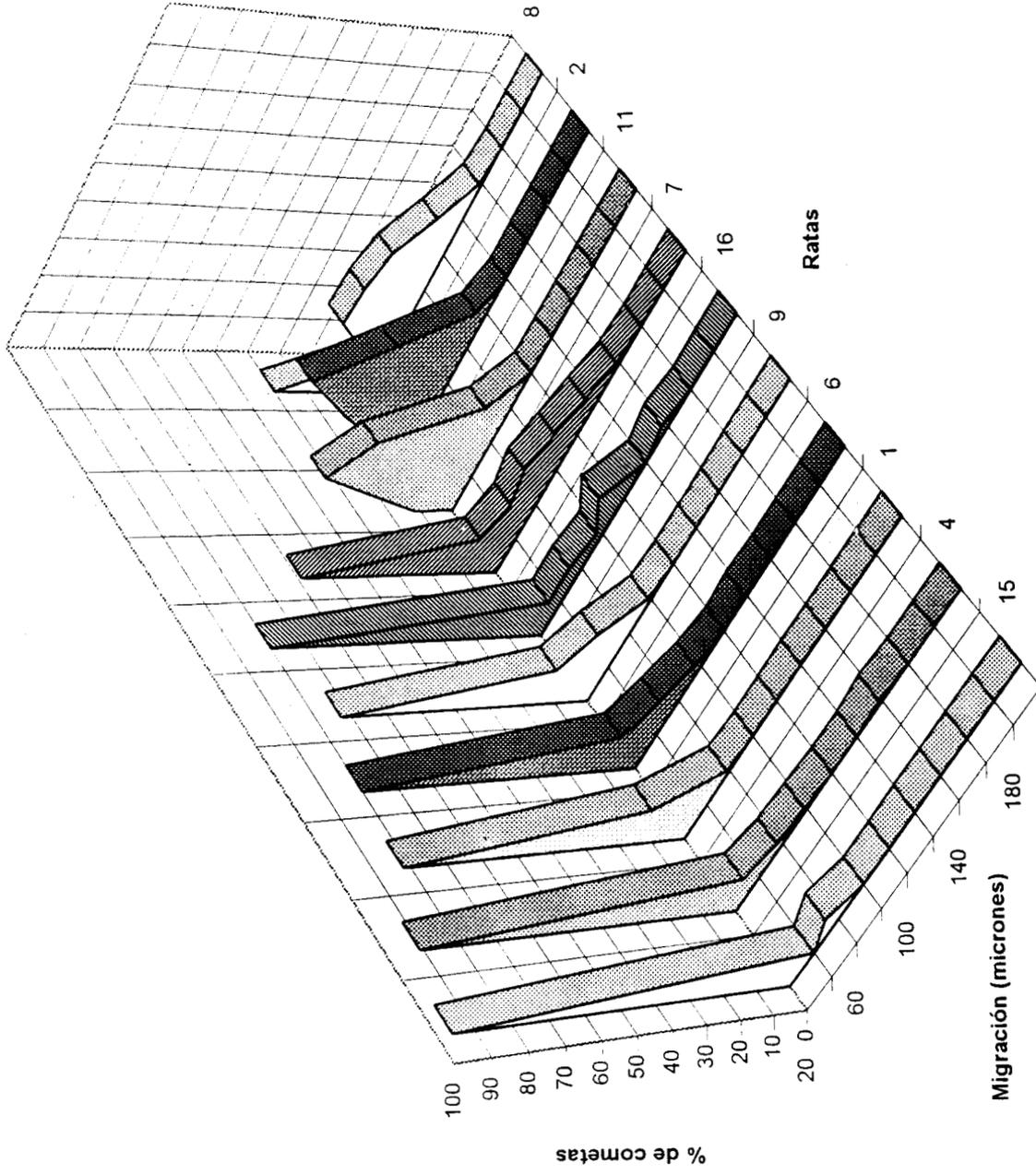


Figura 5a. Distribución (%) de la migración en células de médula ósea separada en ratas bien nutridas

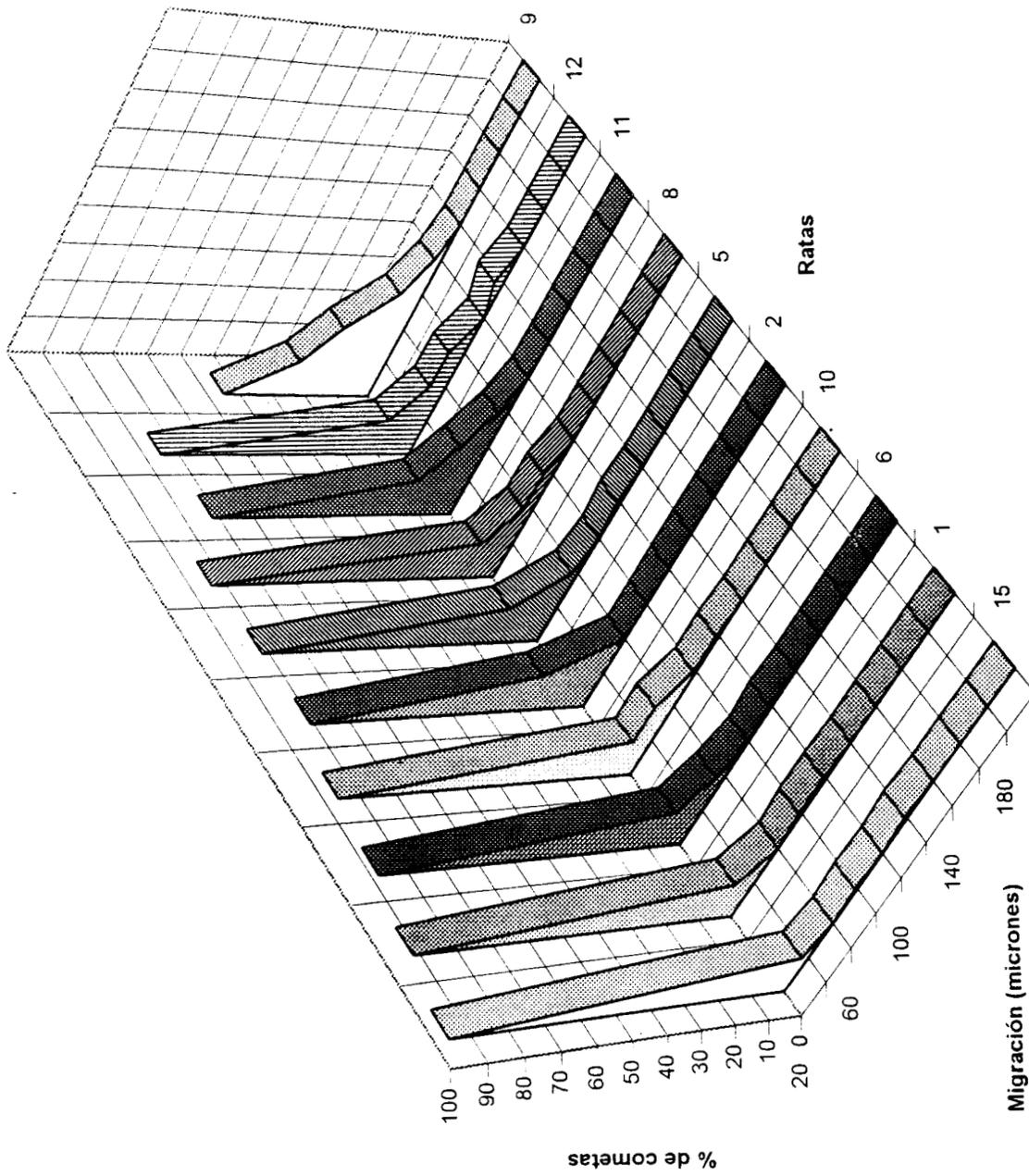


Figura 5b. Distribución (%) de la migración en células de médula ósea separada en ratas desnutridas

