



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN Y DE FÁRMACOS
SOBRE LA FRECUENCIA Y TIPO DE MICRONÚCLEOS
EN ERITROCITOS DE RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

HILDA MEDINA RUIZ

DIRECTORA:

DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

ASESORES:

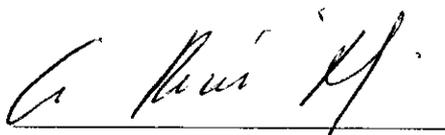
DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

DRA. LEONOR RODRÍGUEZ CRUZ

MÉXICO, D.F.

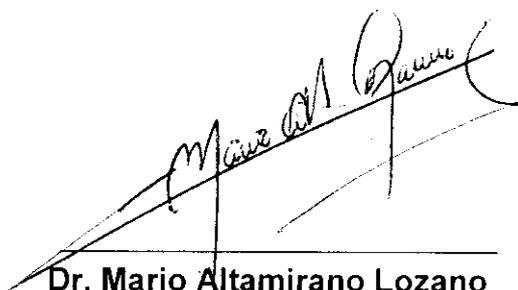
JULIO DE 2005

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 4 de Julio de 2005.



Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

PRESIDENTE



Dr. Mario Altamirano Lozano

SECRETARIO



Dra. Leonor Rodríguez Cruz

VOCAL

COMITÉ TUTORAL

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

arom@xanum.uam.mx

Dr. Mario Altamirano Lozano

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental,

Bioterio, Campo-II

maal@servidor.unam.mx

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

leor@xanum.uam.mx

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 309-0, y en el Padrón de Programas del PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada (número 176319).

Asimismo a la Universidad Autónoma Metropolitana por la beca otorgada para terminar la redacción de la tesis.

Este trabajo recibió apoyo de FOMES No. 98-35-28.

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología celular y
Citometría de Flujo, del Departamento de Ciencias de la salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.**

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 4 de Julio de 2005.

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz
PRESIDENTE

Dr. Mario Altamirano Lozano
SECRETARIO

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
VOCAL

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Rocío Ortiz Muñiz por su gran apoyo, comprensión y por la dirección de esta tesis.

A la Dra. Leonor Rodríguez Cruz por su valiosa asesoría y apoyo durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Mario Altamirano Lozano por su apoyo, revisión y comentarios en la realización de esta tesis.

A la M. en Biol. Exp. Edith Cortés Barberena por su apoyo y consejos brindados.

Dr. Efraín Campos y M. en C. M^a de los Ángeles Aguilar por sus valiosos comentarios y apoyo a este trabajo.

A mi familia porque siempre me han brindado su apoyo y confianza incondicionalmente.

A las personas que de alguna manera intervinieron en este trabajo.

DEDICATORIAS

**A mis padres
Alejandro y Esther**

**A mis hermanos
Alex, Angy y Vero**

**A mis amigas y amigos
Lety, Argelia, Dionisio y José Luis**

**A mis compañeras y amigas
del Laboratorio de Biología Celular
Catalina, Elsa y Julieta**

**A los niños, quienes son la razón de este trabajo y entre ellos
Jesús Uriel y Luis Daniel**

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABREVIATURAS	III
I. INTRODUCCIÓN	1
1. DESNUTRICIÓN	1
1.1 Tipos clínicos de la desnutrición grave.	4
1.2 Modelos experimentales para el estudio de la desnutrición.	6
1.3 Efectos de la desnutrición.	7
1.3.1 Efecto de la DCP a nivel citogenético.	9
2. AGENTES QUE AFECTAN AL ADN	10
2.1 Paracetamol (PC).	10
2.2 Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX).	11
3. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS	12
3.1 Principio del ensayo.	12
3.2 Origen del MN.	13
3.3 Criterios para detectar un MN.	14
3.4 Tipos celulares para el ensayo de MN.	15
4. ERITROPOYESIS	15
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. OBJETIVOS	20
IV. HIPÓTESIS	20

V. MATERIAL Y MÉTODO	21
5.1 Desnutrición experimental.	21
5.2 Curva dosis-respuesta de PC y TMP-SMX.	21
5.3 Curva dosis-respuesta de COL y MMC.	22
5.4 Administración de fármacos.	22
5.5 Extracción y fijación de la muestra.	23
5.6 Marcaje de Reticulocitos con MN (Ret-MN).	23
5.7 Detección del cinetocoro en eritrocitos.	23
5.8 Detección del cinetocoro en linfocitos.	24
5.9 Análisis de las muestras por CMF.	24
5.10 Análisis estadístico de los resultados.	27
VI. RESULTADOS	28
6.1 Peso de las ratas.	28
6.2 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con PC.	28
6.3 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con TMP-SMX.	30
6.4 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con PC + TMP-SMX.	33
6.5 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con COL.	34
6.6 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con MMC.	36
6.7 Evaluación de la frecuencia de Ret, Ret-MN y Nor-MN con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas.	38
6.8 Detección de cinetocoro en linfocitos T por CMF.	48
VII. DISCUSIÓN	49
7.1 Modelo experimental-desnutrición.	49
7.2 Desnutrición-Infecciones-Medicamentos.	49
7.3 Dosis-Respuesta-Fármacos.	50
7.4 Frecuencia de Reticulocitos (Ret) con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas.	53
7.5 Reticulocitos-Micronúcleados (Ret-MN) con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas.	55
7.6 Eritrocitos maduros-Micronúcleados (Nor-MN) con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas.	57

7.7	Detección de cinetocoro.	59
7.8	Eritrocitos un modelo celular para la detección de MN.	61
VIII. CONCLUSIONES		62
IX. BIBLIOGRAFÍA		64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Niño con desnutrición grave tipo kwashiorkor.	4
Figura 2.	Niño con desnutrición grave tipo marasmo.	5
Figura 3.	Niño con desnutrición grave, forma mixta marasmo-kwashiorkor.	5
Figura 4.	Origen del Micronúcleo.	12
Figura 5.	Proceso de eritropoyesis <i>in vivo</i> .	17
Figura 6.	Gráfica de punto para seleccionar la región de eritrocitos.	25
Figura 7.	Gráfica de punto, donde se identificaron los diferentes tipos de eritrocitos.	25
Figura 8.	Gráfica de punto para seleccionar la región de linfocitos T.	26
Figura 9.	Histograma de fluorescencia, para determinar el porcentaje de linfocitos T en R1.	26
Figura 10.	Histograma de fluorescencia, para determinar el porcentaje de linfocitos T con cinetocoro.	26
Figura 11.	Histogramas de fluorescencia, para determinar el porcentaje de linfocitos T con cinetocoro. A (control) y B (con anti-cinetocoro y Cy5).	48
Figura 12.	Eritroblasto en el proceso de eliminación de su núcleo.	61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica I.	Efecto de PC sobre la frecuencia de Ret-MN.	30
Gráfica II.	Efecto de TMP-SMX sobre la frecuencia de Ret-MN.	32
Gráfica III.	Efecto de PC + TMP-SMX sobre la frecuencia de Ret-MN.	34
Gráfica IV.	Efecto de COL sobre la frecuencia de Ret-MN.	36
Gráfica V.	Efecto de MMC sobre la frecuencia de Ret-MN.	38
Gráfica VI.	Porcentaje de Reticulocitos en ratas BN sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, PC +TMP-SMX y COL.	41
Gráfica VII.	Porcentaje de Reticulocitos micronucleados en ratas BN sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, PC +TMP-SMX y COL.	42
Gráfica VIII.	Porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados en ratas BN sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, PC +TMP-SMX y COL.	43
Gráfica IX.	Porcentaje de Reticulocitos en ratas DN sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, PC +TMP-SMX y COL.	44
Gráfica X.	Porcentaje de Reticulocitos en ratas DN sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, y COL.	45
Gráfica XI.	Porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados en ratas DN sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, y COL.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Curva dosis-respuesta del PC en la frecuencia de Ret-MN.	29
Tabla II.	Curva dosis-respuesta del TMP-SMX en la frecuencia de Ret-MN.	31
Tabla III.	Efecto de PC + TMP-SMX sobre la frecuencia de Ret-MN en diferentes tiempos.	33
Tabla IV.	Curva dosis-respuesta de COL en la frecuencia de Ret-MN.	35
Tabla V.	Curva dosis-respuesta de MMC en la frecuencia de Ret-MN.	37
Tabla VI.	Peso de las ratas Bien Nutridas a los 21 días de edad.	39
Tabla VII.	Peso de las ratas Desnutridas a los 21 días de edad.	39
Tabla VIII.	Efecto de PC, TMP-SMX y COL sobre la frecuencia de reticulocitos, reticulocitos micronucleados y eritrocitos normocromáticos micronucleados, en ratas bien nutridas y desnutridas.	40

RESUMEN

Aproximadamente unos 12 millones de niños menores de cinco años mueren cada año a causa de la desnutrición, la mayoría de ellos se hallan en países en vías de desarrollo. En particular, en México entre el 1 y 4% de los niños menores de cinco años se encuentran gravemente desnutridos y en los lactantes en el momento del destete la prevalencia aumenta hasta 10%. Por lo que se ha determinado que la lactancia es un periodo crítico en el crecimiento y desarrollo del organismo, en esta etapa los principales efectos de la desnutrición en los niños es retraso en el crecimiento y desarrollo físico, además de presentar una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

En el tratamiento de las infecciones que se presentan en los niños desnutridos, se recurre frecuentemente a la administración de antibióticos como Trimetoprim y Sulfametoxazol (TMP-SMX) para combatir infecciones bacterianas de tipo gastrointestinal, respiratorio y del tracto urinario; existen reportes controversiales del daño cromosómico que pueden causar estos fármacos. Por esta razón es importante continuar con las investigaciones del efecto genotóxico de la combinación de TMP-SMX.

Otro fármaco que generalmente acompaña al TMP-SMX en el tratamiento de infecciones es el Paracetamol (PC) empleado como analgésico y antipirético, de éste existen reportes de su genotoxicidad ya que es un agente clastogénico. Sin embargo es importante determinar la susceptibilidad de los organismos desnutridos a sufrir daño cromosómico por Trimetoprim-Sulfametoxazol y Paracetamol.

Dentro de los estudios realizados sobre la desnutrición, los modelos animales han sido ampliamente utilizados desarrollándose principalmente en rata y ratón. Se ha estudiado el efecto de la desnutrición en diferentes campos, en particular los estudios citogenéticos han determinado: la frecuencia de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, además la frecuencia de micronúcleos (MN).

Los MN se expresan en células en división que contiene algún fragmento acéntrico o cromosomas completos que son excluidos del núcleo durante la división celular. Este ensayo se realiza en diferentes tipos celulares como los eritrocitos, los cuales facilitan la

detección de MN por medio de sistemas de análisis de imagen o por citometría de flujo, porque no presentan núcleo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia y tipo de MN en los eritrocitos de ratas desnutridas (DN) tratadas con Trimetoprim-Sulfametoxazol y Paracetamol. Para ello se utilizaron ratas de la cepa Wistar a las que se les indujo la desnutrición por competencia de alimento, a la edad de 21 días fueron tratadas con PC, TMP-SMX y PC+TMP-SMX y posteriormente se extrajo sangre por punción cardíaca y se fijó la muestra. Para el análisis de las muestras se marcaron diferencialmente los reticulocitos (Ret) de los eritrocitos normocromáticos (Nor) y para detectar la presencia de MN en estos tipos celulares se utilizó yoduro de propidio. Finalmente las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScan.

Se observó que la frecuencia de Ret y Nor micronucleados (Ret-MN y Nor-MN) fue mayor en las ratas bien nutridas (BN) tratadas con los fármacos comparado con el grupo de ratas BN sin tratamiento, es decir que los fármacos tienen efecto genotóxico. En el caso de las ratas DN sin tratamiento la frecuencia de Ret-MN y Nor-MN fue mayor respecto al grupo de ratas BN sin tratamiento, lo que indica que la desnutrición por sí misma causa daño a nivel cromosómico. También la frecuencia de Ret en ratas DN disminuye drásticamente comparado con las ratas bien nutridas (BN), sin embargo la frecuencia de Ret-MN en ratas DN tratadas con los fármacos es mayor a la observada en las ratas con el mismo tratamiento; lo que indica que la desnutrición incrementa la susceptibilidad en los organismos a sufrir daño cromosómico a estos fármacos. En el caso de la frecuencia de Nor-MN fue mayor en las ratas DN testigo y tratadas con COL, por lo tanto hay acumulación de daño cromosómico causado por la DN.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BBS	Solución amortiguadora de bicarbonato
BN	Ratas bien nutridas
BN COL	Ratas bien nutridas tratadas con Colchicina
BN-MMC	Ratas bien nutridas tratadas con Mitomicina C
BN PC	Ratas bien nutridas tratadas con Paracetamol
BN PC+TMP-SMX	Ratas bien nutridas tratadas con Paracetamol y Trimetoprim-Sulfametoxazol
BN TMP-SMX	Ratas bien nutridas tratadas con Trimetoprim-Sulfametoxazol
CFC	Células formadoras de colonias
CMF	Citometría de Flujo
COL	Colchicina
CSF	Factores estimuladores de colonias
DCP	Desnutrición Calórico Proteica
DN	Ratas desnutridas
DN COL	Ratas desnutridas tratadas con Colchicina
DN-MMC	Ratas desnutridas tratadas con Mitomicina C
DN PC	Ratas desnutridas tratadas con Paracetamol
DN PC+TMP-SMX	Ratas desnutridas tratadas con Paracetamol y Trimetoprim-Sulfametoxazol
DN TMP-SMX	Ratas desnutridas tratadas Trimetoprim-Sulfametoxazol
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Luz dispersada a cero grados, hacia adelante
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
MMC	Mitomicina C
MN	Micronúcleo(s)
MT	Microtúbulos
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imine.
Nor	Eritrocito normocromático o maduro

Nor-MN	Eritrocito normocromático o maduro que presenta Micronúcleo
PABA	Ácido para-aminobenzoico
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PC	Paracetamol
Ret	Reticulocito o eritrocito inmaduro
Ret-MN	Reticulocito o eritrocito inmaduro que presenta micronúcleo
SPI	Síndrome Pluricarenal de la infancia
SSC	Luz dispersada a 90 grados, hacia los lados
TMP-SMX	Trimetoprim-Sulfametoxazol
YP	Yoduro de propidio

I. INTRODUCCIÓN

1. DESNUTRICIÓN

Aproximadamente el 39% de los niños preescolares del mundo sufren algún grado de desnutrición y esta patología representa la principal causa de muerte en menores de 5 años, en los países en desarrollo la desnutrición infantil alcanza proporciones alarmantes. En el año 2000, la cifra de niños con desnutrición y retraso del desarrollo fue del 33%, lo cual indica que la desnutrición infantil sigue siendo un problema grave de salud pública, esto supone en números absolutos que 206 millones de niños menores de cinco años sufren retraso en el crecimiento. Asia es el continente que presenta la prevalencia más elevada de retardo de crecimiento, África muestra una situación intermedia, que varía según las subregiones y Latinoamérica la más baja (Onis, 2001). Aproximadamente 12 millones de niños menores de cinco años mueren cada año, la mayoría de ellos viven en países en vías de desarrollo; más del 50% de esas defunciones se deben a la desnutrición que frecuentemente esta asociada a diarrea, enfermedades respiratorias agudas, paludismo o sarampión (Rice y col., 2000).

Desnutrición en México

En nuestro país las deficiencias en la nutrición ocupan el 5° lugar como causa de muerte en la población infantil, sin embargo estas cifras deben ser consideradas con reserva debido al registro incompleto existente, por lo que el Banco Mundial de Desarrollo y la UNICEF calculan en forma conservadora, que la mortalidad secundaria a desnutrición puede ser de casi el doble de lo que se reporta (Margen y col., 1994).

En México, la desnutrición aguda tiene mayor prevalencia en las Zonas del Golfo, del Pacífico Sur y del Sureste (Chávez y col., 2003; Parra-Gámez, 2003; Reyes y col., 2004), en estas poblaciones los índices de mortalidad en menores de un año son de cinco a 15 veces más altos y 10 a 30 veces más elevados en el grupo de edad de uno a cuatro años cuando se comparan con poblaciones en donde la desnutrición es menos frecuente (Thompson, 2000). Además se tiene conocido que la prevalencia de niños con desnutrición o que alguna vez la padecieron es de 46.4%; distribuidos en 36.1% en primer grado, 9.0% en segundo y 1.3% en tercer grado (Ávila-Curiel y col., 1998).

De acuerdo con estudios realizados se estima que sólo el 22% de los niños que viven en áreas rurales y el 40% de los que habitan áreas urbanas cursan con un peso normal para su edad (Thompson, 2000). También se encontró que entre 1 y 4% de los niños menores de cinco años se encuentran gravemente desnutridos y en los lactantes en el momento del destete la prevalencia aumentó hasta 10% (Nájera y col., 2000). Esto ha permitido establecer que la lactancia es un período crítico en el crecimiento y desarrollo del organismo, las alteraciones por falta de nutrimentos en esta etapa son más graves en relación con las observadas en adultos (Winick y Noble, 1966; Fló y col., 1991). Incluso se ha observado que los daños causados por la desnutrición durante el periodo de lactancia son irreversibles (Alu y Murthy, 1993; Veena y Murthy, 1994).

Clasificación de la desnutrición

El desarrollo del individuo depende de manera directa, de las condiciones nutricionales durante la gestación y el periodo postnatal, ya que la baja o deficiente calidad de la dieta en estas etapas críticas del desarrollo infantil puede provocar alteraciones tanto en la organización del sistema nervioso como en la constitución de diversos órganos, por lo tanto las alteraciones causadas por la desnutrición pueden persistir hasta la edad adulta.