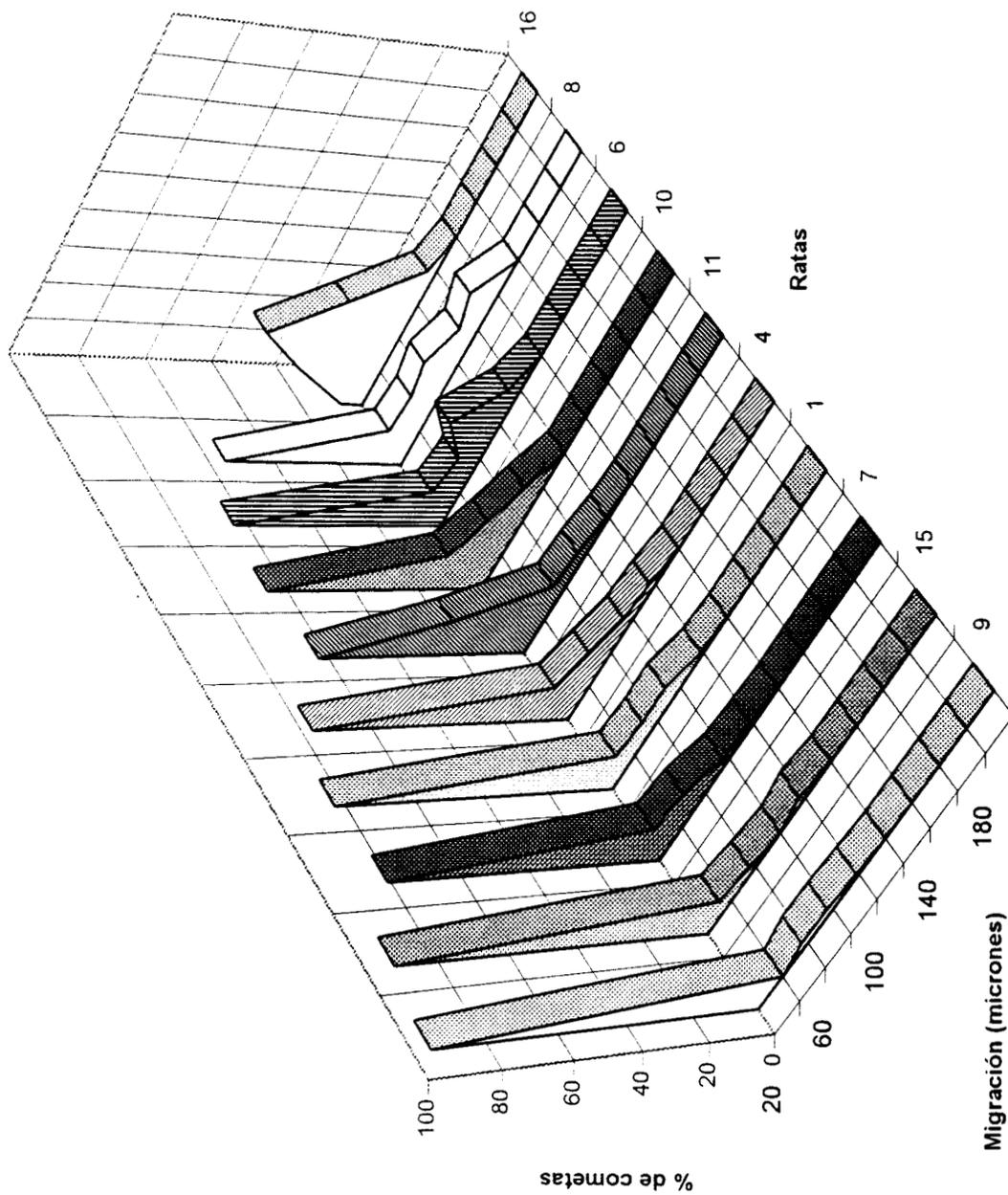


Figura 6a. Distribución (%) de la migración en linfocitos de sangre en ratas bien nutridas

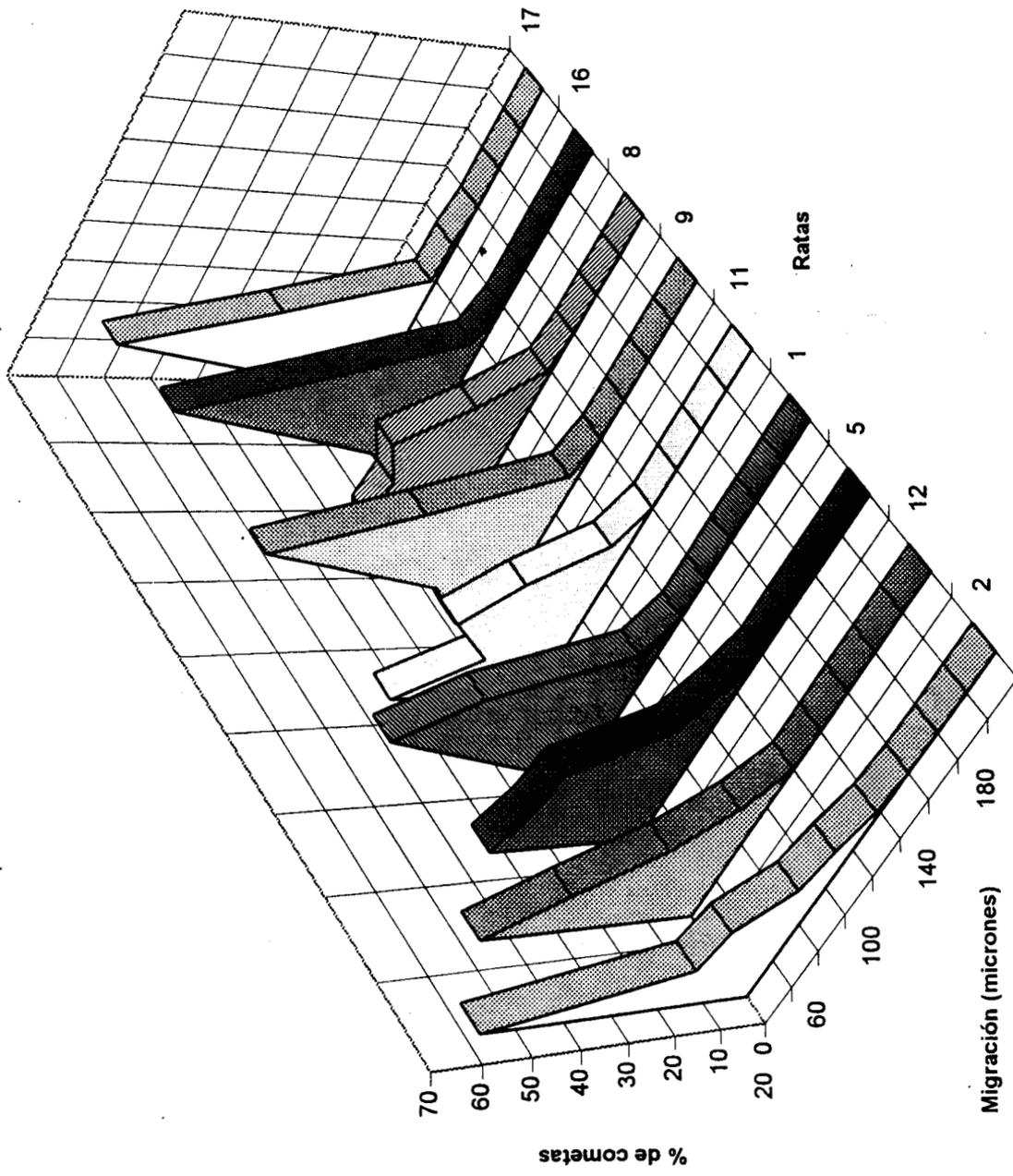
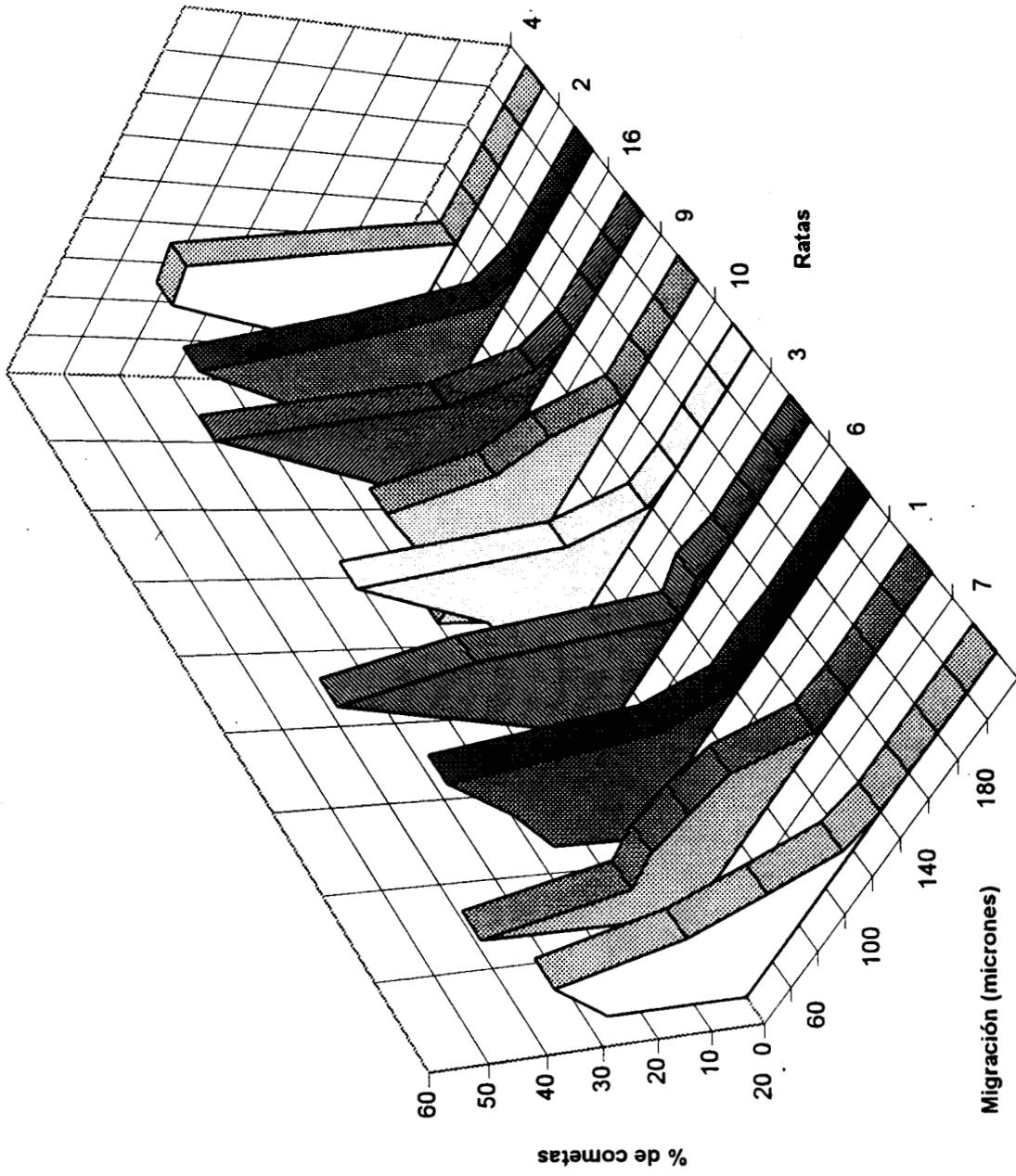


Figura 6b. Distribución (%) de la migración en linfocitos de sangre en ratas desnutridas



Los linfocitos de sangre periférica mostraron una distribución mucho más amplia en la migración del ADN, en comparación a los tipos celulares anteriores. Esto se ve reflejado en los datos graficados de las Figuras 6a y 6b. En ambos grupos se puede observar que ninguna rata alcanza porcentajes mayores al 60 % de nucleoides con migración de 0 a 20 μm . En las ratas desnutridas se puede observar que cinco de nueve muestran un número mayor de nucleoides con estela entre 61 y 80 μm , mientras que las ratas bien nutridas se observa que la tendencia es a tener migraciones menores a 61 μm . El porcentaje de nucleoides con migración mayor a 60 μm fue de 17.3 % en el grupo BN y 44.7 % en el grupo DN.

En las Figuras 7 a la 12, se grafican las proporciones de nucleoides clasificados según el grado de daño y comparando entre el grupo BN y DN. En el caso de las células de bazo (Figura 7), se puede observar que la proporción de células sin daño y daño bajo es menor en las ratas desnutridas que en las bien nutridas, pero en daño moderado y alto esta tendencia cambia, pues es mayor la proporción de nucleoides en el grupo DN que en el BN.

La Figura 8 muestra las proporciones de nucleoides con diferente grado de daño en células de médula ósea. Se puede observar que los nucleoides sin daño es mayor en ratas bien nutridas, mientras que en daño bajo, moderado y alto, esta tendencia se invierte, pues es mayor el número de células en las ratas desnutridas.

Las proporciones de nucleoides clasificados en los diferentes grados de daño, en leucocitos de sangre, se muestran en la Figura 9. Aquí se aprecia que la proporción de nucleoides sin daño y daño bajo es mayor en las ratas bien nutridas; sin embargo en daño moderado y alto se observa que es mayor la proporción en las ratas desnutridas, apreciándose que el grupo DN tiene un número mucho mayor de células con daño alto que en el grupo BN.

La Figura 10 muestra las proporciones de nucleoides clasificados en diferentes grados de daño, tanto del grupo BN como el DN, de linfocitos de bazo. Aquí se puede apreciar que sólo en el caso de células sin daño, el número es mayor en las ratas bien nutridas, pues en los otros grados de daño se invierte esta tendencia.

Figura 7. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daño en células de bazo

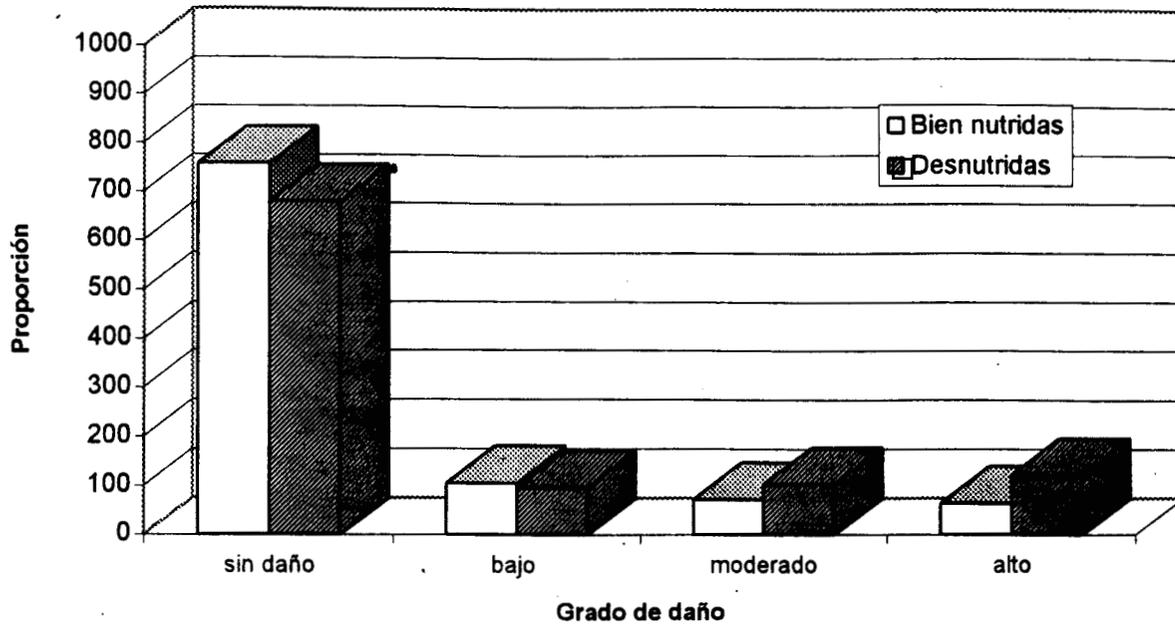


Figura 8. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daño en células de médula ósea

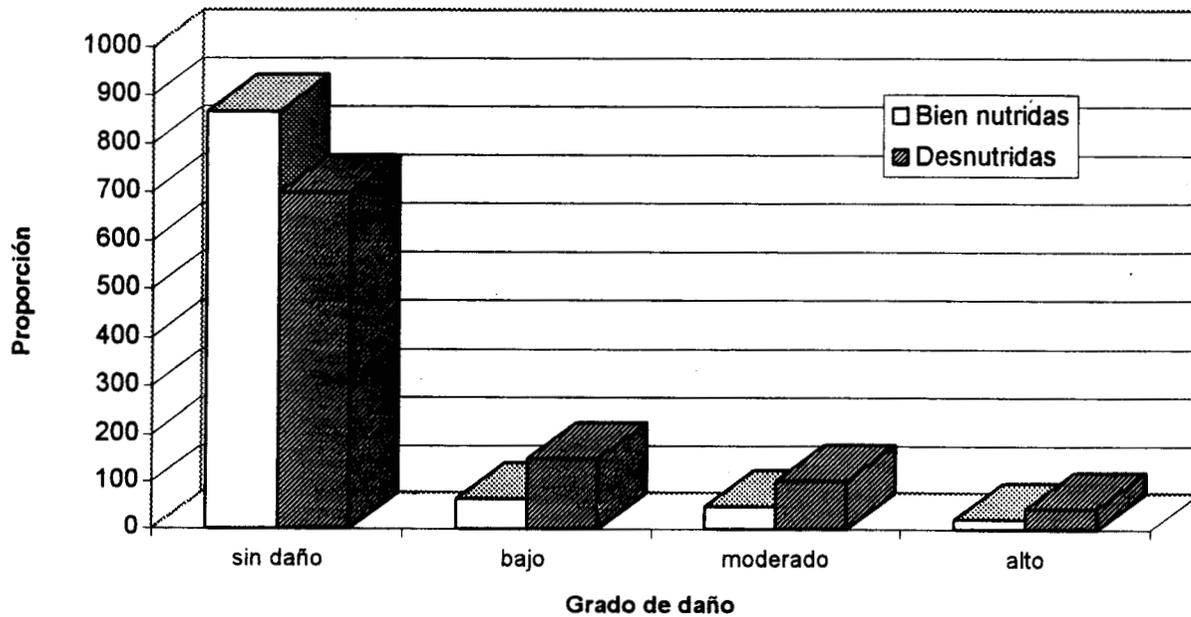
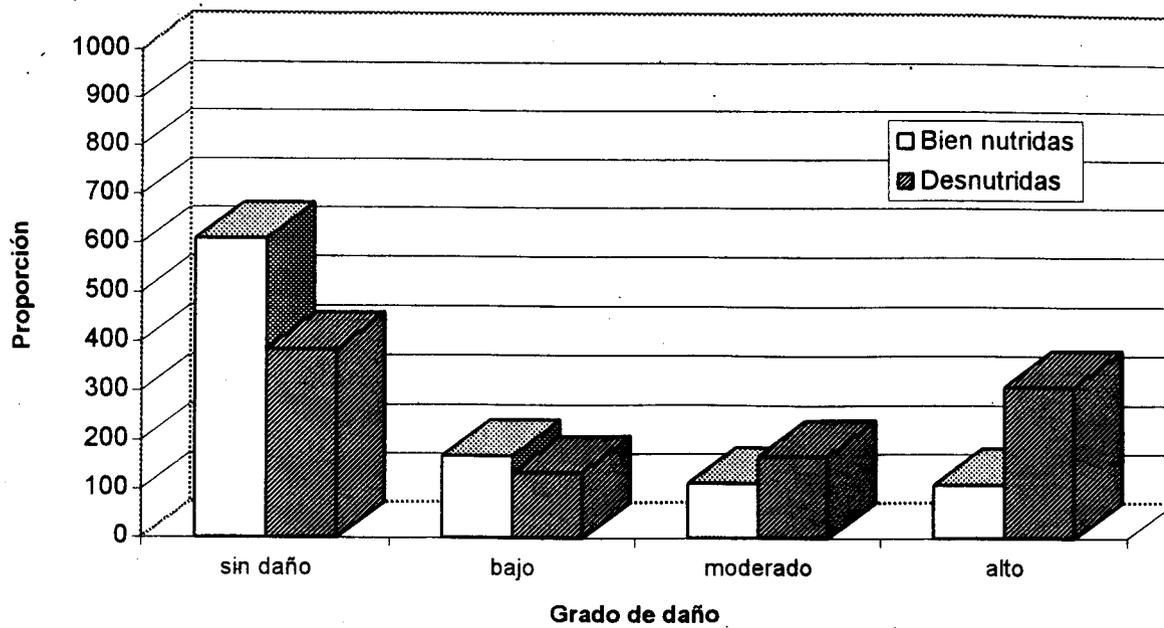