Conviene definir como una adecuada nutrición aquella que contiene un balance entre lo que el organismo requiere y lo que gasta por sus actividades dicho en otras palabras, un balance entre los macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) y micronutrientes (minerales y vitaminas) contenidos en la dieta y la energía invertida en el desarrollo de sus actividades. De no cumplirse con esta regla básica, el organismo desarrolla “ajustes” que le permiten continuar por algún tiempo en un estado de equilibrio tanto funcional, metabólico como conductual (Parra-Gámez, 2003).

Los problemas de exceso o deficiencia de nutrimentos han acompañado al hombre en su proceso evolutivo (Vega-Franco, 1999). Aunque los niños son los que con mayor frecuencia se ven afectados por la desnutrición, en quienes sus efectos pueden ser particularmente devastadores, debido a que en los primeros cinco años de vida el crecimiento corporal es rápido y los requerimientos de nutrientes son mayores (Cravioto y Vega-Franco, 1995; Reyes y col., 2004).

En México, Federico Gómez publicó en 1946 un ensayo que tituló “Desnutrición”, en el denominó la desnutrición como la asimilación deficiente de alimentos por el organismo lo que conduce a un estado patológico de distintos grados de gravedad y diversas manifestaciones clínicas, es decir, este padecimiento se presenta como consecuencia de una deficiente ingestión y/o utilización de dietas con bajo contenido, principalmente de proteínas.

Asimismo, definió las causas de la desnutrición, señalando que el 90% de los casos se debe a subalimentación del sujeto, bien sea por la calidad o por la cantidad de los alimentos consumidos donde la pobreza, la ignorancia y el hambre juegan un papel importante y se disputan la primacía de la causalidad (Jelliffe, 1985; Reyes y col., 2004). El 10% restante de los casos de desnutrición son causados por las infecciones enterales o parenterales, defectos congénitos de los niños o bien nacimiento prematuro (Gómez, 1946).

Además, Gómez clasificó la desnutrición en tres grados dependiendo del porcentaje de pérdida de peso corporal:

- ◆ Desnutrición de primer grado (o leve): desnutrición moderada o que ha actuado por poco tiempo y se tiene un déficit corporal del 10% y menos de 25% del promedio correspondiente a la edad.
- ◆ Desnutrición de segundo grado (o moderada): más marcada que la anterior y el déficit de peso es mayor de 25% y menor de 40% del promedio correspondiente para la edad, frecuentemente requiere hospitalización.
- ◆ Desnutrición de tercer grado o desnutrición calórico proteica (DCP): en ella el organismo ha agotado casi todas las reservas para su sobrevivencia, el déficit de peso es mayor del 40% del promedio correspondiente a la edad cronológica del individuo (Gómez, 1946).

Esta clasificación es muy útil actualmente para fines clínicos y de investigación.

1.1 Tipos clínicos de la desnutrición grave

El término desnutrición calórico proteica se refiere a un conjunto de síntomas que aparecen en los niños que sufren una subalimentación crónica, y por lo tanto, de carencia prolongada de todos los elementos del complejo nutricional (Icaza y Béhar, 1981; Jelliffe, 1985; Gómez y col., 1999).

La DCP se puede clasificar en dos tipos principales basándose en el factor que está ausente en la dieta, aunque existe un tercer tipo que es poco frecuente.

Un tipo se llama *kwashiorkor*, (hipoalbuminemia o síndrome pluricarencial de la infancia, *SPI*), es producido por una dieta desequilibrada, constituida principalmente de carbohidratos y muy baja cantidad en proteínas, usualmente es más común en los niños entre 1 y 3 años. Los signos que se presentan en *kwashiorkor* pueden dividirse convencionalmente en tres grupos:



Figura 1. Niño con desnutrición grave tipo *kwashiorkor*, caracterizado por presentar edema en el abdomen y miembros inferiores.

- a) Los signos siempre presentes: edema del abdomen (signo primordial), falta de crecimiento, músculos débiles y atrofiados, con algo de grasa subcutánea (Figura 1).
- b) Signos que suelen presentarse: aunque no son indispensables para el diagnóstico, pelo de color claro, lacio y escaso; se rompe con facilidad, piel seca e hiperpigmentada, anemia y evacuaciones líquidas.
- c) Signos ocasionalmente presentes: hepatomegalia, úlceras y llagas en la piel (Icaza y Béhar 1981; Fechner y col., 2001; Golden, 2002; Krawinkel, 2003).

El otro tipo de DCP es el denominado *marasmo*, este se origina por una ingesta baja tanto en contenido proteico como de calorías, ocurre comúnmente en el primer año de vida, debido al fracaso de la lactancia materna y de dietas pobres en nutrientes. Sus características se pueden clasificar en dos grupos:

- a) Signos siempre presentes: falta extrema de crecimiento, déficit de peso, atrofia muy marcada de los músculos, la grasa subcutánea la ha perdido totalmente, piel seca,



Figura 2. Niño con desnutrición grave tipo marasmo, caracterizado por marcada reducción de masa muscular y la pérdida de grasa subcutánea.

pelo delgado y opaco, la cara es delgada tiene una apariencia de “ancianito” o de calavera, comparado con la redonda “cara de luna” que a menudo caracteriza al kwashiorkor (Figura 2).

- b) Signos ocasionalmente presentes: anemia y diarreas, algunas veces con signos de deshidratación.

Los niños con marasmo viven de las reservas de proteínas y de calorías de su propio cuerpo, además, se desarrolla presentando cuadros de infecciones, diarreas, traumas y enfermedades críticas. Se presenta en el 2% de individuos desnutridos; es prevalente en África, Sureste de Asia, América central y del Sur (Icaza y Béhar 1981; Tortora y Anagnostakos, 1993; Vásquez, 1998; Manary y col., 1998; Golden, 2002; Parra-Gámez, 2003).

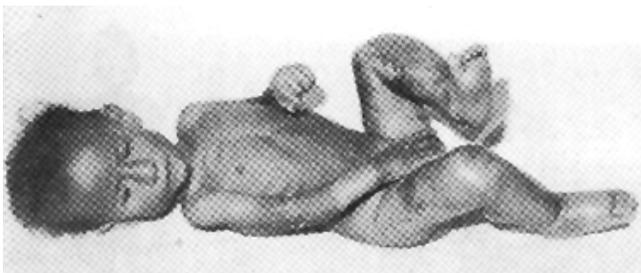


Figura 3. Niño con desnutrición grave, forma mixta marasmo-kwashiorkor, caracterizado por presentar reducción extrema de grasa subcutánea y edema en los miembros inferiores.

Una tercera forma de desnutrición, es marasmo-kwashiorkor, esta forma mixta de la DCP combina las características clínicas de las dos anteriores, las principales manifestaciones son el edema del kwashiorkor con o sin lesiones cutáneas, pérdida de masa muscular y reducción de grasa subcutánea del marasmo; la mayoría de los niños con la

forma mixta tienen alrededor de un año de edad y su pronóstico es malo ya que se trata generalmente de una forma crónico agudizada más grave y descompensada (Vásquez, 1998).

1.2 Modelos experimentales para el estudio de la desnutrición

Los estudios en niños desnutridos son indispensables debido a la necesidad de 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 las infecciones, pueden alterar o enmascarar los efectos causados por el padecimiento. Por lo anterior, es necesario proponer y realizar estudios en modelos animales desnutridos experimentalmente, ya que de esta manera es posible controlar diversas variables (Cortés, 1997).

Dentro de los estudios realizados sobre la desnutrición, los modelos animales han sido ampliamente utilizados desarrollándose principalmente en rata y ratón (Ortiz y col., 1999). Si bien los estudios del efecto de la desnutrición en diferentes etapas de la vida son relevantes, los estudios durante la lactancia podrían considerarse prioritarios, dada la importancia de este período, el cual en la rata corresponde a la infancia temprana de los niños.

Básicamente dos métodos son utilizados para inducir desnutrición en animales de laboratorio durante la lactancia (Ortiz y col., 1996): uno de ellos está basado en la deficiente calidad del alimento ingerido, en este las crías son alimentadas por una nodriza desnutrida que produce leche de calidad deficiente (Resnick y col., 1982; Marin y col., 1995). El otro método, implica la disminución de la cantidad de la leche disponible para cada cría al establecerse la competencia por el alimento, el método consiste en incrementar el número de crías por nodriza, lo que tiene como consecuencia que la cantidad de alimento que puede ingerir cada una de ellas sea baja (Benedetti y col., 1992; Ortiz y col., 1996).

Los estudios sobre este padecimiento, particularmente realizados en rata, han aportado información valiosa con relación a las posibles secuelas producidas por la desnutrición en diversos niveles y en diferentes etapas de la vida. Además los estudios en modelos animales presentan diversas ventajas, como son: mayor control de variables; la posibilidad de realizar estudios *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*; permitir utilizar diversos órganos, tejidos y tipos celulares, así como el poder determinar la susceptibilidad y el posible efecto sobre la funcionalidad celular (Ortiz y col., 1996). Otro punto importante es el corto promedio de vida de las ratas,

así como el relativo bajo costo de mantenimiento lo cual ha hecho atractiva la experimentación con esta especie (Galler y Kanis, 1987; Senor, 1995).

1.3 Efectos de la desnutrición

Se ha estudiado el efecto de la DCP en diferentes campos como son: el conductual (Yoshino y col., 1994), el neurológico (Cintra y col., 1994), el hematológico (Fondu y col., 1978; Wickramasinghe y col., 1985), el inmunológico (Feledi y col., 1993), el celular (Betancourt y col., 1992), el citogenético (Veena y Murthy, 1994; Ortiz y Betancourt, 1990; Ortiz y col., 1995), y el bioquímico (Skulman y col., 1994).

Diversos estudios confirman que la desnutrición en los primeros años de vida afecta el crecimiento del cerebro y desarrollo intelectual. Stoch y Smythe (1963), fueron los primeros en formular la hipótesis de que la desnutrición en los primeros dos años de vida, podría inhibir el crecimiento del cerebro y esto produciría una reducción permanente de su tamaño y un bajo desarrollo intelectual; los dos primeros años de vida no sólo corresponden al período de máximo crecimiento del cerebro, sino que al final del primer año de vida se alcanza el 70% del peso del cerebro adulto, constituyendo también casi el período total de crecimiento de este órgano (Ivanovic, 1996). Por otro lado, Leiva y col., (2001) determinaron que un alto porcentaje de los escolares que obtienen muy bajo rendimiento escolar presentan circunferencia craneana subóptima y menor volumen encefálico. También se ha observado que la desnutrición a edad temprana reduce la tasa de división celular en el cerebro, disminuyendo la mielinización, observándose una estrecha correlación entre la circunferencia craneana y el crecimiento cerebral. La desnutrición no sólo afecta el período de crecimiento cerebral, sino que también afecta los procesos organizacionales tempranos, tales como neurogénesis, migración celular y diferenciación (Herrera y col., 2000).

El sistema inmunológico también es afectado por la DCP. Se ha encontrado en niños con DCP el timo atrofiado, con reducción de tamaño, peso y contenido celular, así como la morfología de los nodos linfáticos, bazo y amígdalas, asimismo la inmunidad mediada por células es dañada reduciendo la síntesis de varias citocinas, tales como interleucina-1, interleucina-2 e interferón gama (Chandra, 1996; Grunfeld, 2002).

Otro trabajo relacionado a los anteriores es el de Ortiz y col. (1999), quienes observaron en ratas desnutridas una disminución en el porcentaje de linfocitos totales, además, de alteración en el porcentaje de linfocitos T y linfocitos B.

Por otro lado Reichlmayr-Lais y Kirchgessner (1981) en sus experimentos con ratas en crecimiento determinaron que existen alteraciones hematológicas inducidos por una alimentación deficiente, mostrando un valor bajo de hematócrito respecto a los valores normales.

1.3.1 Efecto de la DCP a nivel citogenético

En 1971 Armendares y col., encontraron incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de niños con DCP; por el contrario Betancourt (1979) no encontró diferencia entre su grupo experimental y testigo. A pesar de la variabilidad mostrada entre estos estudios, se puede afirmar que existe una tendencia de los organismos desnutridos a presentar mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas que los organismos bien nutridos (Betancourt y Ortiz, 1991).

Posteriormente se incorporaron metodologías más sensibles para medir el daño cromosómico y celular, tal como la detección de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), este proceso involucra ruptura, intercambio y reparación entre moléculas de ADN en loci homólogos de las cromátidas de cromosomas en duplicación.

Mutchinick y col. (1979) realizaron estudios con cultivos de linfocitos de niños severamente desnutridos, no encontraron aumento en la frecuencia promedio de ICH, mientras que otros trabajos si mostraron aumento en el promedio de las frecuencias de ICH en el grupo con DCP (Murthy y col., 1980; Ortiz y col., 1994). Un estudio con células de médula ósea de ratones adultos desnutridos, demostró diferencias significativas en la frecuencia de ICH entre el grupo experimental y testigo (Murthy y Srikantia, 1981), asimismo Betancourt y col. (1986) observaron incremento en esta frecuencia en ratas desnutridas durante la lactancia.

Cortés y col. (2001) detectaron el daño en el ADN por medio de electroforesis unicelular, de diferentes tipos celulares (bazo, sangre periférica y médula ósea) de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, observaron que la desnutrición está asociada con el incremento de daño al ADN en los tipos celulares estudiados, además de que encontraron que algunos tipos celulares fueron más susceptibles que otros.

Un ensayo complementario a los anteriores es la frecuencia de micronúcleos (MN), se ha evaluado *in vitro* la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica de niños con desnutrición (Ortiz y col., 1997) y en linfocitos de bazo de ratas desnutridas experimentalmente (Ortiz y col., 1995). Recientemente, en nuestro laboratorio iniciamos el estudio *in vivo* en reticulocitos de sangre periférica de ratas desnutridas experimentalmente

durante la lactancia, en estos estudios se observó que la frecuencia de MN es mayor en las células de las ratas desnutridas en relación a la observada en las células de las ratas bien nutridas. Estos resultados indican que la DCP produce daño celular *in vivo*, y este daño puede producir efectos negativos para el desarrollo del organismo (Ortiz y col., 2004).

2. Agentes que afectan al ADN

El estudio de daño en el ADN a nivel cromosómico es parte esencial de la genética toxicológica, ya que el daño cromosómico puede ser causado por exposición a radiación ionizante o químicos carcinogénicos, dentro de los agentes químicos se encuentra el Paracetamol y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

2.1 Paracetamol (PC)

El paracetamol (acetaminofén; N-acetil-p-aminofenol) es ampliamente utilizado como analgésico y antipirético (Hardman y col., 1996; Ruepp y col., 2002; Lewerenz y col., 2003), el PC es el metabolito activo de la fenacetina, un analgésico derivado de la anilina (alquitrán de hulla); el efecto colateral más grave de la sobredosis aguda de PC es la necrosis hepática que depende de la dosis, el cual puede ser mortal en el humano y en animales experimentales (Dybing y col., 1984; Hardman y col., 1996).

Ensayos *in vitro* en linfocitos humanos y líneas celulares de roedores, muestran efecto clastogénico del PC, el cual depende de la concentración, tiempo de exposición y de los sistemas de metabolismo. En particular en humanos, el citocromo P450 determina la bioactivación y la formación de intermediarios electrófilos como NAPQI (N-acetil-p-benzoquinona imine) que actúa como tóxico hepático, puede causar arilación y oxidación de grupos SH esenciales de macromoléculas y directa o indirectamente inicia la lipoperoxidación, también se une covalentemente al ADN e inhibe a la ribonucleótido reductasa (Hongso y col., 1990 y 1991; Müller y col., 1991, Giri y col., 1992; Giri, 1993; Gujral y col., 2002; Lewerenz y col., 2003).

2.2 Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX)

La introducción de la combinación de TMP-SMX constituyó un progreso importante en la obtención de antimicrobianos eficaces contra una amplia variedad de especies bacterianas, actúa contra bacterias aeróbicas gram-positivas y gram-negativas. Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido para-aminobenzoico (PABA), y por tal razón impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis de ácido fólico (ácido pteroilglutámico). De modo más específico las sulfonamidas son inhibidores competitivos de la dihidropteroato sintetasa, la enzima bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico (Hardman y col., 1996).

El TMP es un potencial inhibidor de la enzima, dihidrofolato reductasa, la cual es responsable de la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato, este último se necesita para reacciones de transferencia de un solo carbono en la biosíntesis de ADN, ARN y proteínas. Por esa razón, la administración simultánea de SMX y de TMP induce bloqueos seriados en la vía por la que los microorganismos sintetizan tetrahidrofolato a partir de moléculas precursoras, resultando la detención del ciclo celular o muerte celular (Golde y col., 1978; Abou-Eisha y col., 1999).

3. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

El ensayo de Micronúcleo (MN) fue propuesto por Heddle (1973) y Schmid (1975), este estudio es una alternativa para evaluar el daño cromosómico *in vivo*. Se considera que este ensayo debe incluirse en los estudios citogenéticos, para obtener información adicional, complementaria a la obtenida en el análisis de aberraciones cromosómicas y de frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Ortiz y col., 1995).