Figura 9. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daño en leucocitos de sangre



222479

Figura 10. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daños en linfocitos de bazo

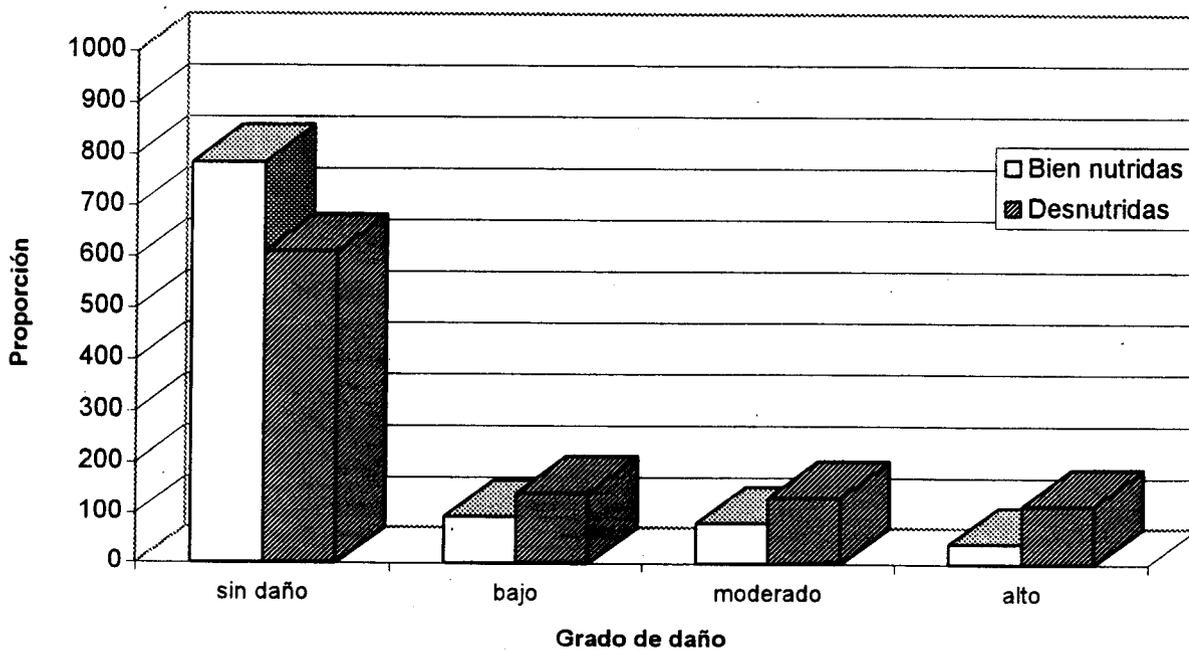


Figura 11. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daño en médula ósea separada

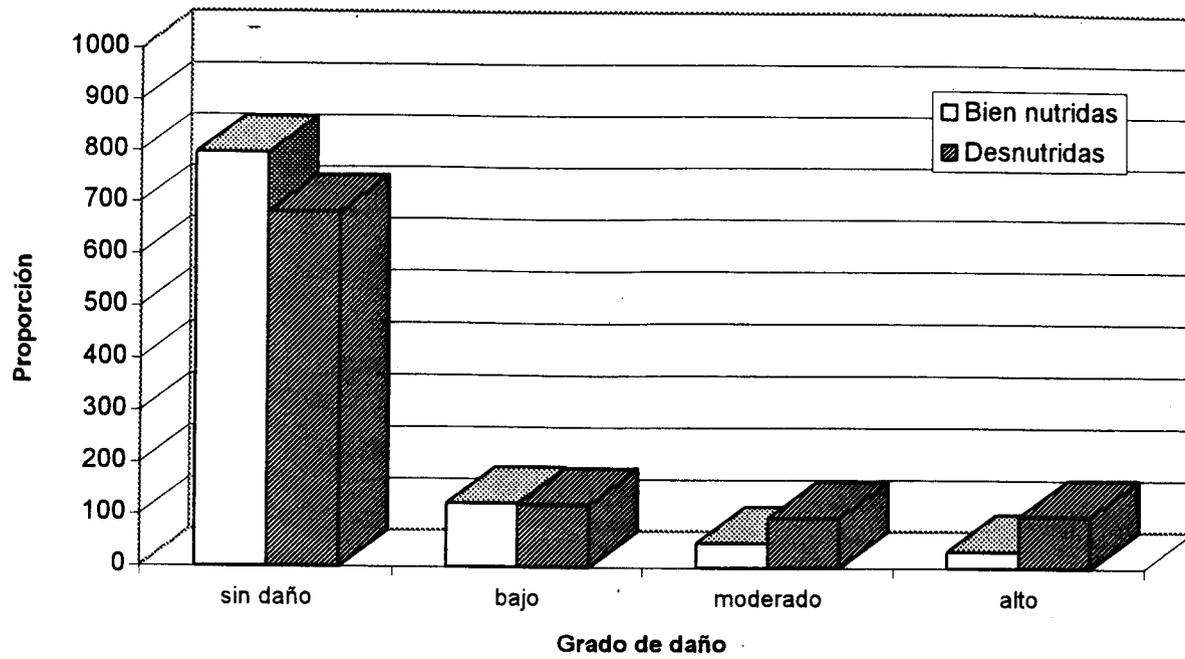
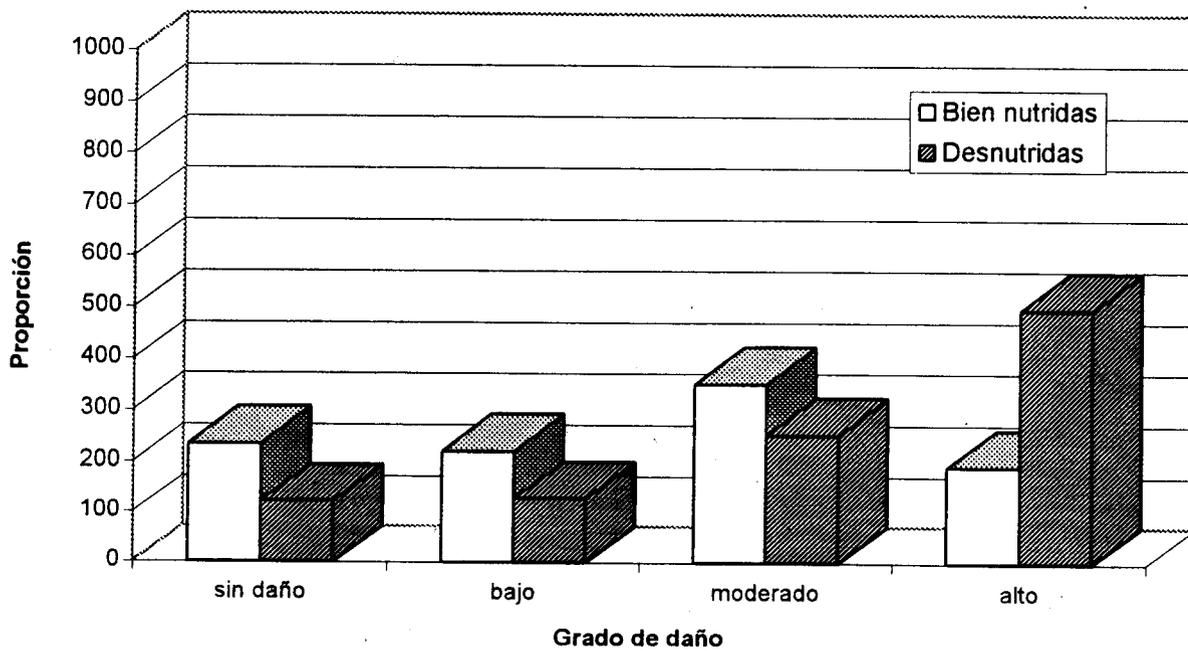


Figura 12. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daño en linfocitos de sangre



En la Figura 11 se observa que en el caso de la médula ósea separada, la proporción de nucleoides sin daño es mayor en las ratas BN, mientras que en daño bajo son muy similares entre ambos grupos. También se observa que las ratas desnutridas muestran un mayor número de nucleoides en grado moderado y alto que las ratas bien nutridas.

La Figura 12 muestra los resultados de la clasificación de los nucleoides, según su migración, en linfocitos de sangre. Esta gráfica muestra que el número de nucleoides sin daño es mucho menor tanto en el grupo de ratas BN como en el grupo DN, en comparación a todos los tipos celulares anteriores. También se observa que en las clases sin daño, daño bajo y daño moderado, las proporciones mayores de nucleoides las muestra el grupo BN, mientras que en daño alto, el grupo DN muestra proporciones mayores en comparación al BN. Además, si se observa con mayor detenimiento, se puede decir que las proporciones en las ratas desnutridas se encuentran desplazadas hacia la derecha, en comparación a las ratas bien nutridas, y esto se ve más claro cuando se observa que las ratas BN tienen una mayor proporción de células en daño moderado, mientras que las ratas DN tienen un mayor número en daño alto.

En los Cuadros 9 y 10 se muestran las proporciones de nucleoides, según el grado de daño, en cada tipo celular. Cuando se realizó la comparación tomando en cuenta la clasificación del grado de daño, se encontró que en todos los tipos celulares existe diferencia significativa entre ratas bien nutridas y ratas desnutridas ($p < 0.05$). Los datos muestran que en el caso de las células de bazo y de médula ósea, las ratas desnutridas tienen una proporción de nucleoides con daño alto aproximadamente del doble que la observada en las ratas bien nutridas. En los leucocitos de sangre se observa que la proporción de nucleoides con daño alto casi se triplica en las ratas desnutridas en comparación a las ratas bien nutridas.

Por otra parte, en las células aisladas se observa que la proporción de nucleoides con daño en los linfocitos de bazo y la serie linfocítica de la médula ósea casi se triplican en las ratas desnutridas, si se compara con las bien nutridas, mientras que en el caso de los linfocitos de sangre la proporción de estos nucleoides es aproximadamente de 2.5 veces al basal del grupo testigo.

CUADRO 9. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daño en bazo, médula ósea y leucocitos de sangre en ratas bien nutridas y desnutridas.

		Bazo		Médula ósea		Leucocitos de sangre	
Grado de daño	Valor en μm	BN	DN	BN	DN	BN	DN
sin daño	0-20	757	679	866	699	608	385
bajo	21-40	105	96	64	149	168	135
moderado	41-60	73	103	48	103	113	169
alto	61->	65	122	22	49	111	311

CUADRO 10. Proporción de nucleoides con diferentes grados de daño en bazo, médula ósea y leucocitos de sangre en ratas bien nutridas y desnutridas.

		Linfocitos de bazo		Médula ósea separada		Linfocitos de sangre	
Grado de daño	Valor en μm	BN	DN	BN	DN	BN	DN
sin daño	0-20	784	610	798	683	235	122
bajo	21-40	94	141	123	121	221	128
moderado	41-60	81	132	47	96	352	253
alto	61->	41	117	32	100	192	497

DISCUSIÓN

En México, la desnutrición afecta principalmente a los niños en edad preescolar, como consecuencia de la pobreza e ignorancia que prevalece en algunos sectores de la población. Esto da pauta a que numerosos grupos de investigación estudien los efectos de este padecimiento, ya sea en un modelo humano (muestras que se obtienen en hospitales bajo vigilancia estricta), o en un modelo animal como el utilizado en este trabajo. La inducción de la desnutrición durante la lactancia ofrece un buen modelo para evaluar los efectos de la DCP por sí misma, ya que se controlan variables, como la presencia de algún proceso infeccioso, o la administración de antibióticos, que generalmente se presentan en asociación con la desnutrición.

Este trabajo se realizó con el propósito de demostrar que la DCP es capaz por sí misma de afectar la integridad al ADN, en forma de rompimientos de una hebra de la doble hélice, usando como modelo experimental a ratas desnutridas durante la lactancia.

Al observar el grupo de ratas bien nutridas y el de ratas desnutridas se aprecia que existe variabilidad dentro de cada grupo. La variabilidad presentada hace que algunos promedios de migración individuales se traslapen, es decir, tanto en el grupo de ratas BN y en el grupo de DN se presentan algunos valores muy semejantes (Cuadros del 2 al 7). Sin embargo, se puede decir que en general las ratas desnutridas tienen mayor migración que las bien nutridas, lo cual se comprueba con el análisis estadístico. Por lo tanto se puede afirmar que la DCP induce un aumento en los rompimientos de las moléculas de ADN.

Cabe mencionar que la metodología utilizada en este estudio es muy sensible, permitiendo detectar 0.1 rompimientos de ADN por 10^9 dalton. Otra característica muy importante es su capacidad para detectar diferencias intercelulares en el daño al ADN y su reparación en virtualmente cualquier población de células eucariontes (McKelvey y col., 1993; Tice, 1995)).

Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos en trabajos realizados anteriormente. En 1972, Betancourt y colaboradores encontraron que los niños desnutridos tuvieron aberraciones cromosómicas en mayor número que en adultos sanos, encontrando un mayor porcentaje de fragmentos; estos resultados estaban en contradicción con los resultados de Thorburn y colaboradores (1972), pues ellos no observaron una relación entre la desnutrición y las aberraciones cromosómicas y sugirieron que la discrepancia entre sus resultados y los obtenidos por otros autores se debía a la intervención de otros factores, como son la presencia de

alguna infección o la ingestión de remedios caseros, capaces de aumentar la proporción de aberraciones. En cuanto a un modelo experimental, Vijayalaxmi en 1975, encontró un incremento en la proporción de aberraciones cromosómicas en células de ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas, mostrando que una dieta baja en proteínas tiene una influencia adversa sobre la integridad estructural de los cromosomas de la médula ósea de las ratas.

Castro, en su artículo publicado en 1987, resalta la importancia de conocer la interacción del estado nutricional sobre la estructura del cromosoma. Esta autora hace mención de trabajos en donde se observó el efecto de nutrientes específicos relacionados en la condensación cromosómica (Ej., zinc y magnesio), sobre la estructura de los cromosomas, los cuales revelaron que las deficiencias de estos nutrientes están correlacionados con rompimientos cromosómicos, deleciones o sitios frágiles. También menciona que otros trabajos demostraron cambios en las configuración de orden superior de la cromatina en interfases causado por alteraciones en el balance de carbohidratos, grasa o componentes proteicos en la dieta. Estos últimos hallazgos los relaciona con posibles alteraciones en la expresión de los genes afectados por las modificaciones de configuración.

Ortiz y col. (1995) observaron que la desnutrición severa aumenta la frecuencia de micronúcleos en linfocitos en ratas desnutridas de 21 días de edad. Estos resultados apoyan que la DCP tiene un efecto sobre la integridad del ADN, ya que los micronúcleos se forman por fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no se han integrado al núcleo principal. Además, Betancourt y colaboradores en 1995, hicieron un estudio, utilizando la metodología de la electroforesis unicelular alcalina, en niños bien nutridos y desnutridos, en donde encontraron un incremento en la migración en el ADN en leucocitos de sangre periférica, y que este incremento está asociado a la DCP. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en sus resultados influyen otros factores que acompañan a la desnutrición como son las infecciones y el tratamiento con medicamentos de las mismas.

Betancourt y colaboradores, en su trabajo de 1995, propusieron que el incremento en el daño asociado con la desnutrición puede estar relacionado a la deficiencia de varios nutrientes necesarios para la síntesis de proteínas asociadas con la integridad del ADN y/o a una capacidad disminuida para reparar los niveles normales de daño al ADN, permitiendo que el organismo desnutrido sea más susceptible al daño ambiental.

Diversos estudios han encontrado que el metabolismo de proteínas se ve alterado durante la desnutrición. En 1994, se realizó un trabajo en ratas desnutridas, en cual se estudió la síntesis

de proteínas durante la regeneración del hígado; este estudio muestra que la síntesis de proteínas durante la desnutrición no aumenta tanto como en los animales bien nutridos. En este caso los autores proponen que baja la síntesis de proteínas y otras moléculas de exportación, lo cual permitiría que en las ratas desnutridas se lleve a cabo la regeneración del hígado (Skullman y col., 1994).

Otro trabajo, se realizó para encontrar las posibles alteraciones de la desnutrición sobre el transporte de aminoácidos, más específico, el transporte de la alanina en hígado (Gómez-Angelats y col, 1995). Los resultados mostraron que la desnutrición durante la lactancia afectó visiblemente el transporte de alanina mediado por sodio, por lo cual concluyen que la desnutrición calórico proteica puede substancialmente afectar el metabolismo de aminoácidos, debido a la alteración del transporte dependiente de sodio. En otros trabajos han encontrado niveles bajos de albúmina en niños con DCP, lo cual afectaría también el transporte de varias moléculas a través del torrente sanguíneo (Dramaix y col., 1993).

Los trabajos anteriormente mencionados apoyarían que durante la desnutrición no hay suficientes nutrientes para mantener todas las funciones de un órgano, como el hígado, además de que se afecta la disponibilidad de los mismos nutrientes. Si no hay los elementos suficientes para mantener todas las funciones de una célula, ¿cómo repercutiría en la integridad del ADN?. Una posibilidad podría ser que no lleve a cabo una duplicación adecuada del ADN durante la fase de síntesis. Lo anterior tendría apoyo en el trabajo de Bansal-Rajbanshi y Mathur (1985), en donde se encuentra que la fase S en células de ratas desnutridas es evidentemente más larga. Otra posibilidad es que durante la vida de la célula no sea posible reparar todos los daños que pudiera darse en el ADN, ya que los mecanismos de reparación pueden ser deficientes por falta de nutrientes.