3.1 Principio del ensayo

Los MN se presentan en células en división que contiene algún cromosoma fragmentado carente de centrómero (fragmento acéntrico) o cromosomas enteros que son incapaces de desplazarse hacia los polos durante la mitosis (Heddle y col., 1983; Kirsch-Volders y col., 2000) y son excluidos del núcleo durante la división celular (He y Baker, 1989; Mavournin y col., 1990). Durante la telofase, se forma una envoltura nuclear alrededor de los cromosomas rezagados o fragmentos cromosómicos, asimismo se desenrollan y gradualmente asumen la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que ellos son más pequeños que el núcleo principal de la célula, de aquí el término "micronúcleo" (Figura 4). También son conocidos por los hematólogos como cuerpos de Howell-Jolly (Albertini y col., 2000; Fenech, 2000).

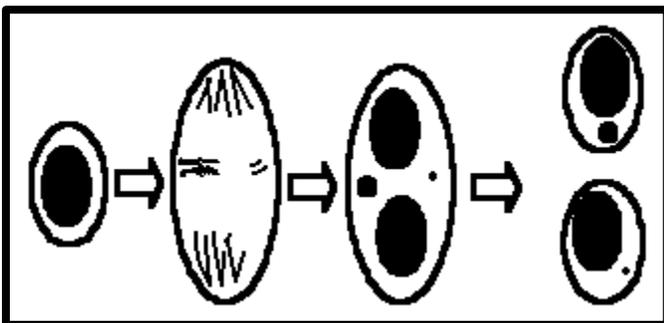


Figura 4. Origen del Micronúcleo, a partir de un cromosoma entero rezagado y de un fragmento acéntrico. (Tomado de Fenech, 2000).

3.2 Origen del MN

El ensayo de MN *in vivo* es utilizado para detectar potencialmente la acción de agentes químicos, físicos y biológicos, así como determinar su mecanismo de acción.

Un agente clastogénico, origina MN compuestos de fragmentos cromosómicos debido a:

- a) ruptura directa del ADN;
- b) replicación sobre un templete de ADN dañado; o
- c) inhibición de síntesis de ADN (Albertini y col., 2000; Fenech, 2000).

Los agentes aneugénicos, originan MN con al menos un cromosoma completo o una cromátida; debido a alteraciones en:

- a) el huso mitótico,
- b) el cinetocoro,
- c) centríolo,
- d) centrosoma (Vanparys y col., 1990; Sullivan y col., 2001, Goshima y col., 2003).

Para determinar el mecanismo por el cual se originó el MN, se han desarrollado dos métodos citogenéticos moleculares, estos identifican la presencia del complejo centrómero-cinetocoro en el MN y de este modo esclarecer el origen del MN. Una técnica es utilizando anticuerpos anticinetocoro (suero de pacientes con una variante de escleroderma) conjugados con un fluorocromo, es decir, tinción con inmunofluorescencia (CREST). En el otro método se usan secuencias de ADN del centrómero y se identifican mediante Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (Krishna y col., 1993, 1994; Norppa y col., 1993; Ding y col., 2003). Cuando se observa un MN con cinetocoro-positivo/centrómero-positivo; el MN esta formado por un cromosoma completo o fragmentos céntricos, aunque estos son raros pueden ser identificados por una hibridación adicional con secuencias de ADN teloméricas. Si el MN es cinetocoro-negativo/centrómero-negativo; se interpreta que el MN esta formado por fragmentos cromosómicos acéntricos (Hayashi y col., 2000; Krishna y Hayashi, 2000).

Aunque también se han utilizado otros métodos tales como: Tamaño del MN (Yamamoto y Kikuchi, 1980), por bandeo C (Verschaeve y col., 1988) o por medición del contenido de ADN (Vanderkerker y col., 1989; Nüsse y col., 1996).

Entre los agentes clastogénicos se encuentra la Mitomicina C (MMC), se conoce que interactúa covalentemente con el ADN *in vitro* e *in vivo*, es un agente alquilante del ADN

(Younghwa y col., 2001), inhibe la síntesis de ADN ocasionando ruptura del ADN y cromosómicas (Dorr, 1988; Tomasz y col., 1986), e induce la formación de ICH y MN (Gupta y Sharma, 1981, Ortiz y col., 2004).

Dentro de los agentes con actividad aneugénica se encuentra la colchicina (COL), actúa inhibiendo la polimerización de la tubulina en los microtúbulos (MT), también afecta centríolos y centrosomas (Grawé y col., 1993; Parry y col., 2002; Attia y col., 2003).

3.3 Criterios para detectar un MN

Para identificar los MN por microscopia hay que considerar los siguientes puntos:

- Los MN son morfológicamente idénticos al núcleo principal pero más pequeños,
- El diámetro de MN normalmente varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio del núcleo principal,
- Los MN no son refractivos y ellos pueden ser distinguidos rápidamente de artefactos como manchas o partículas de la tinción,
- El MN no se une o se conecta al núcleo principal,
- El MN puede tocar pero no puede enmascarar los núcleos principales y el límite del MN debe ser distinguible del límite nuclear,
- El MN normalmente tienen la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, no obstante esta puede ser más intensa (Fenech, 2000; Kirsch-Volders y col., 2000).

Sin embargo, el análisis por microscopia es un proceso tedioso y consume demasiado tiempo, debido a que hay que analizar por lo menos 1000 eritrocitos en médula ósea y 2000 en sangre periférica (Schmid, 1975; Hayashi y col., 1992 a y b, 2000; Krishna y Hayashi, 2000), además de que se deben enumerar e identificar claramente las células.

Por lo anterior, se han implementado ensayos que emplean instrumentos de análisis automatizado, estos tienen el propósito de mejorar la capacidad, objetividad y sensibilidad del ensayo de MN, tal es el caso del citómetro de flujo (Grawé y col., 1992; Torous y col., 2000; Hamada y col., 2001).

3.4 Tipos celulares para el ensayo de MN

Los ratones y ratas son las especies más frecuentemente utilizadas en diversos trabajos de investigación, de los cuales se emplean principalmente células de médula ósea y de sangre periférica (Mavournin y col., 1990). Esta última ha sido utilizada ampliamente en trabajos de toxicología y bioensayos de carcinogénesis de largo tiempo (Schlegel y MacGregor, 1982; Kirsch-Volders y col., 2000).

El ensayo de MN se ha realizado con diferentes tipos celulares como son: células germinales (Lähdetie y Parvinen, 1981), hepatocitos (Cllet y col., 1989), células de hígado fetal (Cole y col., 1981), linfocitos (Fenech y Morley, 1985; Ortiz y col., 1995); células de bazo (Shindo y col., 1983), células de colon (Heddle y col., 1983), además de exfoliados de células que son obtenidos de la mucosa bucal, bronquio, vejiga; uréter y estómago, entre otros. Actualmente para realizar el ensayo de MN en rata, a partir de médula ósea y/o sangre periférica, el principal tipo celular utilizado son los eritrocitos inmaduros (Hayashi y col., 1992; 2000).

4. ERITROPOYESIS

Las células de la sangre circulante tienen una vida corta y se renuevan constantemente por la proliferación mitótica de las células madre o "stem cell" localizadas en los órganos hemopoyéticos (Smith, 1996).

En la vida postnatal, los hematíes, los granulocitos, los monocitos y las plaquetas derivan de las células madre localizadas en la médula ósea roja. El origen y maduración de estas células se denomina, respectivamente, eritropoyesis, granulocitopoyesis, monocitopoyesis y megacariocitopoyesis. Todas las células de la sangre derivan de un único tipo celular de la médula ósea roja, llamado por ello célula madre totipotencial. Estas células proliferan y forman dos linajes: el de las células linfoides, que van a formar linfocitos, y el de las células mieloides, que originan en la propia médula los granulocitos, eritrocitos, monocitos y plaquetas. Las células madre linfoides y mieloides se llaman células madre pluripotenciales (Fawcett, 1995).

Las células madre son células que se dividen continuamente y sus células hijas siguen dos destinos: unas permanecen como células madre, manteniendo esta población, y otras se diferencian en otros tipos celulares con características específicas (Junqueira y Carneiro, 1996).

La proliferación de las células madre pluripotenciales origina células hijas con menor potencialidad. Estas células hijas son las células progenitoras uni o bipotenciales, que producen las células precursoras (Blastos). Por tanto, la hemopoyesis es el resultado de la proliferación y diferenciación simultáneas de células madre que a medida que se diferencian, van reduciendo su potencialidad. Las células que forman colonias de tipos específicos de células se denominan células formadoras de colonias (CFC).

El desarrollo de las células sanguíneas depende de factores que influyen en su proliferación y diferenciación, estos factores son sustancias denominadas factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias (CSF) o hemopoyetinas (Fawcett, 1995; Smith, 1996).

Dependiendo de su grado de madurez, las células eritrocíticas se denominan proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos ortocromáticos (o acidófilos), reticulocitos (eritrocito joven) y eritrocitos normocromáticos (eritrocitos maduros o hematíes).

Durante la maduración de las células de linaje eritrocítico tiene lugar lo siguiente: el volumen de las células disminuye; la cromatina se vuelve más densa hasta que el núcleo aparece picnótico y finalmente es expulsado de la células; los nucléolos disminuyen de tamaño; se produce una disminución de los polirribosomas y un aumento de hemoglobina en el citoplasma; y la cantidad de mitocondrias disminuye (Junqueira y Carneiro, 1996).

En los roedores la médula ósea y el bazo son órganos hemopoyéticos, en los cuales se lleva a cabo la eritropoyesis, en estos las células madre se encuentran en constante proliferación, pasan por diversas fases de diferenciación y maduración para dar origen a las células de la sangre (Krishna y col., 1994; Hayashi y col., 2000). Durante la etapa de maduración el eritroblasto pierde su núcleo, esto ocurre alrededor de 6 h después de la última mitosis dando origen a los reticulocitos (Ret), estos permanecen en la médula ósea entre 12 y 24 h, se caracterizan por contener ARN, además de alto nivel de receptores a transferrina expresado en la superficie de su membrana (Serke y Hund, 1992; Torous y col., 2000). Estos

Ret se mantienen un tiempo similar en sangre periférica, donde se desarrollan a eritrocitos maduros (Nor). Estos últimos persisten en la circulación alrededor de 1 mes (Dertinger y col., 1996; Hayashi y col., 2000).

En los Reticulocitos la visualización del MN es facilitada debido a que carecen de núcleo. El proceso de eritropoyesis y el mecanismo de formación de MN *in vivo* se muestra en la Figura 5 (Krishna y Hayashi, 2000).

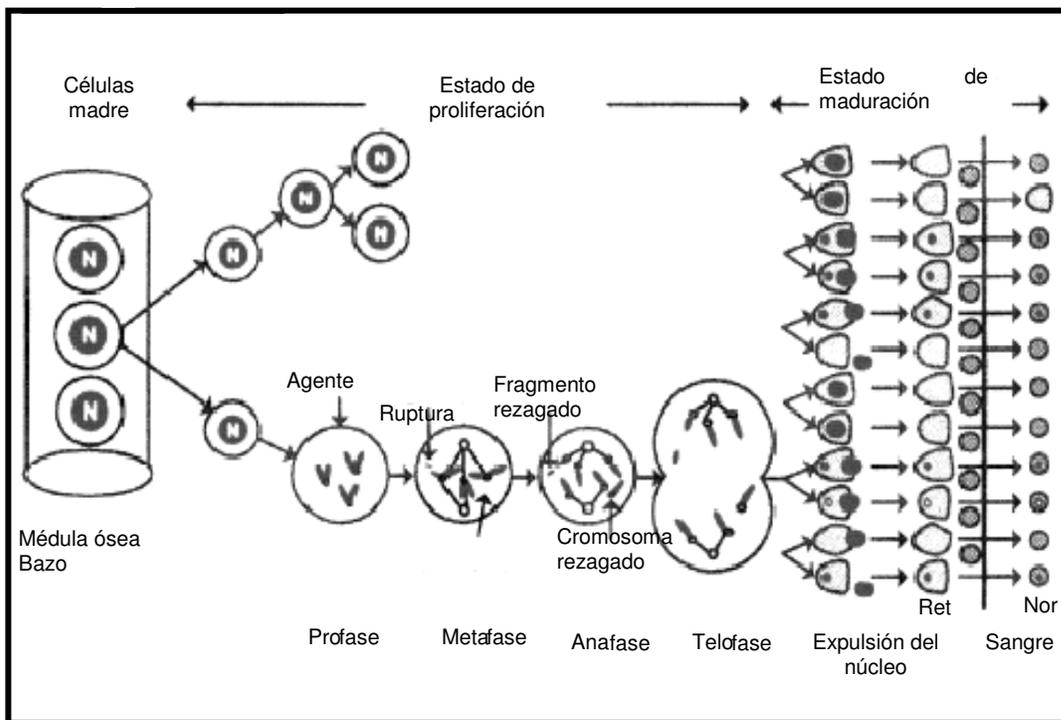


Figura 5. Proceso de eritropoyesis *in vivo*. Los MN se forman en células que se dividen rápidamente, como sucede durante la eritropoyesis en las células madre o en el eritroblasto. Los eritrocitos que se están originando, pierden su núcleo y contienen ARN ribosomal y son llamados eritrocitos policromáticos (Ret) hasta convertirse en los eritrocitos maduros (Nor), que ya han perdido los ribosomas. Sólo los Ret que podrían tener MN inducidos por un reciente tratamiento, lo mantienen en el citoplasma, ya sea por daño en la estructura del cromosoma o del huso mitótico (Tomada de Krishna y Hayashi, 2000).

El incremento en la frecuencia de reticulocitos micronúcleados (Ret-MN) en animales expuestos a agentes químicos o físicos, es indicativo de daño cromosómico. Con el tiempo, los reticulocitos pierden el ARN y los receptores a transferrina y llegan al estado de

eritrocitos maduros o normocromáticos (Nor), los cuales contienen mayoritariamente hemoglobina, se encuentran principalmente en la sangre y son un poco más pequeños que los reticulocitos (Hamada y col., 2001; Torous y col., 2000).

Estos dos tipos de eritrocitos teñidos diferencialmente se distinguen claramente en médula ósea, bazo y en sangre periférica (Krishna y Hayashi, 2000), ya sea microscópicamente, por sistemas de análisis de imagen y/o por citometría de flujo (Hamada y col., 2001).

II. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición es un padecimiento que se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país y se manifiesta principalmente en los niños en quienes sus efectos pueden ser devastadores, específicamente se han observado alteraciones en el sistema inmunológico de los niños con DCP lo que provoca en estos niños alta susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas.

Estas infecciones actúan de manera sinérgica con la desnutrición, deteriorando aún más la salud de los niños. En el tratamiento que reciben los niños desnutridos para combatir infecciones gastrointestinales, del tracto respiratorio e infecciones del tracto urinario causadas por bacterias, se recurre frecuentemente a la administración de antibióticos como Trimetoprim y Sulfametoxazol (TMP-SMX). Otro fármaco que generalmente acompaña al TMP-SMX en el tratamiento de infecciones es el Paracetamol (PC) empleado para evitar efectos secundarios de las infecciones; actúa como analgésico y antipirético.

Existen reportes controversiales del daño cromosómico que pueden causar el TMP-SMX, por esta razón es importante continuar con las investigaciones del efecto genotóxico de la combinación de TMP-SMX, así como determinar su mecanismo de acción ya sea clastogénico o aneugénico.

Con relación al PC existen varios reportes de su genotoxicidad, se ha establecido que actúa como un agente clastogénico, pero es importante determinar la susceptibilidad de los organismos desnutridos a sufrir daño cromosómico por PC. Además de evaluar el efecto de la administración simultánea de ambos fármacos (TMP-SMX y PC).

La rata se considera un modelo experimental adecuado para evaluar la citotoxicidad de estos fármacos, debido a que el metabolismo de ambos compuestos en estos organismos es equivalente y similar al humano. Además de ser considerada un modelo adecuado para estudiar los efectos asociados a la desnutrición, debido a que se ha establecido el método de inducción de la desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia, el cual es confiable y reproducible.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos de ratas desnutridas tratadas con Paracetamol y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la curva dosis respuesta a la inducción de micronúcleos en eritrocitos de ratas bien nutridas de una dosis única de PC de 160, 400 y 600 mg/ kg de peso en 24 y 48 h.
- Determinar la curva dosis respuesta a la inducción de micronúcleos en eritrocitos de ratas bien nutridas de una dosis única de TMP-SMX de 8-40, 80-400 y 160-800 mg/ kg de peso en 24 y 48 h.
- Determinar la frecuencia de MN en eritrocitos de ratas bien nutridas y desnutridas.
- Determinar la frecuencia de MN en eritrocitos de ratas bien nutridas y desnutridas tratadas con Paracetamol.
- Determinar la frecuencia de MN en eritrocitos de ratas bien nutridas y desnutridas tratadas con Trimetoprim-Sulfametoxazol.
- Determinar la frecuencia de MN en eritrocitos de ratas bien nutridas y desnutridas tratadas simultáneamente con los dos fármacos mencionados.

IV. HIPÓTESIS

- Si la DCP tiene efecto a nivel cromosómico induciendo la formación de MN; entonces aumentará la frecuencia de MN en las ratas desnutridas.
- Si los fármacos tienen efecto genotóxico induciendo la formación de MN, entonces aumentará la frecuencia de MN en las ratas bien nutridas y desnutridas tratadas con los fármacos.

V. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Desnutrición experimental

Se emplearon ratas de la cepa Wistar del Bioterio de la UAM-I, con luz controlada 12 / 12 horas de luz/oscuridad, temperatura entre 22 y 25 °C y humedad relativa de 45%.