También es posible que el daño sea causado por la ausencia de moléculas que impidan el daño oxidativo . El daño oxidativo puede ser originado por radicales libres o especies reactivas de oxígeno, los cuales son producidos por: 1) metabolismo oxidativo, 2) la actividad de la citocromo P₄₅₀ microsomal, la cual es inducible por compuestos extraños, y/o 3) por un incremento en la respiración de fagocitos estimulados. La mayoría de la superóxido formada por estas actividades es eliminado por la acción del superóxido dismutasa, la cual produce peróxido de hidrógeno, pero este a su vez es metabolizado a productos finales no dañinos por la glutatión peroxidasa (Thurman, 1990). Algunos autores proponen que la DCP disminuya la actividad de la glutatión peroxidasa por los bajos niveles de selenio, un elemento necesario para el funcionamiento de esta enzima (Thurman, 1990; Albrecht y Pélisser , 1995). Además se reducen

las concentraciones de vitamina E, la cual se sabe que es un buen agente antioxidante (Albrecht y Pélisser, 1995).

Otros estudios que apoyan un posible aumento de radicales libres durante el padecimiento, han encontrado que la concentración de glutatión en la sangre disminuye tanto en niños con desnutrición tipo marasmo como en niños con desnutrición tipo kwashiorkor, encontrándose en éstos últimos una disminución más marcada. (Becker y col., 1995 Albrecht y Pélisser A., 1995). Becker encontró además que no se observan mecanismos compensatorios tales como un incremento en las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Hay que recordar que el glutatión, además de mantener los sulfidrilos de las proteínas, es un tripéptido importante en la protección de las células contra agentes oxidantes.

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno (radicales libres) causan alteraciones en el ADN, por ejemplo mutaciones en un par de bases, rearreglos, deleciones, inserciones y amplificación de secuencia. El grupo hidroxilo es especialmente dañino ya que genera una variedad de productos a partir de las cuatro bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. Por otro lado, el radical superóxido ataca selectivamente a la guanina. El óxido nítrico o sus productos reactivos derivados de él, son agentes mutágenos que tienen el potencial de producir reacciones de nitración, nitrosación y desaminación en las bases del ADN. Aunque no queda muy claro como las especies reactivas llegarían a las cercanías del material genético nuclear y así ser capaces de atacarlo (Wiseman y Halliwell, 1996), es evidente que al bajar los niveles de las moléculas capaces de evitar el daño oxidativo en la célula es más probable que se produzca daño en el ADN. Sin embargo cabría preguntarse ¿sería posible disminuir el daño al ADN si se pone a disposición de las células factores antioxidantes? ¿la célula sería capaz de reparar el daño?.

La electroforesis unicelular alcalina permite una evaluación adecuada de los niveles de daño al ADN en varios subtipos de leucocitos en un individuo y en muestras celulares de otros tejidos (Tice, 1995), debido a su sensibilidad y flexibilidad. En diversos estudios se ha encontrado que los diferentes tipos celulares en mamíferos difieren marcadamente en su respuesta a una variedad de factores como: radiación ionizante, agentes alquilantes, etcétera (Kreja y col., 1996; Vaghef y col., 1996). Para la realización de este trabajo se consideró importante observar si todos los tipos celulares presentaban daño o si alguno de ellos no lo presentaba. Como se comprobó en los resultados, todos fueron afectados por la desnutrición, ya

que en todos los casos, las células de las ratas desnutridas presentaron un daño mayor en comparación a las ratas bien nutridas.

En cuanto a la diferencia encontrada entre los diferentes tejidos, se puede mencionar que algunos autores reportan que células de diferente tipo muestran diferencias al daño al ADN basal o en la respuesta a diferentes factores. Fairbairn y colaboradores (1994) observaron que algunos tipos celulares presentan una mayor cantidad de sitios sensibles al álcali (células de riñón y espermáticas) que otros (células de bazo y timocitos). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede explicar que en las ratas bien nutridas se encuentren diferencias en las migración de nucleoides de médula ósea, bazo y sangre. Es posible pensar que exista un mayor número de sitios sensibles al ambiente alcalino en sangre que en bazo y médula ósea, y estos se expresen como rompimientos de una sola hebra después de realizar la electroforesis, o bien que tengan una mayor susceptibilidad y por lo tanto un mayor número de rompimientos.

Es conocido que las células hematopoyéticas de la médula ósea son mucho más sensibles a la radiación ionizante que las pertenecientes a otros tejidos, sin embargo se ha encontrado que las células del estroma de la médula ósea son claramente más resistentes (Kreja y col., 1996). Lo anterior apoya los resultados obtenidos, pues se encontró que la serie linfoide tiene mayor daño, tanto basal como durante la desnutrición, que las células de la médula ósea completa. Sin embargo no necesariamente estas células deben ser más sensibles que las pertenecientes a otros tejidos, ya que en un trabajo realizado en células de ratón se demostró que el benzo(a)pireno induce rompimientos de una sola hebra en células de hígado pero no así en linfocitos y células de médula ósea (Vaghef y col., 1996).

Algunos estudios sugieren que los linfocitos de bazo tienden a mostrar una mayor sensibilidad que los linfocitos de sangre periférica a los efectos dañinos de agentes químicos y radiación ionizante sobre los cromosomas. Tucker y col., en 1986 observaron que hay una mayor sensibilidad a la inducción de intercambios de cromátidas hermanas en bazo en oposición a linfocitos de sangre periférica cuando se les expone a etilnitrosurea, por lo cual sugiere que los linfocitos de bazo pueden ser deficientes en la reparación comparados con su contraparte en la sangre periférica. Por otro lado, otro estudio mostró que los linfocitos de bazo tienen una mayor frecuencia de micronúcleos que los linfocitos de sangre periférica cuando los ratones son sometidos a radiación X. La explicación propuesta para este comportamiento la atribuyen a factores tales como a) diferencias en el nivel de antioxidantes en el bazo y sangre periférica y b) la radiosensibilidad aumentada de los linfocitos de bazo debido a que varios están en la fase S durante la radiación (Fenech, 1991).

En las células de sangre, podemos decir que existen dos poblaciones celulares que responden de manera diferente al daño. Lo anterior se puede observar en la Figura 3a, en donde hay una ligera tendencia en las ratas 13, 14 y mayor en la 15, en mostrar dos picos en la distribución de la migración del ADN. La tendencia se muestra con mayor claridad en las ratas desnutridas, en donde se puede observar que siete de las 10 ratas tienen dos picos en la distribución (Figura 3b). Esto indica que existen dos poblaciones que responden de diferente manera a la DCP, una mostrando mayor migración que la otra. Las Figuras de linfocitos de sangre muestran que el comportamiento ya mencionado desaparece casi en todas las ratas, tanto bien nutridas como desnutridas, lo cual muestra que existe una marcada diferencia en la respuesta de los linfocitos del resto de los leucocitos, además se puede decir que los linfocitos de sangre tienen mayor susceptibilidad, ya que tienen mayor migración que las células de sangre completa (Cuadros 4 y 7). Esta observación es similar a la obtenida en el estudio de Holz y colaboradores (1995), quienes encontraron menor cantidad basal de rompimientos de una sola hebra basales en monocitos que en linfocitos humanos. También en otro estudio se observó que los granulocitos muestran diferente susceptibilidad en comparación a los linfocitos humanos, cuando reciben radiaciones ultravioleta y gama, además determinaron que tienen diferente respuesta a la reparación (Lankinen y col., 1996). Por otro lado, la sensibilidad puede ser diferente entre una u otra población de linfocitos, ya que en un trabajo efectuado en 1989, se encontró que los linfocitos B muestran una mayor frecuencia de micronúcleos que los linfocitos T, en cultivos con peplomicina (Slavutsky y Knuutila, 1989).

La electroforesis unicelular alcalina permite medir el daño al ADN en células individuales, haciendo posible estimar el coeficiente H de dispersión para probar si la variabilidad intercelular fue o no similar entre ratas bien nutrida y desnutridas. Los resultados indican que la variabilidad intercelular se mantiene entre ambos grupos. La menor dispersión encontrada en los leucocitos y linfocitos de sangre indica que el daño mostrado se manifestó en mayor número de células. También se puede determinar la heterogeneidad en la respuesta de diferentes tipos celulares presentes en una misma muestra. Se ha recalado que las subpoblaciones celulares que varían en el daño al ADN inducido por diversos factores, aumentan la heterogeneidad en los datos, por lo cual el coeficiente H es mayor que cuando se separan estas subpoblaciones (Olive y col., 1992). Este comportamiento se observa claramente en las células provenientes de sangre, ya que el coeficiente H es mayor en las células de sangre completa a los linfocitos aislados, tanto en ratas bien nutridas como en las ratas desnutridas.

También se efectuó el análisis de los resultados por medio del grado de daño, identificándose cuatro: sin daño, con daño bajo, moderado y alto. Esta forma de agrupar a los nucleoides da información acerca de la extensión del daño entre ellos y facilita la observación y análisis de la distribución del daño (Schöber y col., 1994; Tice, 1995.) Los resultados mostraron que la proporción de células con mayor daño es más alto en las ratas desnutridas, en todos los tipos celulares. Esto concuerda con lo observado tomando en cuenta solo los promedios de migración. Además los datos indican que los linfocitos de bazo y la serie linfóide de médula ósea son más susceptibles a presentar daño que el total de las células componentes de ambos tejidos.

222479

En la Figura 9 se aprecia claramente que los leucocitos de sangre tienen menor cantidad de nucleoides sin daño, tanto en ratas bien nutridas como en desnutridas, en comparación a las células de bazo y médula, y además tienen un número mayor de nucleoides con daño alto en ratas DN. Cuando se analiza a los linfocitos de sangre se observa que el número de nucleoides sin daño disminuye considerablemente, lo cual indica que células que no muestran daño están en los otros tipos de leucocitos.