La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante la lactancia, para esto las ratas al día siguiente de su nacimiento se distribuyeron en dos lotes: lote experimental (desnutridas) en el que se colocaron 16 crías con una nodriza y lote testigo (bien nutridas) con ocho crías por nodriza. Las crías fueron pesadas cada dos días, desde el día uno hasta la edad de 21 días (destete) (Ortiz y col., 1996). Las ratas del lote experimental que mostraron un déficit de peso mayor al 40%, con relación a las ratas del lote testigo a los 21 días de edad, se emplearon para realizar los ensayos.

5.2 Curva dosis-respuesta de PC y TMP-SMX

Para determinar la dosis a emplear de PC y TMP-SMX se realizó la curva dosis-respuesta con base a la dosis máxima terapéutica. En el caso del PC la dosis máxima terapéutica es de 160 mg/kg de peso en niños y 4000 mg/día/persona adulta (Giri y col., 1992; Hardman y col., 1996), para TMP-SMX es de 8-40 mg/kg de peso en niño de tres a seis años y en adulto la dosis es de 160-800 mg/kg de peso (Hardman y col., 1996). Los tratamientos con los diferentes fármacos se realizaron a 24 y 48h de exposición, en ratas bien nutridas de 21 días de edad, se utilizaron dos ratas para cada dosis y tiempo de exposición.

Una vez determinadas las dosis de PC y TMP-SMX, se procedió a determinar el tiempo de exposición de las ratas a la administración simultánea de ambos fármacos (PC [400 mg/kg] + TMP-SMX [80-400 mg/kg]), para lo cual se expusieron durante 24 y 48 h y se utilizaron tres ratas para cada tiempo.

5.3 Curva dosis-respuesta de COL y MMC

Para determinar la curva dosis-respuesta de la Mitomicina C (MMC) y Colchicina (COL), se utilizaron las dosis de 0.75 y 1.00 mg/kg de peso a 24 y 48 h de exposición. Las ratas con estos tratamientos fueron el control positivo de la formación de MN sin cinetocoro y el control positivo de la formación de MN con cinetocoro, respectivamente. Para la curva de COL se utilizaron tres ratas para cada dosis y tiempo de exposición al agente y en el caso de la MMC a las dos dosis antes mencionadas se trataron dos y tres ratas para cada tiempo de exposición (24 y 48 h).

5.4 Administración de fármacos

Las ratas se agruparon de la siguiente forma:

- Grupo 1: ratas bien nutridas (BN, n=7) y desnutridas (DN, n=5) sin ningún tratamiento.
- Grupo 2: ratas bien nutridas (BN PC, n=5) y desnutridas (DN PC, n=5) tratadas con Paracetamol con una dosis única de 400 mg/kg de peso durante 24h.
- Grupo 3: ratas bien nutridas (BN TMP-SMX, n=5) y desnutridas (DN TMP-SMX; n=5) tratadas con Trimetoprim-Sulfametoxazol, con una dosis única de 80-400 mg/kg de peso por 48h.
- Grupo 4: ratas bien nutridas (BN PC+TMP-SMX, n=5) tratadas con Paracetamol y Trimetoprim-Sulfametoxazol con las dosis mencionadas en los grupos anteriores.
- Grupo 5: ratas bien nutridas (BN COL, n=4) y desnutridas (DN COL, n=2) tratadas con Colchicina a una dosis única de 0.75 mg/kg a 48 h. Son el control positivo de la formación de MN con cinetocoro.

La administración de los diferentes agentes se realizó por vía intraperitoneal.

5.5 Extracción y fijación de la muestra

Después de la exposición a los diferentes fármacos, con una jeringa heparinizada se extrajo sangre por punción cardíaca y se realizó una dilución 1:2 de la sangre con la solución amortiguadora salina de bicarbonato (BBS, 0.9% NaCl y 5.3 mM NaHCO₃ a pH 7.5) a 4°C. De la dilución, 100 µL de sangre se fijo en metanol a -70°C, las muestras se almacenaron a -70°C por lo menos 24 h.

5.6 Marcaje de Reticulocitos con MN (Ret-MN)

Al momento del análisis las muestras se lavaron con 7 mL de BBS frío para eliminar el exceso de fijador y se centrifugo a 600 g por cinco minutos, posteriormente se recuperó el botón celular y se tomaron 20 µL del botón celular para tratar a las células simultáneamente con 1 mg de RNasa/mL y 5 µL de anti-IgG1-FITC como control de isotipo o anti-CD71 FITC (utilizado para marcar diferencialmente las células con alto contenido del receptor a transferrina).

Las células fueron incubadas a 4° C por 40 min y después a 22° C durante 90 min para asegurar la degradación completa del ARN celular. Se adicionaron 500 µL de BBS y se mantuvieron a 4° C, al momento del análisis se agregó la solución de yoduro de propidio frío (YP 75.0 µg/mL de BBS), para identificar a los Ret-MN.

5.7 Detección del cinetocoro en eritrocitos

Para determinar la presencia o ausencia de cinetocoro en los MN, después de marcar las células con CD71-FITC, estas se lavaron con 2 mL de BBS a 600 g/ 5 min a 4° C y se recuperó el botón celular. Posteriormente se incubó con 1 mL de tween al 0.1% por 5 min, se mezcló y se centrifugó a 600 g/ 5 min a 4° C. Al botón celular se le adicionaron 20 µL del anticuerpo anticinetocoro, diluido 1:20 con PBS al 0.2% de tween, se dejó 1 hora a temperatura ambiente.

Se realizó otro lavado con 1 mL de PBS, se recuperó el botón celular y se adicionó 50 µL de anticuerpo secundario (diluido 1:50 con agua) conjugado con el fluorocromo Cyt 5, este anticuerpo reconoce el anticuerpo anticinetocoro. Después de 1h de incubación, las

muestras se lavaron nuevamente con PBS, se adicionaron 500 μ L de BBS y se mantuvieron a 4° C hasta el análisis.

5.8 Detección del cinetocoro en linfocitos

Debido a que la técnica de detección del cinetocoro no ha sido utilizada para análisis con citometría de flujo, era importante verificar si los anticuerpos utilizados se estaban uniendo al cinetocoro y si realmente eran detectados por el citómetro de flujo. Para comprobar esto se realizó un ensayo en el cual se utilizaron células nucleadas, que obviamente contienen cromosomas con el complejo centrómero-precinetocoro.

Se utilizó 100 μ L de sangre completa y se incubó con 5 μ L de anticuerpo CD3 conjugado con FITC (contra los receptores expresados en los linfocitos T) durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 1 mL de solución de lisis para eliminar a los eritrocitos y se incubó por 10 min, posteriormente se centrifugó a 200 g durante 5 min.

Se procedió a realizar la misma metodología de marcaje de cinetocoro descrita para eritrocitos y finalmente se fijaron las células en 0.5 mL de paraformaldehído al 1 %.

5.9 Análisis de las muestras por CMF

Para la adquisición y análisis de las células, se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón de 488 nm de excitación, y el software Cell Quest para la adquisición y análisis de los datos.

Las células fueron adquiridas en un promedio de 8000 células por segundo, la frecuencia de reticulocitos fue determinado por el análisis de 500 000 células totales.

1) Información obtenida por la dispersión de la luz.

Se desplegaron gráficas de punto de Side Scatter (SSC, luz dispersada a 90 grados, la cual esta relacionada con la estructura interna y la complejidad citoplasmática de la célula) contra "Forward Scatter" (FSC, es la luz dispersada a cero grados y esta relacionado con el tamaño de la célula) (Figura 6). En estas gráficas se seleccionó la región de análisis (eritrocitos totales).

2) Información relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos.

Para poder distinguir las diferentes poblaciones de eritrocitos se analizaron: reticulocitos sin y con MN (Ret y Ret-MN), eritrocitos normocromáticos sin y con MN (Nor y Nor-MN). Para lo anterior se desplegaron gráficas de punto de la fluorescencia emitida por el anticuerpo CD71 conjugado con FITC contra la fluorescencia del YP (Figura 7).

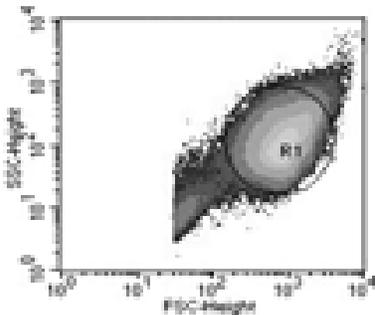


Figura 6. Gráfica de punto para seleccionar la región de eritrocitos. R1 es la región donde se localizan los eritrocitos, graficando granulosis (SSC) contra tamaño (FSC).

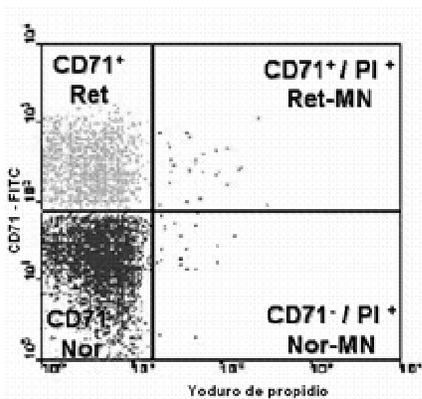


Figura 7. Gráfica de punto, donde se identificaron los diferentes tipos de eritrocitos. En la ventana superior izquierda se encuentran los eritrocitos inmaduros (reticulocitos, Ret), en la ventana superior derecha se encuentran los reticulocitos con Micronúcleo (Ret-MN), en la ventana inferior izquierda se encuentran los eritrocitos maduros (Normocromáticos, Nor) y en la ventana inferior derecha se encuentran los eritrocitos maduros con MN (Nor-MN).

De cada uno de los organismos estudiados se calcularon los porcentajes de reticulocitos (Ret), reticulocitos con micronúcleos (Ret-MN) y eritrocitos normocromáticos (maduros) con micronúcleo (Nor-MN), de acuerdo a la forma propuesta por los laboratorios "Litron" (Rochester, NY; Ortiz y col., 2004).

3) Evaluación del método realizado para marcar cinetocoro.

Se desplegaron gráficas de punto FSC contra SSC (Figura 8), en estas gráficas se seleccionó la región de análisis de las células nucleadas (linfocitos T), se desplegaron histogramas graficando el número de células contra la intensidad de fluorescencia de CD3-FITC (Figura 9). Finalmente para determinar la frecuencia de células nucleadas positivas al anticinetocoro, también se desplegaron histogramas, graficando el número de células contra la intensidad de fluorescencia de Cyt 5 (Figura 10).

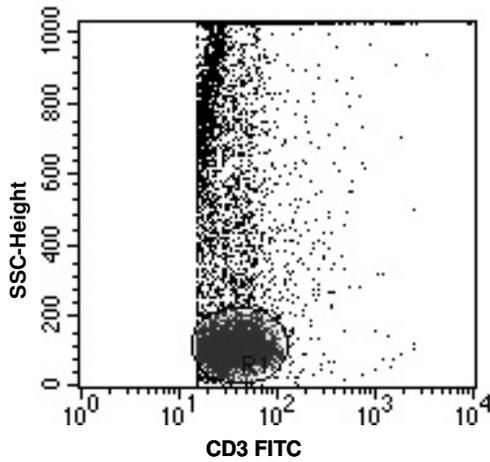


Figura 8. Gráfica de punto para seleccionar la región de linfocitos T. R1 es la región donde se localizan los linfocitos T, graficando granulosidad (SSC) contra Fluorescencia de CD3-FITC.

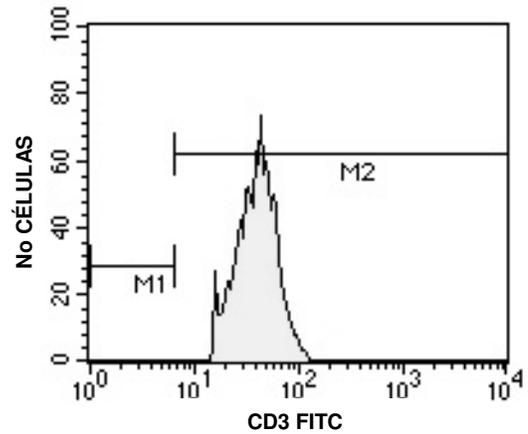


Figura 9. Histograma de fluorescencia, para determinar el porcentaje de linfocitos T en R1, graficando número de células contra intensidad de fluorescencia de CD3-FITC. En la marca 1 (M1) es la región donde se localizan células nucleadas negativas a CD3-FITC, y la M2 es la región de células CD3-FITC positivas.

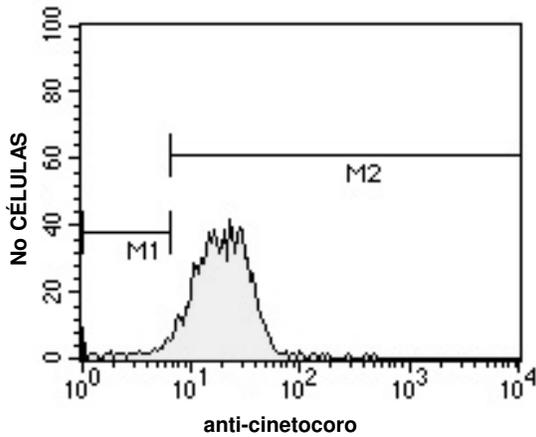


Figura 10. Histograma de fluorescencia, para determinar el porcentaje de linfocitos T con cinetocoro. Se grafico número de células contra intensidad de fluorescencia de anti-cinetocoro-Cyt5. En la marca 1 (M1) es la región donde se localizan células nucleadas negativas a Cyt5, y M2 es la región de células Cyt5 positivas.

5.10 Análisis estadístico de los resultados

a) Análisis estadístico de las curvas dosis respuesta.

Para cada curva dosis-respuesta se calculó la media y desviación estándar de la frecuencia de reticulocitos micronucleados (Ret-MN).

Se comparó la frecuencia de Ret-MN obtenida con las diferentes dosis, con el mismo tiempo de exposición por medio del análisis de varianza (ANOVA) y con la prueba de la diferencia significativa mínima de Fisher (DSM).

Posteriormente se comparó la frecuencia de Ret-MN producidos en los diferentes tiempos de exposición (24 y 48 h), con la misma dosis mediante una t-Student para 2 muestras independientes.

b) Análisis estadístico de los diferentes grupos tratados con los fármacos.

Para cada grupo de estudio se calculó la media y la desviación estándar de la frecuencia de reticulocitos (Ret), reticulocitos con micronúcleos (Ret-MN) y eritrocitos maduros con micronúcleos (Nor-MN).

Se comparó la frecuencia de Ret, Ret-MN y Nor-MN entre los grupos de ratas BN tratadas con los diferentes fármacos con una prueba de ANOVA y con la prueba de DSM. Este análisis también se realizó para los diferentes grupos de ratas DN tratadas con los fármacos. Finalmente se realizó la prueba de t-Student para comparar la frecuencia de Ret entre el grupo de ratas BN y de ratas DN con el mismo tratamiento, asimismo para la frecuencia de Ret-MN y Nor-MN. Esto se efectuó para cada uno de los diferentes tratamientos con los fármacos.

VI. RESULTADOS

6.1 Peso de las ratas

Se utilizaron 26 ratas bien nutridas (BN) y 17 desnutridas (DN) de 21 días de edad, las cuales fueron distribuidas en los diferentes grupos tratados con los fármacos. El peso promedio de las ratas BN y DN de un día de edad fue de 7.72 ± 0.25 g, al inducir la desnutrición experimentalmente por competencia de alimento; el peso promedio a los 21 días de edad de las ratas BN fue de 50.52 ± 2.87 g y el de las ratas DN que presentaron desnutrición de tercer grado fue 25.49 ± 2.57 g. El peso de las ratas DN fue significativamente menor que el de las ratas BN ($P \leq 0.05$).

6.2 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con PC

El peso de las ratas utilizadas para determinar la curva dosis-respuesta de PC fue de 51.8 ± 3.51 g. En la Tabla I se muestra el porcentaje de Ret-MN en ratas tratadas con PC durante 24 y 48 h, con las dosis de 160, 400 y 600 mg/kg de peso. La frecuencia promedio de Ret-MN basal fue de 0.025 % a las 24 h y de las diferentes dosis fueron: 0.145, 0.17 y 0.22% respectivamente; se determinó que existe diferencia significativa entre la frecuencia de Ret-MN producida con la diferentes dosis de PC (160, 400 y 600 mg/kg) en comparación con la frecuencia de Ret-MN basal ($P < 0.05$). La frecuencia de Ret-MN producida con las dosis de 160 y 400 mg/kg no presentó diferencia significativa. Sin embargo, ambas dosis fueron significativamente diferentes a la frecuencia de Ret-MN provocada con la dosis de 600 mg/kg de peso durante la exposición de 24 h ($P < 0.05$).