Como consideraciones finales, se puede decir que la desnutrición favorece la aparición del daño al ADN en todas las células estudiadas. Una forma en la que se puede afectar directamente es por la falta de nutrientes importantes en la condensación de los cromosomas, afectando la integridad del ADN. La falta de nutrientes también podría afectar de manera indirecta al material genético, ya que la falta de moléculas importantes para la duplicación podría reflejarse en una síntesis defectuosa de ADN. La deficiencia en la síntesis de proteínas podría alterar de una manera indirecta los mecanismos de reparación del material genético, lo cual favorecería el incremento en el daño. También puede considerarse que la falta de nutrientes provocaría una deficiencia en los mecanismos protectores contra el daño oxidativo. Es importante mencionar que es necesario llevar a cabo estudios en donde sea posible observar como se produce el daño genético en los organismos desnutridos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la desnutrición calórico proteica inducida durante el periodo de la lactancia favorece el daño en el material genético.

Los datos de este trabajo muestran un incremento en el daño al ADN en las células provenientes de organismos desnutridos. Este daño se presentó en todos los tipos celulares analizados.

También se observó que los linfocitos de bazo, de sangre y la serie linfoide de la médula ósea muestran una mayor migración, lo cual se puede considerar que son más susceptibles a presentar daño al ADN durante la desnutrición.

La sensibilidad de la electroforesis unicelular alcalina permitió determinar el daño presenta en células individuales y además, apreciar que existe variabilidad individual en las ratas de ambos grupos.

El análisis del coeficiente H de dispersión mostró que al separar poblaciones celulares, la heterogeneidad intercelular en general disminuye, lo cual refleja que existen subpoblaciones que tienen una respuesta heterogénea.

BIBLIOGRAFIA

Albrecht R. y Pélissier M.A. 1995. About the oxidative stress status in children with kwashiorkor. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 1081-1083.

Alu Y. y Murthy P.B. 1993. Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats in utero upon rehabilitation. *Experientia*, 49: 258-261.

Arrieta R. y Cravioto J. 1982. Clínica de la desnutrición protéico-calórica de la infancia. Manuscrito proporcionado por los autores.

Bansal-Rajbanshi M. y Mathur M. 1985. Testicular and cell proliferation kinetics of immature germ cells and Sertoli cells in suckling undernourished rats. *Cell Tissue Kinetics*, 18: 183-191.

Baur L.A., Waters D.L., Allen B.J., Blagojevic N. y Gasnick K. 1991. Nitrogen deposition in malnourished children with cystic fibrosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 503-511.

Becker K., Leichsenring M., Gana L., Bremer H.J. y Schirmer R.H. 1995. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: results of study in Nigeria. *Free Radical Biology & Medicine*, 18: 257-263.

Benedetti R., Goldman H., Fló J., Massouh E. y Roux M.E. 1992. Alterations of B cell precursors in bone marrow of malnourished rats. *Comunicaciones Biológicas*, 10: 275-281.

Benning V., Depasse F., Melcion y Cordier A. 1992. Detection of micronuclei after exposure to mitomycin C, cyclophosphamide and diethylnitrosamine by the in vivo micronucleus test in mouse splenocytes. *Mutation Research*, 280: 137-142.

Betancourt M., Balvanera P. y Ortiz R. 1986. Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone marrow cells of severely malnourished animals during early life. *Mutat. Res.*, 175, 29-31.

Betancourt M. y Ortiz R. 1991. Efectos de la Desnutrición a Nivel Citogenético. *Ciencia*, 42, 367-373.

Betancourt M., Ortiz R. y González C. 1992. Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutation Research*, 283, 173-177.

Betancourt M., Ortiz R., González C., Pérez P., Cortés L., Rodríguez L. y Villaseñor L. 1995. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutation Research*, 331: 65-77.

Betti C., Davini T., Giannessi L., Loprieno N. y Barale R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res.*, 307, 323-333.

Brown y Brasel. 1990. Endocrine changes in the malnourished child. En: *The malnourished child* (Robert M. Suskind y Leslie Lewinter-Suskind, eds.). Nestlé Nutrition Series, vol. 19. New York.

Brown J.L. y Pollit E. 1996. Malnutrition, poverty and intellectual development. *Scientific American*, 247: 26-31.

Castro C.E. 1987. Nutrient effects on DNA and chromatin structure. *Annual Review of Nutrition*, 7: 407-421.

Cedelhorm T.E, Berg A.B., Johanson E.K., Hellström K.H. y Palmblad J.E.W. 1994. Low levels of essential fatty acids are related to impaired delayed skin hypersensitivity in malnourished chronically ill elderly people. *European Journal of Clinical Investigation*, 24: 615-620.

Cintra L., Galván A., Díaz-Cintra S. y Escobar C. 1994. Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.*, 42: 11-19.

Cormack D.H. *Histología de HAM*. 9a. ed., Harla, México, 1987.

Cortés E. 1993. Detección de células resistentes a la 6-tioguanina en médula ósea de ratas desnutridas durante la lactancia. UAM-Iztapalapa. Reporte de Servicio Social.

Cravioto J. 1975. Malnutrition in early childhood and some of its consequences for the individual and the community. *Journal of the Canadian Dietetic Association*, 36:254-277.

Cravioto J. y DeLicardie E.R. 1976. Malnutrition in early childhood. And some of its later effects at individual and community levels. *Food and Nutrition*, 2: 2-11.

Cravioto J. y Arrieta R. 1982. Nutrición, crecimiento y desarrollo. En: La investigación biomédica en México. Pasado, presente y futuro. Academia de la Investigación Científica, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología eds., 103-123.

Cravioto J. y Arrieta R. 1985. Nutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje. 2a. ed. INCYTAS-DIF, México. 191 pp.

Cravioto J, y Vega-Franco L. 1995. Historical highlights of mexican contributions to human nutrition. Archives of Medical Research, 26 (Suppl.): S133-S137.

De Mello M.A.R. 1994. Effects of intrauterine and postnatal protein-calorie malnutrition on metabolic adaptations to exercise in young rats. Brazilian J. Med. Biol. Res. 27: 2461-2466.

Dramaix M., Hennart P., Brasseur D., Bahwere P., Mudjene O., Tonglet R., Donnen P. y Smets R. 1993. Serum albumin concentration, arm circumference, and oedema and subsequent risk of dying in children in central Africa. British Medical Journal, 307: 710-713.

Fairbairn D.W., Reyes W.A. y O'Neill K.L. 1994. Alkali-labile sites are prevalent in kidney tissue DNA. Cancer Letters, 81: 67-76.

Fairbairn D.W., Olive P.L. y O'Neill K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research, 339: 37-59.

Fawcett D.W. Tratado de Histología. 11 ed., España, Interamericana McGraw-Hill, 1992.

Feledi C.A., Goldman H.L., Massouh E. J. y Roux M.E. 1993. B and T cells in the intestinal mucosa of malnourished rats after the oral administration of cholera toxin. Comunicaciones Biológicas, 11: 275-282.

Fenech M.F., Dunaiski V., Osborne Y y Morley A.A. 1991. The cytokinesis-block micronucleus assay as a biological dosimeter in spleen and peripheral blood lymphocytes of the mouse following acute whole-body irradiation. Mutation Research, 263: 119-126.

Fenech M. y Rinaldi R. 1994. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B₁₂ and folic acid. *Carcinogenesis*, 15: 1405-1411.

Fló J., Benedetti R., Feledi C., González-Ariki S., Goldman H., Slobodianki N., Massouh E. y Roux M.E. 1991. Studies of gut-associated lymphoid tissues and of systemic immune response to cholera toxin in a model of malnutrition. *Comunicaciones Biológica*, 9: 321-327.

Fortini P., Raspaglio G., Falchi M. y Dogliotti E. 1996. Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis*, 11: 169-175.

Galler J.R. y Kanis K.B. 1987. Animal models of malnutrition applied to brain research. *Currents Topics in Nutrition and Disease*, 16: 57-73.

Golub E. 1982. In vitro approach to hemopoiesis. *Cell*, 28: 687-688.

Gollapudi B.B., Sutcliffe D.J. y Sinha A.K. 1986. Assessment of cytogenetic response to folic acid deprivation in rat lymphocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 22: 681-683.

Gómez F. 1946. Desnutrición. *Boletín Médico del Hospital Infantil* 3, 543.

Gómez-Angelats M., Ruiz-Montasell B., Felipe A., Marín J.J.G., Casado J. y Pastor-Anglada M. 1995. Effect of protein malnutrition on neural amino acid transport by rat hepatocytes during development. *American Journal of Physiology*, 268: E368-E374.

Gómez J.L., Campos C., Rangel P y Ortiz R. 1996. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during sucking. *Mutation Research*, 352: 57-60.

González C. 1984. Proliferación Celular e Intercambio de Cromátidas Hermanas de Niños Desnutridos. ENEP- Iztacala, UNAM. Tesis de Licenciatura en Biología.

González C., Villaseñor L., y Betancourt M. 1990. Cinética de la proliferación in vitro de linfocitos de niños desnutridos. *Rev. de Inv. Clín.*, 42, 18-22.

Holz O., Jörres R., Kästner A. y Magnussen H. 1995. Differences in basal and induced DNA single-strand breaks between human peripheral monocytes and lymphocytes. *Mutation Research*, 332: 55-62.

Ikushima T., Benz D. y Carsten A.L. 1984. Sister chromatid exchanges in bone marrow cells of mice maintained on tritiated water. *Int. J. Radiat. Biol.*, 45: 251-256.

Jackson A.A. 1993. Chronic malnutrition: protein metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52: 1-10.

Khalil A.M. y Maslat A.O. 1990. Chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in human peripheral blood lymphocytes exposed to organoselenium in vitro. *Mutation Research*, 232: 227-232.

Kreja L., Selig C., Plappert U. y Nothdurft W. 1996. Radiation-induced DNA damage in canine hemopoietic cells and stromal cells as measured by the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27: 39-45.

Krishna G., Petersen J.N. y Ong T. 1986. A comparison of baseline and cyclophosphamide-induced sister chromatid exchanges in bone marrow and spleen of mouse and chinese hamster. *Environmental Mutagenesis* 8: 449-459.

Krishna G., Kropko M.L. y Theiss J.C. 1990. Dimethylnitrosamine-induced micronucleus formation in mouse bone marrow and spleen. *Mutation Research*, 242: 345-351.

Lankinen M., Vilpo L.M. y Vilpo J.A. 1996. UV- and γ -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutation Research*, 352: 31-38.

Lebenthal E. y Rossi T.M. 1983. Animal models for malnutrition during growth and development. *Nutrition Research*, 3: 625-628.

Marín M.C., De Tomás M.E., Mercuri O., Frenández A. y de Serres C.T. 1991. Interrelationship between protein-energy malnutrition and essential fatty acid deficiency in nursing infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 466-468.

Marín MC., De Tomás M.E., Serres C. y Mercuri O. 1995 Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 125: 1017-1024.

McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schemeyer P., Pool-Zoble B.L. y Collins A. 1993. The single cell electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288, 47-63.

Monteith D.K. y Vanstone J. 1995. Comparison of DNA damage from genotoxins using the microgel electrophoresis assay with primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutation Research*, 365: 79-86.

Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T. y Rodríguez-Reyes R. 1984. In vivo persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by gamma rays in mouse bone marrow. *Environmental Mutagenesis*, 6: 529-537.

Müller W.U., Bauch T., Wodjick A., Böcker W y Streffer C. 1996. Comet assay studies indicate that caffeine-mediated increase in radiation risk of embryos is due to inhibition of DNA repair. *Mutagenesis*, 11: 57-60.

Murthy P.B., Bhaskaram P. y Srikantia S.G. 1980. Sister chromatid exchanges in protein-energy malnutrition. *Human Genetics*, 55, 405-406.

Murthy P.B. y Srikantia P. 1981. SCE frequency in malnourished mice. *Metabolism*, 30: 1-2.

Mutchinick O., Lisker R., Ruz L., Salamanca F. y Armendares S. 1979. Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. *Ann. Genet.*, 22, 129-132.

Nocentini S. 1995. Comet assay of repair of DNA strand breaks in normal and deficient human cells exposed to radiations and chemicals. Evidence for a repair pathway specificity of DNA ligation. *Radiation research*, 144: 170-180.

Olive P.L. y Banáth J.P. 1992. Growth fraction measured using the comet assay. *Cell Proliferation*, 25: 447-457.

Olive P.L., Wlodek D., Durand R.E. y Banáth J.P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198: 259-267.

Onís M., Monteiro C., Akre J. y Clugston G. 1993. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO global database on child growth. *Bulletin of the World Health Organization*, 71: 703-712.

Ortiz R. y Betancourt M. 1984. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *Journal of Nutrition*, 114, 472-476.

Ortiz R. 1987. Efecto de la desnutrición sobre las células de médula ósea de rata. UNAM, Tesis doctoral.

Ortiz R., Campos C., Gómez J.L., Espinoza M., Ramos-Motilla M. y Betancourt M. 1994. Sister-chromatid exchange (SCE) and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein malnutrition (PCM). *Mutation Research*, 312, 33-37.

Ortiz R., Campos C., Gómez J.L., Espinoza M., Ramos-Motilla M y Betancourt M. 1995. Effect of renutrition on the kinetics of PHA stimulated lymphocytes from malnourished children. *Mutation Research*, 334: 235-241.

Ortiz R., Cortés E., González C., Pérez L. y Betancourt M. 1995. Micronucleus Frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26: 55-59.

Ortiz R. , Cortés E., Pérez L. , González C. y Betancourt M. 1996. Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Medical Science Research*, 24: 843-846.

Picarel-Blanchot F., Álvarez C., Bailbe D., Pascual-Leone A.M. y Portha B. 1995. Changes in insulin action and insulin secretion in the rat after dietary restriction early in life: influence of food restriction versus low-protein food restriction. *Metabolism*, 44: 1519-1526.

Rosselli F., Ridet A., Soussi T., Duchaud E., Alapetite C. y Moustacchi E. 1995. p53- dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. *Oncogen*, 10: 9-17.

Schöber C., Gibbs J.F., Yin M.B., Slocum H.K. y Rustum Y.M. 1994. Cellular heterogeneity in DNA damage and growth inhibition induced by ICI D 1694, thymidylate synthase inhibitor, using single cell assays. *Biochemical Pharmacology*, 48: 997-1002.

Senior K. 1995. Defending the use of animals to research human disease. *Molecular Medicine Today*, 5: 220-225.

Shelby M.D., Gulati D.K., Tice R.R. y Wojciechowski. 1989. Results of tests for micronuclei and chromosomal aberrations in mouse bone marrow cells with the human carcinogens 4-aminobiphenyl, thiosulphan, and melphalan. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13: 339-342.

Singer B. 1989. Structure-function relationships in alkylation damage and repair. En : DNA repair mechanisms and their biological implications in mammalian cells (Muriel W. Lambert y Jacques Laval, eds.). Ed. Plenum Press, N.Y., E.U.A.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., y Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.

Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., Brant L. y Schneider E.L. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Research*, 237, 123-130.

Sinha A.K., Bruce R.J. y Gollapudi. 1988. Cytokinetics and SCE baselines in rat and human lymphocytes during successive divisions in the presence of different culture media. *In vitro Cellular & Development Biology*, 24: 927-930.

Sinha A.K., Linscombe V.A. y Gollapudi B.B. 1989. Chromosomal aberrations in bone marrow and peripheral and peripheral blood cells from the same rats. *Mutation Research*, 226: 65-67.

Skullman S., Wirén M., Garlick P.J., McNurlac M.A. y Larsson J. 1994. Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. *Journal of Hepatology*, 21: 174-181.

Slavutsky I. e Knuutila S. 1989. Micronucleus formation in different lymphocyte subpopulations in neplomydin-treated and control cultures. *Mutation Research*, 219: 257-261.

Strauss G.H.S., Peters W.P. y Everson R.B. 1994. Measuring DNA damage in individual cells of heterogeneous mixtures: a novel application of an immunological typing technique. *Mutation Research*, 3048 211-216.

Suskind D, Murthy K.K. y Suskind R.M. 1990. The malnourished child: an overview. En: *The malnourished child* (Robert M. Suskind y Leslie Lewinter-Suskind, eds.). Nestlé Nutrition Series, vol. 19. New York. 1-17 pp.

Tavassoli M. y Mendel-Yoffey J. Bone marrow: structure and function. Alan R. Liss, E.U.A., 1983.

Throburn M.J., Hutchinson S. y Alleyne G.A.O. 1972. Chromosome abnormalities in malnourished children. *Lancet*, 1: 591.

Thurman D.I. 1990. Antioxidants and prooxidants in malnourished populations, *Proceedings Nutrition Society*, 49: 247-259.

Tice R.R., Strauss G.H.S. y Peters W.P. 1992. High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assesment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, 271: 101-113.

Tice R.R. 1995. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic tecnique for the detection of DNA damage and epair in individual cells. En: *Environmental mutagenesis* (D.H. Phillips y S. Venitt, eds.). Bios Scientific, Oxford. 312-339 pp.

Tucker J.D., Strout C.L., Christensen M.L. y Carrano A.V. 1986. Sister chromatid exchange induction and persistence in peripheral blood and spleen lymphocytes of mice treated with ethylnitrosourea. *Environmental Mutagenesis*, 8: 345-355.

Vaghef H., Wisén A.C. y Hellman B. 1996. Demonstration of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in mice by alkaline single cell gel electrophoresis: evidence for strand breaks in liver but not in lymphocytes and bone marrow. *Pharmacolgy & Toxicology*, 78: 37-43.

Velázquez A., Terán M., Báez A., Gutiérrez J. y Rodríguez R. 1995. Biotin supplementation affects lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61: 385-391.

Vian L., Bichet N. y Gouy D. 1993. The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutation Research*, 291: 93-102.

Vijayalaxmi. 1975. Chromosomal aberrations in malnutrition. *Metabolism*, 24: 1415-1417.

Vijalaxmi, Tice R.R. y Strauss G.H.S. 1992. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat. Res.*, 271, 243-252.

Watts G. 1976. Malnutrition in context. *World Medicine*, 11: 57-60.

Widdowson E.M., y McCance FR.S. 1960. Some effects of adeleration growth. I. General somatic development. *Proc. R. Soc. Lond.*, 152: 188-206.

Winick M. y Noble A. 1966. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *Journal of Nutrition*, 89: 300-306.

Wiseman H. y Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen anand nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313: 17-29.

Yoshino S., Narayanan C.H., Joseph F., Saito T. y Nakamoto T. 1994. Combined effects of caffeine and malnutrition during pregnancy on suckling behavior in newborn rats. *Physiology & Behavior*, 56: 31-37.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis el día 26 de septiembre de 1997.

TUTOR

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

SECRETARIO

VOCAL

M. en C. Silvia Patricia Pérez Vera

Dr. Mario Altamirano Lozano.