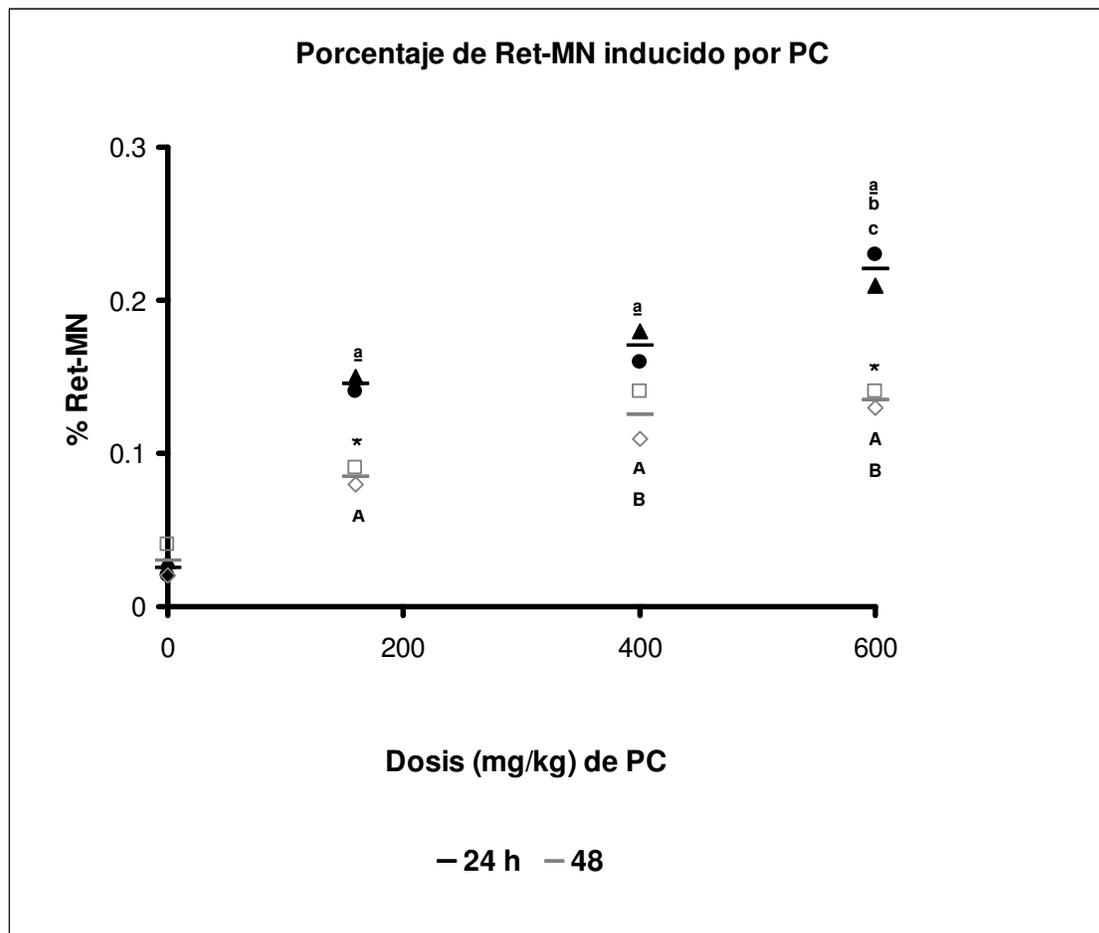
La frecuencia promedio de Ret-MN basal a las 48 h fue de 0.03% y para las diferentes dosis fue: 0.085, 0.125 y 0.135% respectivamente, se determinó que existe diferencia significativa entre la frecuencia de Ret-MN basal comparado con los producidos por las diferentes dosis de 160, 400 y 600 mg/kg de peso ($P < 0.05$). La frecuencia de Ret-MN de la dosis de 160 mg/kg presentó diferencia significativa con el porcentaje de Ret-MN inducidos por las dosis de 400 y 600 mg/kg ($P < 0.05$), mientras que la frecuencia de Ret-MN producidos por las dosis de 400 y 600 mg/kg no fueron significativamente diferentes.

Al comparar las medias de Ret-MN producidos por una misma dosis, pero con diferente tiempo de exposición (24 o 48 h), se determinó que no existe diferencia significativa en la

producción de Ret-MN basal, así como con la dosis de 400 mg/kg. Sin embargo la dosis de 400 mg/kg muestra una tendencia a incrementar la frecuencia de Ret-MN a 24 h. Las dosis de 160 y 600 mg/kg mostraron diferencia significativa entre las frecuencias de Ret-MN a 24 y 48 h, en ambos casos la frecuencia de Ret-MN fue mayor a 24 h ($P < 0.05$).

Tabla I. Curva dosis-respuesta del PC en la frecuencia de Ret-MN.		
PC Dosis (mg/kg)	% Ret-MN 24h	% Ret-MN 48h
0	0.03 0.02	0.02 0.04
Media	0.025 ± 0.007	0.03 ± 0.014
160	0.15 0.14	0.08 0.09
Media	0.145 ± 0.007	0.085 ± 0.007
400	0.18 0.16	0.11 0.14
Media	0.17 ± 0.014	0.125 ± 0.021
600	0.21 0.23	0.13 0.14
Media	0.22 ± 0.014	0.135 ± 0.007

En la Gráfica I se observa que el comportamiento en la producción de Ret-MN es dosis dependiente en ambos tiempos de exposición y que la producción de Ret-MN tiende a ser mayor a 24 h. Por lo que se eligió la dosis de 400 mg/kg de peso durante 24 h para el tratamiento posterior de ratas BN y DN. Además, esta dosis está dentro del intervalo de dosis terapéutica de PC.



Gráfica I. Efecto de PC sobre la frecuencia de Ret-MN, en sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad tratadas con diferentes dosis y tiempos de exposición.

^a P<0.05 vs. Frecuencia basal de Ret-MN a 24 h;

^b P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducida con la dosis de 160 mg/kg a 24 h;

^c P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducida con 400 mg/kg a 24 h

^A P<0.05 vs. Frecuencia basal de Ret-MN a 48 h

^B P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducida con 160 mg/kg a 48 h

* P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducida a 24 h

6.3 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con TMP-SMX

El peso promedio de las ratas BN utilizadas para determinar la curva dosis respuesta de TMP-SMX fue de 56.63 ± 5.89 g, el porcentaje de MN producido por las diferentes dosis y en ambos tiempos de exposición se muestran en la Tabla II y Gráfica II.

En la Tabla II se indica la frecuencia de Ret-MN de ratas BN tratadas con TMP-SMX a 8-40, 80-400 y 160-800 mg/kg con 24 h de exposición. La frecuencia basal de Ret-MN fue 0.015%,

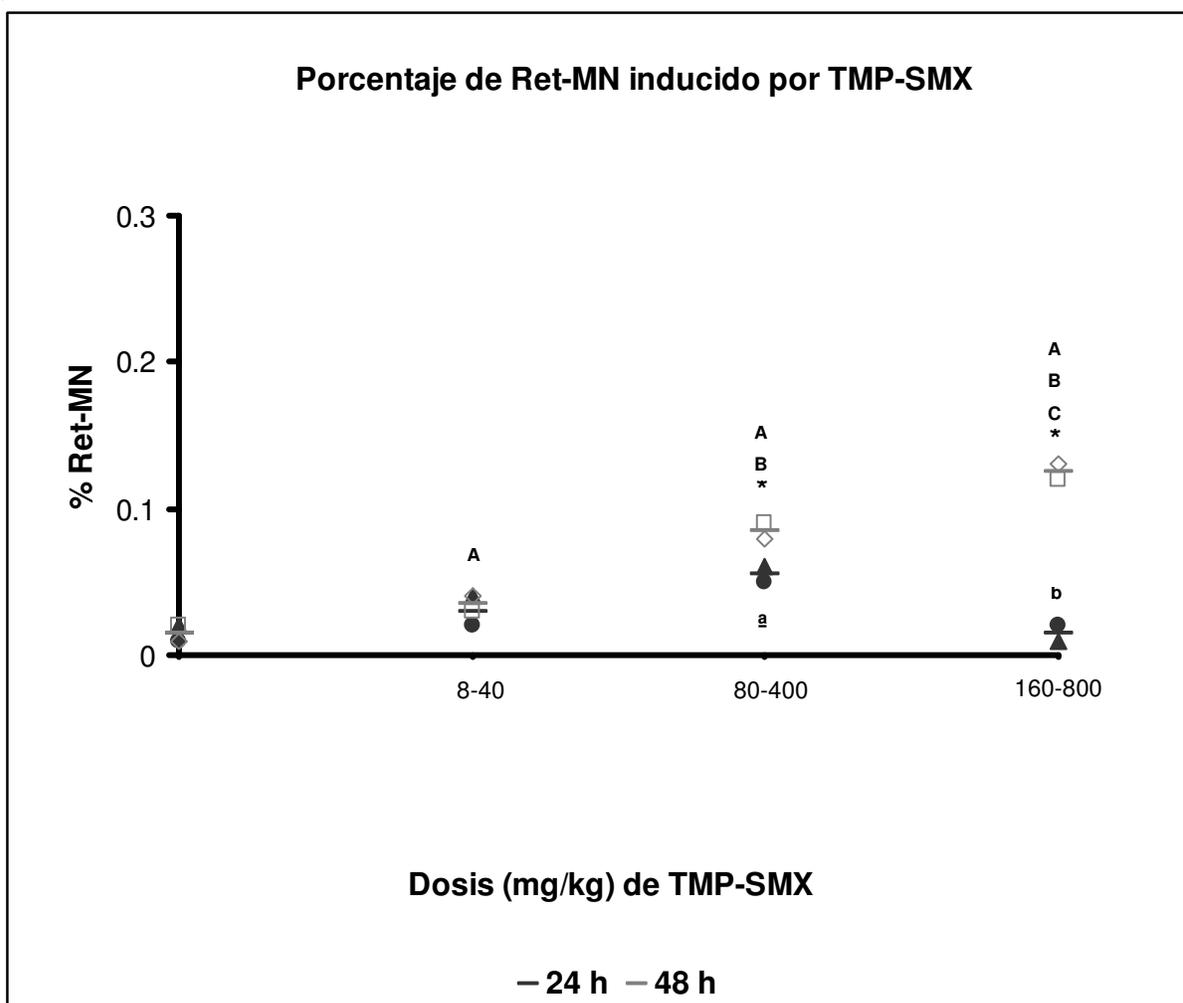
mientras que las frecuencias obtenidas por las diferentes dosis fueron: 0.03, 0.055 y 0.015% respectivamente. La dosis de 80-400 mg/kg indujo mayor frecuencia de Ret-MN a 24 h y mostró diferencia significativa con la frecuencia de Ret-MN basal y con la dosis de 160-800 mg/kg de peso ($P < 0.05$ en ambos casos).

Tabla II. Curva dosis-respuesta del TMP-SMX en la frecuencia de Ret-MN.		
TMP-SMX Dosis (mg/kg)	% Ret-MN 24h	% Ret-MN 48h
0	0.01 0.02	0.02 0.01
Media	0.015 ± 0.007	0.015 ± 0.007
8-40	0.02 0.04	0.03 0.04
Media	0.030 ± 0.014	0.035 ± 0.007
80-400	0.05 0.06	0.09 0.08
Media	0.055 ± 0.007	0.085 ± 0.007
160-800	0.02 0.01	0.12 0.13
Media	0.015 ± 0.007	0.125 ± 0.007

La frecuencia promedio de Ret-MN basal a las 48 h fue 0.015% y de las diferentes dosis de TMP-SMX fue: 0.035, 0.085 y 0.125%. La frecuencia basal de Ret-MN presenta diferencia significativa con las otras tres dosis ($P < 0.05$), del mismo modo la dosis de 8-40 mg/kg es significativamente diferente a las dosis de 80-400 y 160-800 mg/kg ($P < 0.05$). Así mismo la dosis de 80-400 presenta diferencia significativa con la de 160-800 mg/kg ($P < 0.05$).

Al comparar las frecuencias de Ret-MN producida con la misma dosis pero a diferente tiempo de exposición, se observó que la dosis de 80-400 mg/kg presenta diferencia significativa entre 24 y 48h ($P < 0.05$), siendo mayor a 48 h. También se encontró mayor frecuencia de Ret-MN a 48h a la dosis de 160-800 mg/kg de peso que es significativamente mayor que la frecuencia de Ret-MN a las 24h.

En la Gráfica II se observa que la inducción de Ret-MN es dependiente de la exposición al fármaco y en el caso de 48 h también se observa que es dosis dependiente. La dosis que se eligió para los posteriores tratamientos de ratas BN y DN fue 80-400 mg/kg de peso durante 48 h, está dosis se encuentra en el intervalo de dosis terapéutica.



Gráfica II. Efecto de TMP-SMX sobre la frecuencia de Ret-MN, de sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad tratadas con diferentes dosis y tiempos de exposición.

^a P<0.05 vs. Frecuencia basal de Ret-MN a 24 h;

^b P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducida con 80-400 mg/kg a 24 h;

^A P<0.05 vs. Frecuencia basal de Ret-MN a 48 h;

^B P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducida con 8-40 mg/kg a 48 h;

^C P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducida con 80-400 mg/kg a 48 h;

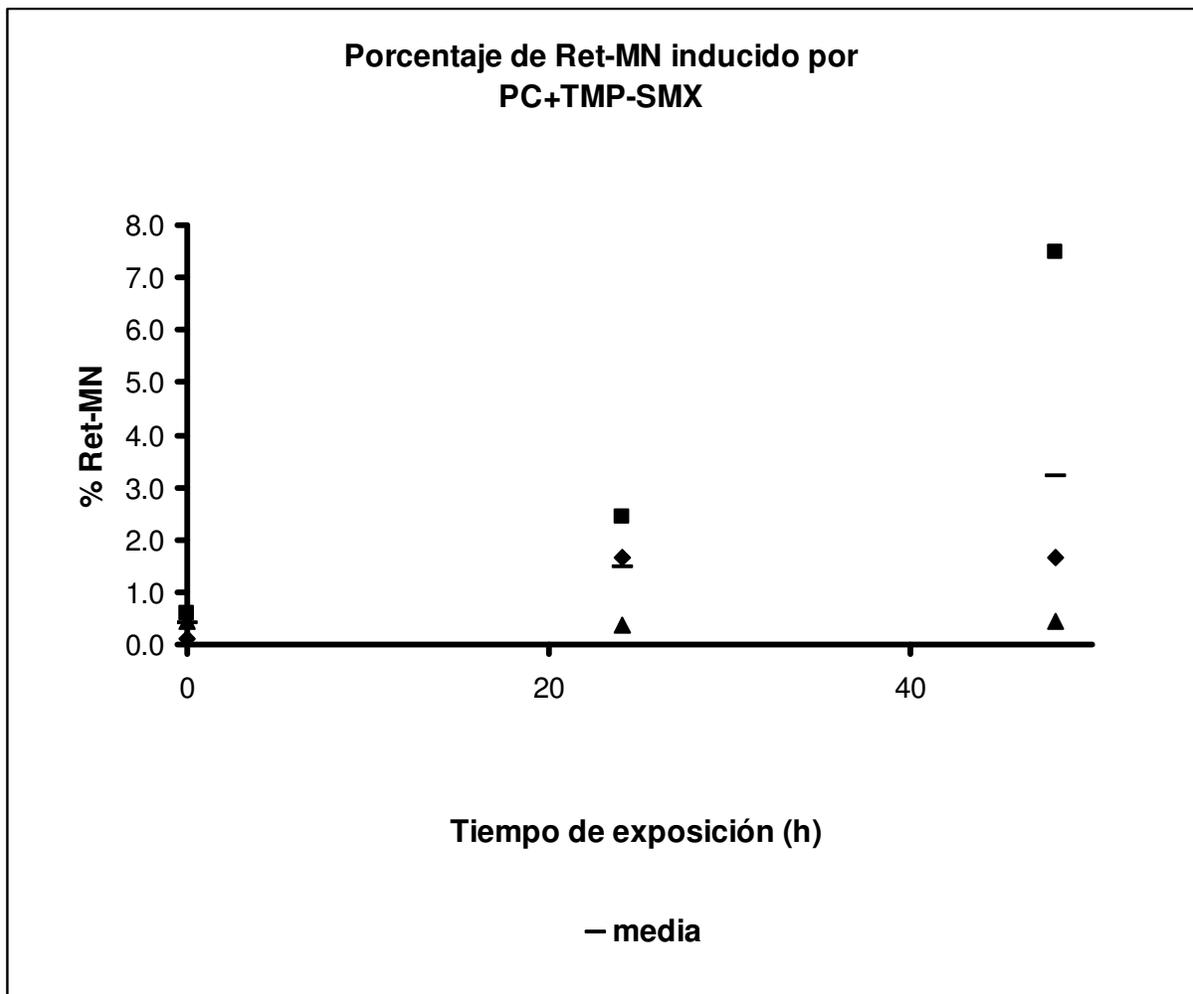
* P<0.05 vs. 24 h; es menor la frecuencia de Ret-MN a 24h (P<0.05).

6.4 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con PC + TMP-SMX

El peso promedio de las ratas BN utilizadas para determinar la curva dosis respuesta de PC + TMP-SMX fue de 51.55 ± 1.35 g. El porcentaje de MN producido por las diferentes dosis y en ambos tiempos de exposición se muestra en la Tabla III y Gráfica III.

Tabla III. Efecto de PC + TMP-SMX sobre la frecuencia de Ret-MN en diferentes tiempos.			
PC+TMP-SMX Dosis (mg/kg)	% Ret-MN 0 h	% Ret-MN 24h	% Ret-MN 48h
400 + 80-400	0.45	1.65	1.67
	0.61	2.42	7.47
	0.12	0.36	0.45
	0.45		
Media	0.41 ± 0.21	1.48 ± 1.04	3.20 ± 4.96

Con las dosis seleccionadas en las curvas dosis respuesta de PC y TMP-SMX (400 y 80-400 mg/kg, respectivamente) se administraron ambos fármacos a 24 y 48 h de exposición. La frecuencia de Ret-MN basal fue 0.41%, para las 24 y 48 h de exposición fue de 1.48 y 3.2% respectivamente. Con el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre los diferentes tiempos de exposición. En la Gráfica III se observa que la frecuencia de Ret-MN tiende a ser mayor a 48 h de exposición, por lo que este tiempo de exposición se selecciono para los ensayos con ratas BN y DN tratadas con PC + TMP-SMX.



Gráfica III. Efecto de PC + TMP-SMX (dosis 400 + 80 – 400 mg/kg) sobre la frecuencia de Ret-MN, de sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad, durante 24 y 48 h de exposición. No hubo diferencia significativa entre los tiempos de exposición a los fármacos.

6.5 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con COL

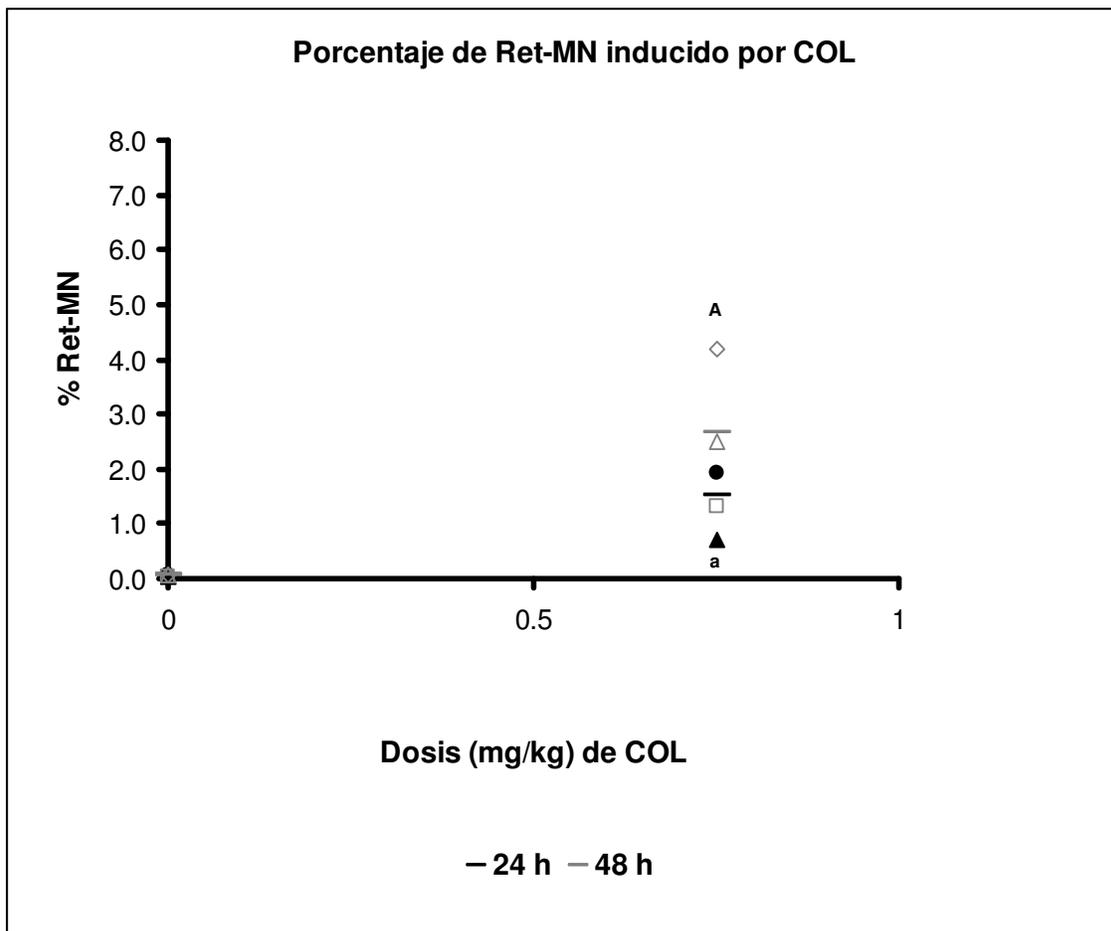
El peso promedio de las ratas BN utilizadas para determinar la curva dosis respuesta de COL fue de 50.25 ± 3.02 g, el porcentaje de MN producido por las diferentes dosis y en ambos tiempos de exposición se muestra en la Tabla IV y Gráfica IV.

Para determinar la curva dosis-respuesta de COL se utilizaron dosis de 0.75 y 1.00 mg/kg, sin embargo, las ratas tratadas con 1.00 mg/kg murieron. La frecuencia basal de Ret-MN fue significativamente menor (0.07%, $P < 0.05$) que la inducida por la dosis de 0.75 mg/kg (1.53%)

a 24h de exposición. También a 48h de exposición la frecuencia de Ret-MN basal fue menor (0.063%, $P < 0.05$) en comparación con la dosis de 0.75 mg/kg (2.66%).

Al comparar la frecuencia promedio de Ret-MN inducidos a 0.75 mg/kg durante 24 y 48 h no hubo diferencia significativa entre la frecuencia de Ret-MN en ambos tiempos. Sin embargo como puede observarse en la Gráfica IV, hay una tendencia de incrementar los Ret-MN a 48 h, lo que indica que la inducción de Ret-MN es dependiente del tiempo de exposición, por lo tanto se eligió la dosis de 0.75 mg/kg de peso durante 48 h de exposición para los ensayos de ratas BN y DN. Este agente se utilizó como control positivo en la evaluación de la producción de MN de origen aneugénico.

Tabla IV. Curva dosis-respuesta de COL en la frecuencia de Ret-MN		
COL Dosis (mg/kg)	% Ret-MN 24h	% Ret-MN 48h
0	0.08	0.06
	0.08	0.08
	0.05	0.05
Media	0.070 ± 0.017	0.063 ± 0.015
0.75	0.75	2.49
	1.96	4.20
	1.92	1.31
	0.72	
Media	1.53 ± 0.70	2.66 ± 1.45



Gráfica IV. Efecto de la COL sobre la frecuencia de Ret-MN, de sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad tratadas con 0.75 mg/kg de peso durante 24 y 48 h de exposición.

^a P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN basal a 24 h;

^A P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN basal a 48 h.

6.6 Curva dosis-respuesta con el tratamiento con MMC

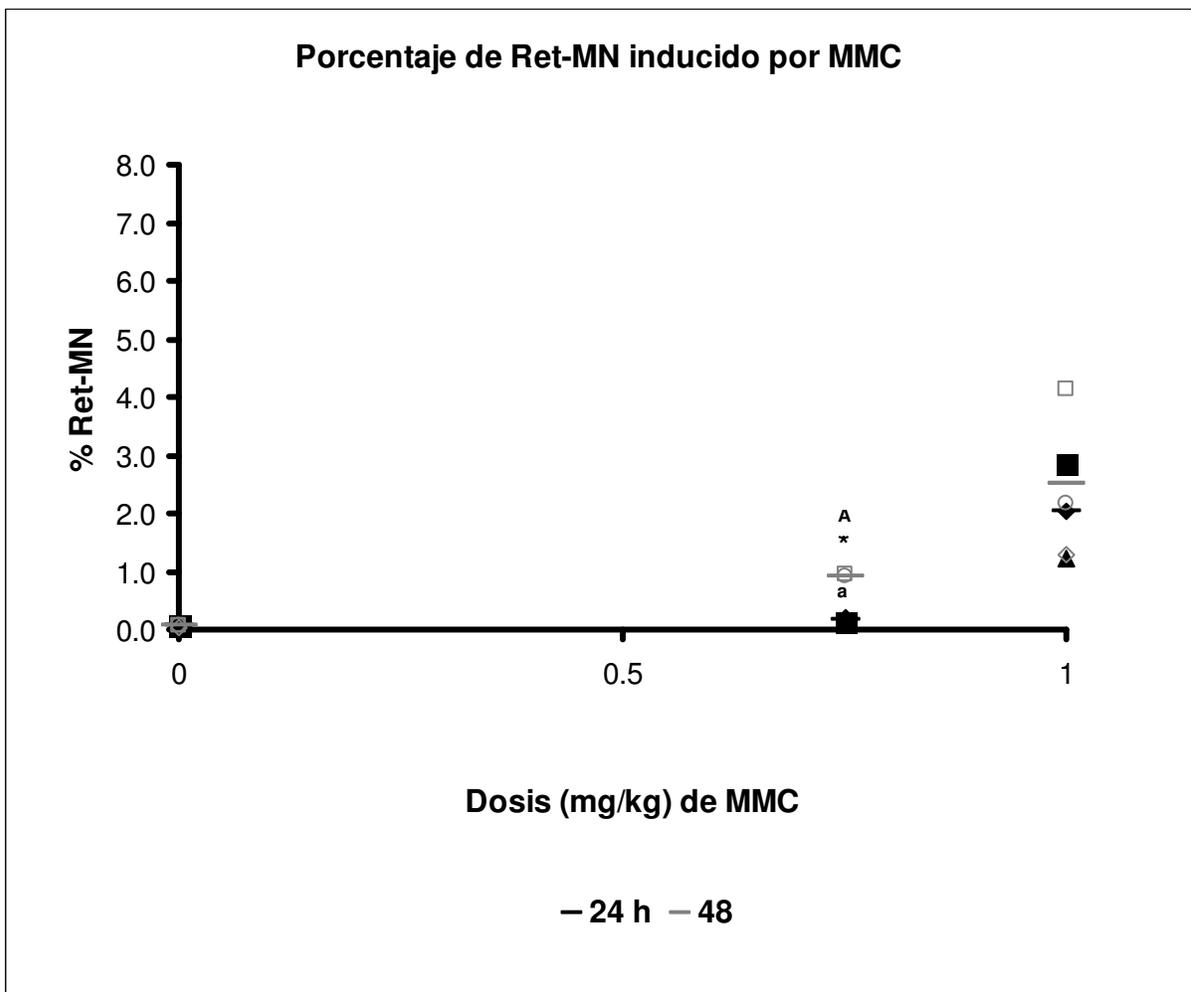
El peso promedio de las ratas BN utilizadas para determinar la curva dosis respuesta de MMC fue de 49.95 ± 3.79 g, el porcentaje de MN producido por las diferentes dosis y en ambos tiempos de exposición se muestra en la Tabla V y Gráfica V.

Las dosis que se utilizaron fueron 0.75 y 1.0 mg/kg de peso durante 24 y 48 h de exposición al agente. La frecuencia basal promedio de Ret-MN fue 0.07% y para las diferentes dosis durante 24 h de exposición fue 0.18 y 0.93% respectivamente, existió diferencia significativa entre el porcentaje basal de reticulocitos con MN y el observado a la dosis de 1.00 mg/kg de

peso ($P < 0.05$). Con respecto a la exposición durante 48 h, se observó diferencia significativa entre la frecuencia de Ret-MN basal (0.06%) y el tratamiento con MMC a 0.75mg/kg (2.04%) y 1.0mg/kg (2.52%).

Al comparar las frecuencias promedio de Ret-MN producidas por la misma dosis de MMC a diferente tiempo de exposición, se determinó que la dosis de 0.75 mg/kg presenta diferencia significativa entre ambos tiempos de exposición ($P < 0.05$). En la Gráfica V se observa que la frecuencia de Ret-MN es mayor a 48 h, la cual es dependiente de la dosis y tiempo de exposición al fármaco; por lo que se eligió la dosis de 0.75 mg/kg por 48 h para los ensayos con ratas BN y DN. Este agente fue utilizado como control positivo en la inducción de MN de origen clastogénico.

Tabla V. Curva dosis-respuesta de MMC en la frecuencia de Ret-MN		
MMC Dosis (mg/kg)	% Ret-MN 24h	% Ret-MN 48h
0	0.08	0.06
	0.08	0.08
	0.05	0.05
Media	0.07 ± 0.017	0.06 ± 0.015
0.75	0.21	2.02
	0.15	2.86
		1.24
Media	0.18 ± 0.04	2.04 ± 0.81
1.00	0.95	4.14
	0.91	2.16
		1.27
Media	0.93 ± 0.03	2.52 ± 1.47



Gráfica V. Efecto de MMC sobre la frecuencia de Ret-MN de sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad tratadas con 0.0, 0.75 y 1.0 mg/kg de peso durante 24 y 48 h de exposición.

^a P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducidos con 1.0 mg/kg a 24 h;

^A P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducidos con 1.0 mg/kg a 48 h;

* P<0.05 vs. Frecuencia de Ret-MN inducidos a 24 h; es menor la frecuencia de Ret-MN a 24h.

6.7 Evaluación de la frecuencia de Ret, Ret-MN y Nor-MN con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas

En el Tabla VI se muestran los pesos de las ratas BN y en la VII los de las DN a los 21 días de edad distribuidas en los diferentes grupos de tratamiento.

Mediante el análisis con citometría de flujo de 500 000 eritrocitos de sangre periférica, se determinó el porcentaje de reticulocitos (Ret), reticulocitos micronucleados (Ret-MN) y de eritrocitos normocromáticos micronucleados (Nor-MN) de cada uno de los grupos. En la Tabla VIII se presenta el porcentaje de Ret, Ret-MN y Nor-MN de ratas BN y DN.

Tabla VI. Peso de las ratas Bien Nutridas a los 21 días de edad.					
Peso (g) de los diferentes tratamientos					
RATA	BN	BN PC	BN TMP-SMX	BN PC+TMP-SMX	BN COL
1	53.8	53.7	51.8	51.4	52.5
2	52.8	52.3	49.5	51.9	50.3
3	52.8	51.5	51.4	49.4	49.7
4	59.6	53.0	52.3	47.0	52.3
5	51.2	48.6	50.0	46.4	
6	48.3				
7	49.6				
Media	52.5 ± 3.6	51.8 ± 1.9	51.0 ± 1.2	49.2 ± 2.4	51.2 ± 1.4

BN: bien nutridas

BN TMP-SMX: bien nutridas tratadas con Trimetoprim-Sulfametoxazol

BN PC: bien nutridas tratadas con Paracetamol

BN PC+TMP-SMX: bien nutridas tratadas con Paracetamol y Trimetoprim-Sulfametoxazol

BN COL: bien nutridas tratadas con Colchicina

BN MMC: bien nutridas tratadas con Mitomicina C

Tabla VII. Peso de las ratas Desnutridas a los 21 días de edad.				
Peso (g) de los diferentes tratamientos				
RATA	DN	DN PC	DN TMP-SMX	DN COL
1	22.3	22.9	23.3	26.2
2	27.6	28.2	28.1	22.6
3	26.6	27.7	27.9	
4	28.4	24.6	27.3	
5	22.7	20.5	22.5	
Media	25.5 ± 2.8	24.8 ± 3.2	25.8 ± 2.7	24.4 ± 2.5

DN: desnutridas

DN TMP-SMX: desnutridas tratadas con Trimetoprim-Sulfametoxazol

DN PC: desnutridas tratadas con Paracetamol

DN PC+TMP-SMX: desnutridas tratadas con Paracetamol y Trimetoprim-Sulfametoxazol

DN COL: desnutridas tratadas con Colchicina

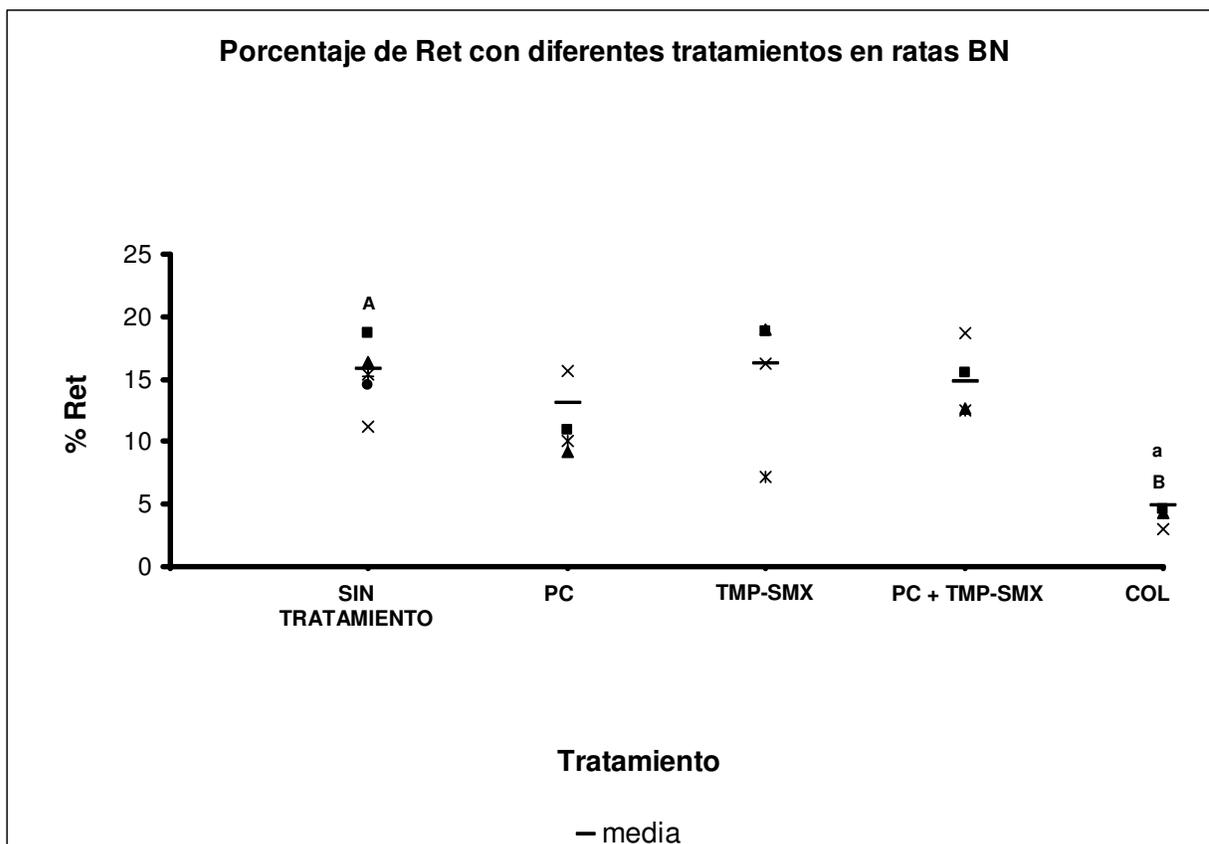
DN MMC: desnutridas tratadas con Mitomicina C

Tabla VIII. Efecto de PC, TMP-SMX y COL sobre la frecuencia de reticulocitos (Ret), reticulocitos micronucleados (Ret-MN) y eritrocitos normocromáticos micronucleados (Nor-MN), en sangre periférica de ratas bien nutridas y desnutridas

TRATAMIENTO	Bien Nutridas			Desnutridas			
	Dosis mg/kg	%Ret	%Ret-MN	%Nor-MN	%Ret	%Ret-MN	%Nor-MN-
0		19.07	0.33	0.08	13.05	0.91	0.44
		18.68	0.26	0.06	8.37	0.45	0.48
		16.42	0.36	0.06	8.56	1.37	0.64
		11.19	0.36	0.16	8.30	1.04	0.48
		15.31	0.46	0.25	8.17	0.73	0.40
		14.50	0.35	0.09			
		15.28	0.19	0.25			
Media	15.78 ±2.6	0.33±0.09	0.14±0.09	9.29±2.1	0.90±0.34	0.49±0.09	
PC 400		19.42	0.65	0.39	22.6	0.86	0.80
		10.87	0.47	0.70	15.21	1.17	0.96
		9.13	0.86	0.50	18.36	0.97	0.84
		15.72	0.85	0.68	16.05	1.10	0.56
		9.99	0.47	0.71	9.18	1.04	0.56
Media	13.03 ±4.39	0.66±0.19	0.60±0.14	16.28 ±4.90	1.03±0.12	0.74±0.18	
TMP-SMX 80-400		19.64	1.09	0.82	15.23	2.03	0.91
		18.89	1.50	0.58	18.27	1.76	1.07
		18.96	1.19	1.00	17.98	1.65	0.96
		16.20	1.37	0.78	4.52	1.73	0.74
		7.20	1.24	0.97	6.30	1.78	0.92
Media	16.18 ±5.19	1.28±0.16	0.83±0.17	12.46 ±6.57	1.79±0.14	0.92±0.12	
PC + TMP-SMX 400 + 80-400		14.63	1.15	1.54			
		15.56	1.32	0.77			
		12.63	1.04	1.59	ND	ND	ND
		18.74	1.32	1.36			
		12.51	1.09	1.67			
Media	14.82 ±2.55	1.18±0.13	1.39±0.36				
COL 0.75		7.83	1.65	0.14	11.05	4.71	1.50
		4.54	1.96	0.25	9.54	1.04	3.77
		4.24	1.44	0.18			
		3.03	1.89	0.33			
Media	4.91 ±2.05	1.74±0.24	0.23±0.08	10.30 ±1.07	2.88±2.60	2.64±1.60	

ND: No determinado

La frecuencia promedio de Ret basal, es decir en las ratas BN sin tratamiento, fue de $15.78 \pm 2.67\%$, para las ratas BN tratadas con PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL fue de $13.03 \pm 4.39\%$, $16.18 \pm 5.19\%$, $14.82 \pm 2.55\%$ y $4.91 \pm 2.05\%$, respectivamente. Como se observa en la Gráfica VI la frecuencia de Ret es significativamente menor en el grupo de ratas BN tratadas con COL, comparada con los diferentes grupos de ratas BN ($p < 0.05$).



Gráfica VI. Porcentaje de Reticulocitos (Ret) en sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, PC +TMP-SMX y COL.

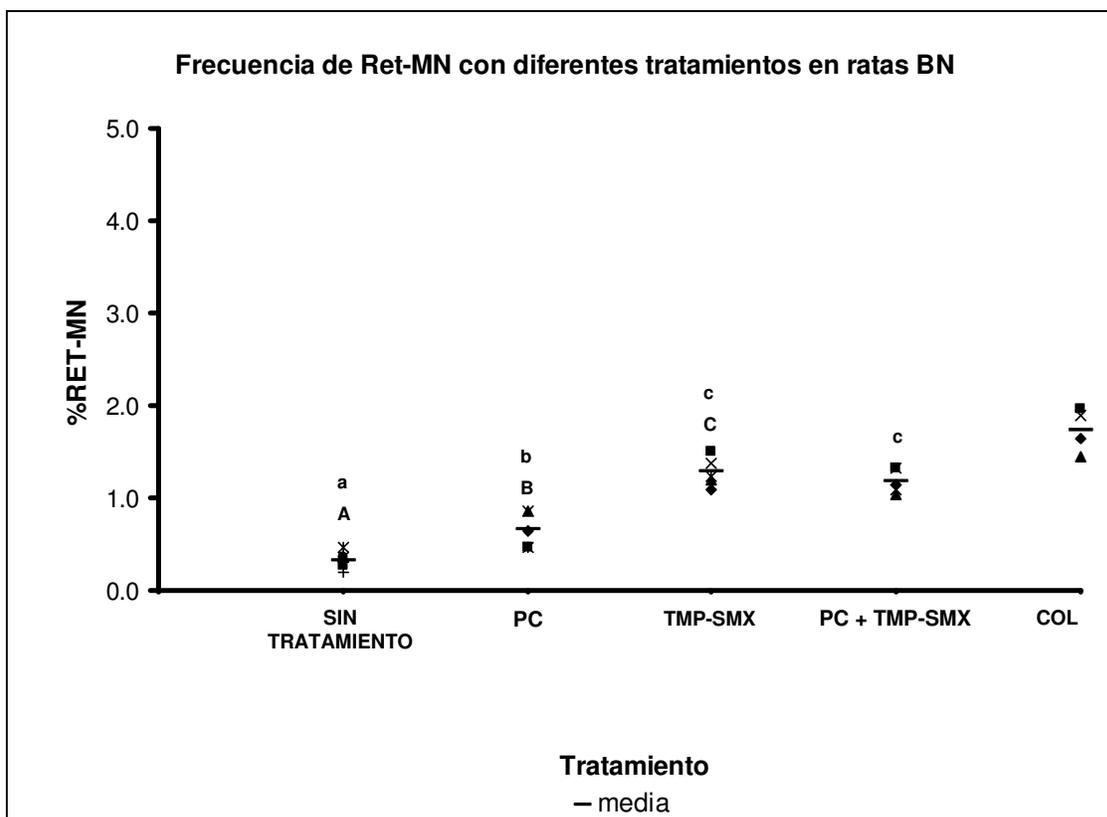
^a $P < 0.05$ vs. grupos sin tratamiento, PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX;

^A $P < 0.05$ vs. grupo de ratas DN sin tratamiento, menor %Ret en ratas DN;

^B $P < 0.05$ vs. grupo de ratas DN COL, mayor %Ret en ratas DN.

La frecuencia promedio de Ret-MN en las ratas BN: testigo, PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL fue de $0.33 \pm 0.09\%$, $0.66 \pm 0.19\%$, $1.28 \pm 0.16\%$, $1.18 \pm 0.13\%$ y $1.74 \pm 0.24\%$, respectivamente. En la Gráfica VII, se observa que existe diferencia significativa entre el grupo de ratas BN testigo y las ratas BN tratadas con PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL ($P < 0.05$). Así como las ratas BN PC presentaron diferencia significativa con las ratas BN tratadas con TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL ($P < 0.05$). De igual forma los porcentajes de

Ret-MN en el grupo de las ratas BN tratadas con TMP-SMX y PC + TMP-SMX son significativamente menores que en el grupo de ratas BN tratadas con COL ($P < 0.05$).



Gráfica VII. Porcentaje de reticulocitos micronucleados (Ret-MN) en sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, PC +TMP-SMX y COL.

^a $P < 0.05$ vs. grupos PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL;

^b $P < 0.05$ vs. grupos TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL;

^c $P < 0.05$ vs. grupo COL;

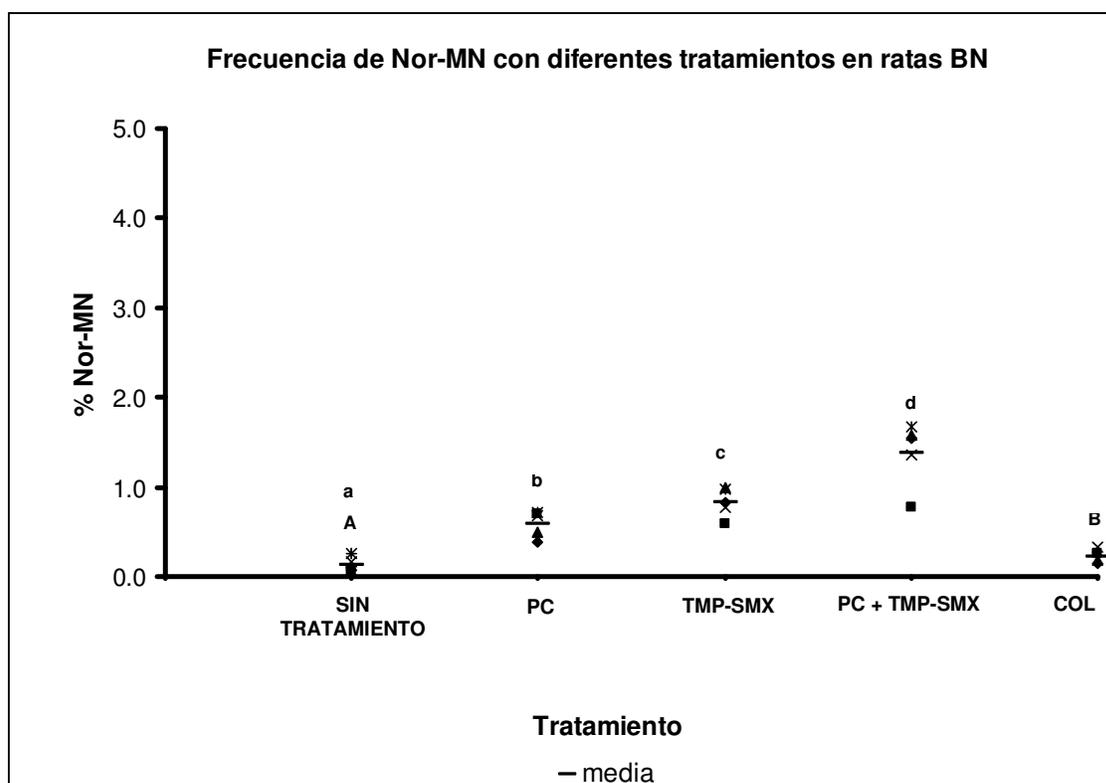
^A $P < 0.05$ vs. ratas DN sin tratamiento, mayor %Ret-MN en ratas DN;

^B $P < 0.05$ vs. ratas DN PC, mayor %Ret-MN en ratas DN;

^C $P < 0.05$ vs. ratas DN TMP-SMX, mayor %Ret-MN en ratas DN.

La frecuencia de Nor-MN fue de $0.14 \pm 0.09\%$ para las ratas BN testigo, $0.60 \pm 0.14\%$ en ratas BN tratadas con PC, $0.83 \pm 0.17\%$ tratadas con TMP-SMX, $1.39 \pm 0.36\%$ tratadas con PC + TMP-SMX y $0.23 \pm 0.08\%$ para las expuestas a COL. En la Gráfica VIII se observa que existe diferencia significativa en la población de Nor-MN del grupo de ratas BN testigo comparada con las ratas BN tratadas con PC, TMP-SMX y PC + TMP-SMX ($P < 0.05$). También hay diferencia significativa entre las ratas BN tratadas con PC y las tratadas con TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL ($P < 0.05$). Asimismo el grupo de ratas BN TMP-SMX presentan diferencia significativa con los grupo de ratas BN tratadas con PC + TMP-SMX y COL ($P < 0.05$), por

otra parte el grupo de ratas BN PC + TMP-SMX presenta diferencia significativa con el grupo de ratas BN tratadas con COL ($P < 0.05$).



Gráfica VIII. Porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados (Nor-MN) en sangre periférica de ratas BN de 21 días de edad sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, PC +TMP-SMX y COL.

^a $P < 0.05$ vs. grupos PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX,

^b $P < 0.05$ vs. grupos TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL,

^c $P < 0.05$ vs. grupos de PC + TMP-SMX y COL,

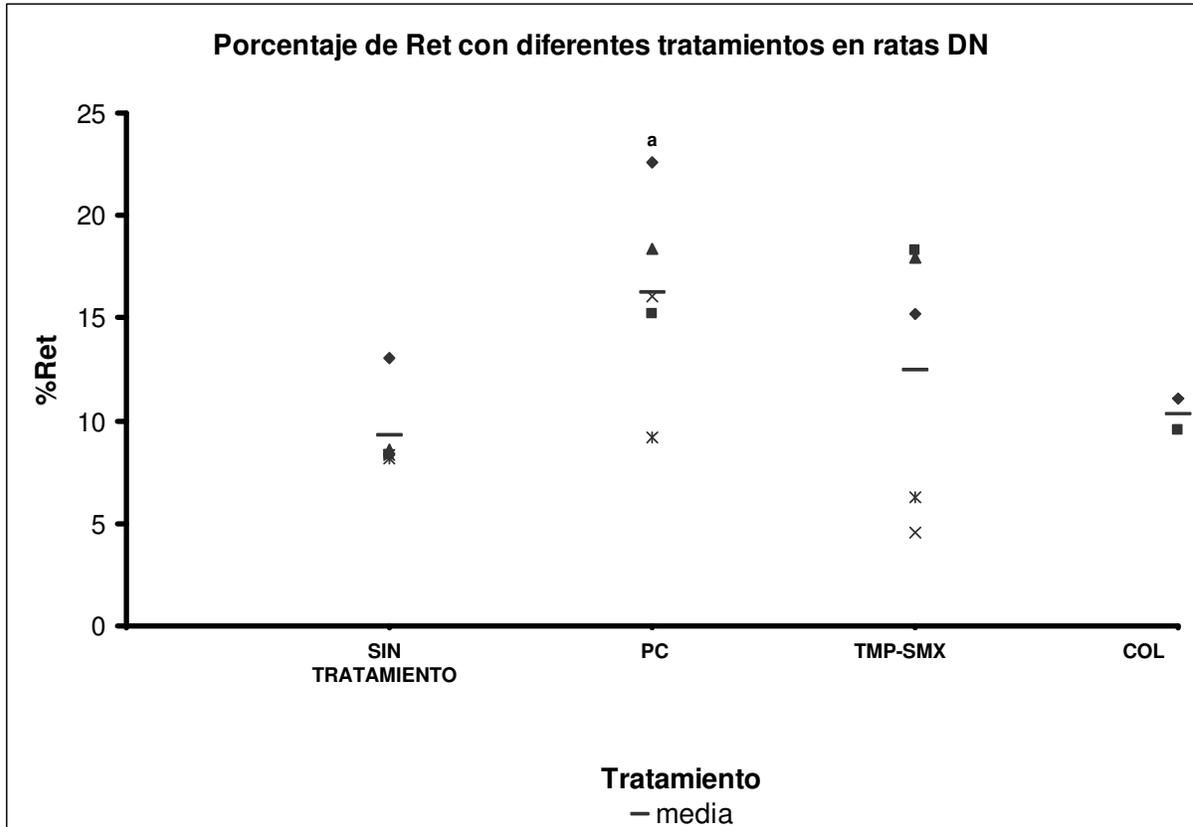
^d $P < 0.05$ vs. grupo de COL,

^A $P < 0.05$ vs. ratas DN sin tratamiento, mayor %Nor-MN en ratas DN,

^B $P < 0.05$ vs. ratas DN COL, mayor %Nor-MN en ratas DN.

Cuando se analizaron las poblaciones de Ret, Ret-MN y Nor-MN en las ratas DN con los diferentes tratamientos, el porcentaje basal de Ret en las ratas DN sin tratamiento fue de $9.29 \pm 2.11\%$, en las tratadas con PC fue de $16.28 \pm 4.9\%$, en el caso de las ratas tratadas con TMP-SMX fue $12.46 \pm 6.57\%$ y en las expuestas a COL fue de $10.30 \pm 1.07\%$. En la Gráfica IX se representa los valores obtenidos para cada tratamiento en ratas DN, se observa que la frecuencia de Ret fue significativamente mayor en las ratas DN tratadas con PC con respecto

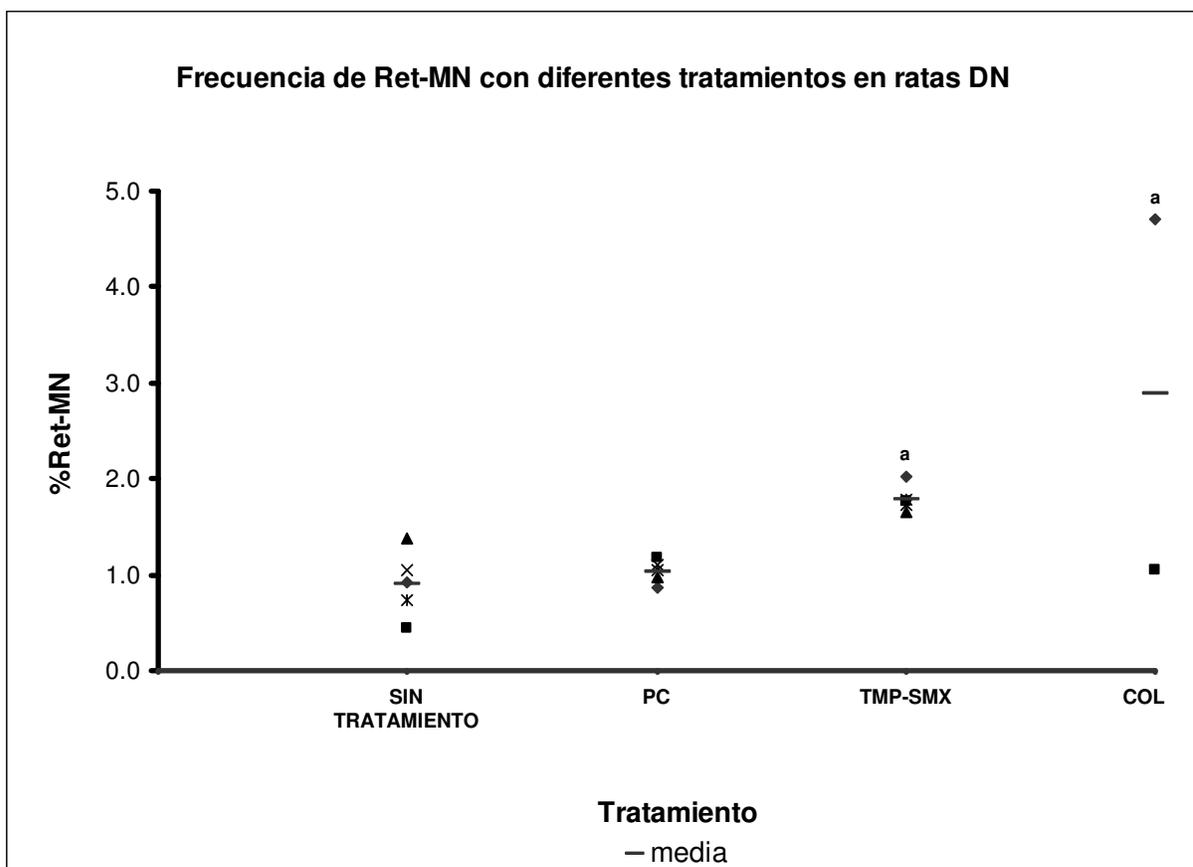
al grupo de ratas DN testigo ($p < 0.05$). No hubo diferencia significativa entre los demás grupos.



Gráfica IX. Porcentaje de Reticulocitos (Ret) en sangre periférica de ratas DN de 21 días de edad, sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX y COL.

^a $P < 0.05$ vs. grupo sin tratamiento o basal.

El porcentaje de Ret-MN en ratas DN testigo fue de $0.90 \pm 0.34\%$, para las tratadas con PC fue de $1.03 \pm 0.12\%$, con TMP-SMX $1.79 \pm 0.14\%$ y con COL fue $2.88 \pm 2.60\%$. Existe diferencia significativa entre la frecuencia de Ret-MN de las ratas DN testigos y DN tratadas con TMP-SMX y COL ($P < 0.05$), las ratas tratadas con PC presentaron diferencia significativa con las ratas tratadas con TMP-SMX y COL ($P < 0.05$). A pesar de que en el grupo de ratas DN tratadas con PC se observó mayor porcentaje de Ret-MN que en el grupo de ratas DN testigo, no existe diferencia significativa (Gráfica X).

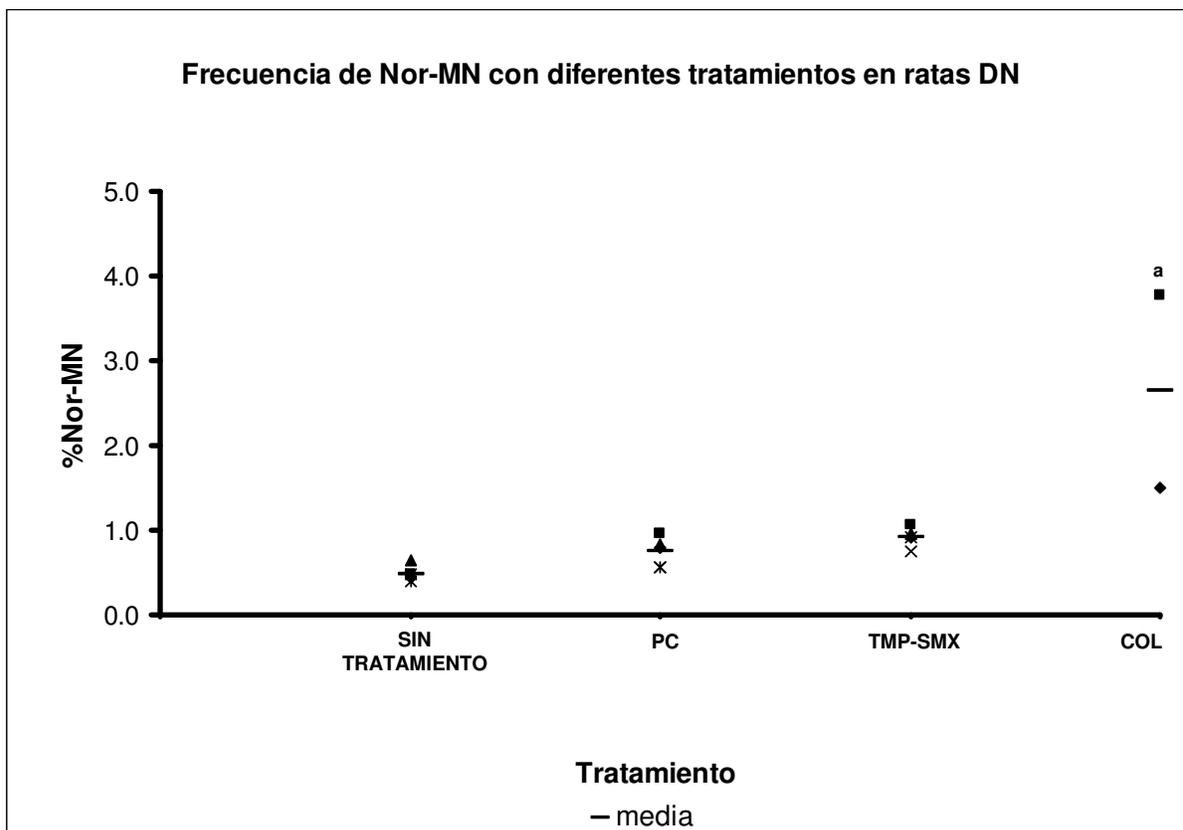


Gráfica X. Porcentaje de reticulocitos micronucleados (Ret-MN) en sangre periférica de ratas DN de 21 días de edad sin tratamiento o basal y tratadas con PC, TMP-SMX y COL.

^a $P < 0.05$ vs. grupo sin tratamiento y grupo con PC.

Con respecto al porcentaje de Nor-MN en ratas DN, se observó que las ratas sin tratamiento presentaron $0.49 \pm 0.09\%$, las tratadas con PC $0.74 \pm 0.18\%$, TMP-SMX $0.92 \pm 0.12\%$ y las expuestas a COL $2.64 \pm 1.60\%$. El grupo de las ratas tratadas con COL presentaron diferencia

significativa con los grupos de ratas DN testigo, PC y TMP-SMX ($P < 0.05$), como se observa en la Gráfica XI.



Gráfica XI. Porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados (Nor-MN) en sangre periférica de ratas DN de 21 días de edad, sin tratamiento y tratadas con PC, TMP-SMX, y COL.

^a $P < 0.05$ vs. grupos sin tratamiento y grupos con PC y TMP-SMX.

Cuando se compara la frecuencia promedio de Ret, Ret-MN y Nor-MN entre ratas BN y DN con el mismo tratamiento, se observa que el porcentaje de Ret en las ratas BN es significativamente mayor ($15.78 \pm 2.67\%$) con respecto a las DN ($9.29 \pm 2.11\%$, $P < 0.05$) (Gráfica VI y IX). Del mismo modo la frecuencia Ret-MN es mayor en las ratas DN ($0.90 \pm 0.34\%$) que en las ratas BN ($0.33 \pm 0.09\%$, $P < 0.05$), como se observa en la Gráfica VII y X. Finalmente al comparar la frecuencia de Nor-MN (Gráfica VIII y XI), se observa que el porcentaje de Nor-MN en las ratas DN ($0.49 \pm 0.09\%$) es significativamente mayor que en el grupo de ratas BN ($0.14 \pm 0.09\%$, $P < 0.05$).

Al comparar los grupos de ratas BN y DN tratadas con PC se observa que la frecuencia de Ret en el grupos de ratas BN es menor ($13.03 \pm 4.39\%$) que en las DN ($16.28 \pm 4.90\%$), sin embargo no se observa diferencia significativa (Gráfica VI y IX). En el caso de la frecuencia de Ret-MN de las ratas BN ($0.66 \pm 0.19\%$) y DN ($1.03 \pm 0.12\%$), se determinó que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre ambos (Gráficas VII y X). Asimismo, la frecuencia de Nor-MN en ratas BN ($0.60 \pm 0.14\%$) es mayor que en las DN ($0.74 \pm 0.18\%$) sin ser estadísticamente diferentes, este comportamiento se muestra en la Gráfica VIII y XI.

Como se observa en la Gráfica VI y IX, para los grupos de ratas BN y DN tratadas con TMP-SMX, se observó que estas últimas mostraron menor porcentaje de reticulocitos ($16.18 \pm 5.19\%$ y $12.46 \pm 6.57\%$ respectivamente). Al analizar la frecuencia media de Ret-MN en las ratas BN ($1.28 \pm 0.16\%$) y DN ($1.79 \pm 0.14\%$) representadas en la Gráfica VII y X, se halló diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos grupos, siendo mayor la frecuencia de Ret-MN en las ratas DN tratadas con TMP-SMX. Pero al comparar la frecuencia de Nor-MN del grupo BN ($0.83 \pm 0.17\%$) y DN ($0.92 \pm 0.12\%$), no se encontró diferencia significativa (Gráfica VIII y XI).

Las ratas BN y DN tratadas con COL presentaron una frecuencia media de Ret de 4.91 ± 2.05 y $10.30 \pm 1.07\%$ respectivamente, se determinó que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre ambos grupos (Gráfica VI y IX), siendo menor la población de Ret en las ratas BN. En la Gráfica VII y X se observa la frecuencia de Ret-MN de los grupos de ratas BN ($1.74 \pm 0.20\%$) y ratas DN ($2.88 \pm 2.60\%$) no presentan diferencia significativa. Por otra parte la frecuencia de Nor-MN de las ratas BN ($0.23 \pm 0.08\%$) y DN ($2.64 \pm 1.60\%$) representadas en las Gráficas VIII y XI, presentan diferencia significativa ($p < 0.05$) siendo mayor la frecuencia en las ratas DN.

6.8 Detección de cinetocoro en linfocitos T por CMF

Para valorar el método que se propone usar en los eritrocitos para detectar MN con cinetocoro, se efectuaron ensayos previos con linfocitos T marcados con anti-CD3-FICT (células nucleadas, con cromosomas y cinetocoro). Una vez obtenida esta población celular se procedió a marcar el cinetocoro, detectándolo por la fluorescencia del anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con Cy5), el cual se une al anticuerpo anti-cinetocoro, así es factible observarlo por medio de citometría de flujo.

El análisis de este ensayo se efectuó por medio de histogramas, donde se graficó el número de células contra la intensidad de fluorescencia de Cyt 5. En la Figura 11 A se muestran células nucleadas sin tratar con el anticuerpo anti-cinetocoro y Cy5, se observa que prácticamente toda la población es negativa a cinetocoro. Al tratar la población de linfocitos T con anti-cinetocoro y Cy5, la población de linfocitos T es positiva a cinetocoro (Figura 11 B).

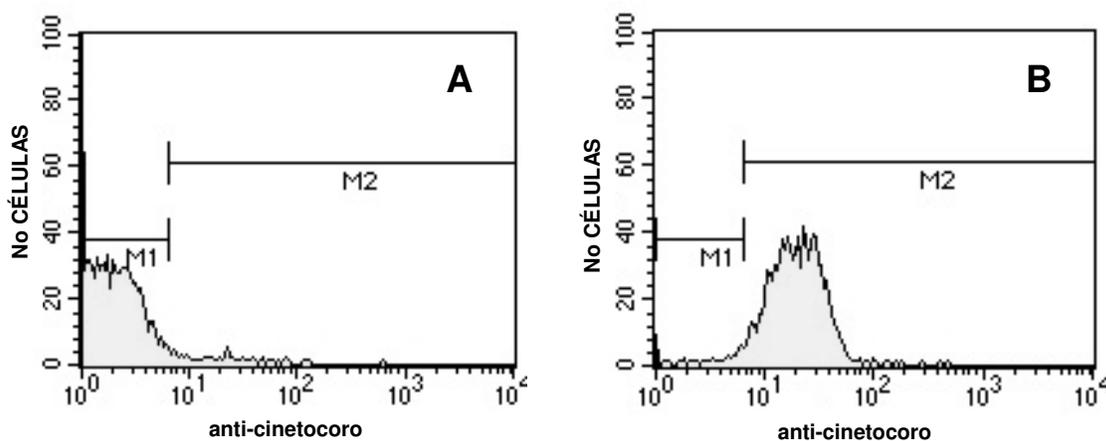


Figura 11. Histogramas de fluorescencia, para determinar el porcentaje de linfocitos T con cinetocoro. A (control) y B (con anti-cinetocoro y Cy5). Se grafica la intensidad de fluorescencia de anti-cinetocoro-Cyt5 contra número de células, la marca 1 (M1) es la región donde se localizan células nucleadas negativas a Cyt5 (A), y la M2 es la región de células Cyt5 positivas, indicando la presencia de cinetocoro (B).

VII. DISCUSIÓN

7.1 Modelo experimental-desnutrición

Los modelos animales han sido ampliamente utilizados para el estudio de los efectos de la desnutrición, se tiene la ventaja de controlar diversos factores que generalmente acompañan a la desnutrición. Existen métodos bien establecidos para inducir la desnutrición en ratas durante el periodo de lactancia, ya que los efectos de la desnutrición durante esta etapa son más graves que los observados en adultos (Boule y col., 2003).

En el laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, hemos utilizado el método de competencia de alimento durante la lactancia para el estudio de los efectos de la desnutrición a nivel celular y citogenético por más de 10 años. Con lo cual se ha demostrando que este método es eficiente y reproducible para inducir desnutrición, obteniendo alto porcentaje de ratas de segundo y tercer grado de desnutrición (Ortiz y col., 1996). Además, es importante señalar que las ratas desnutridas presentan varios síntomas semejantes a las características clínicas observadas en los niños con desnutrición, tales como: pelo escaso, fragilidad en los huesos y poca actividad motora (Ortiz y col., 1999).

En el presente trabajo se empleo el método de inducción de desnutrición mencionado en el párrafo anterior y se utilizaron las ratas desnutridas que presentaron un déficit de peso mayor al 40% con respecto a las ratas bien nutridas a los 21 días de edad (fecha del destete). El déficit de peso ha sido tradicionalmente utilizado como un buen indicador de desnutrición en ratas (Widdowson y McCance, 1975).

7.2 Desnutrición-Infecciones-Medicamentos

Los niños desnutridos son más susceptibles a las infecciones que los niños bien nutridos (Nájera y col., 2004), además las infecciones actúan de manera sinérgica con la desnutrición deteriorando aún más la salud de los niños. Por ello en el tratamiento de las enfermedades infecciosas que se presentan en los niños desnutridos, se recurre frecuentemente a la administración de antibióticos como Trimetoprim y Sulfametoxazol (TMP-SMX) para atacar infecciones gastrointestinales, del tracto respiratorio e infecciones del tracto urinario causadas por bacterias. Otro fármaco que generalmente acompaña al TMP-SMX en el

tratamiento de infecciones es el Paracetamol (PC) empleado para evitar efectos secundarios de las infecciones; actúa como analgésico y antipirético.

La prescripción de antipiréticos, entre ellos el PC a los niños con fiebre es una práctica común, las dosis terapéuticas de paracetamol son por lo general seguras, aunque se han dado casos de hepatotoxicidad en niños aún con las dosis recomendadas. En los países en desarrollo donde la desnutrición es común, faltan datos sobre la genotoxicidad del PC (Russell y col., 2003). Conjuntamente, se considera necesario esclarecer la acción citogenética del paracetamol en los organismos que padecen desnutrición.

7.3 Dosis-Respuesta-Fármacos

La curva dosis-respuesta del PC se determinó en ratas BN de 21 días de edad. Considerando que la concentración plasmática del fármaco llega a un máximo en 30 a 60 min y la vida media es de 2 h. El PC se distribuye de manera relativamente uniforme en casi todos los líquidos corporales y su unión a proteínas plasmática es muy baja, en la orina es posible identificar desde 90 a 100% del fármaco, en las primeras 24 h, después de su conjugación con ácido glucurónico (60% en promedio) y ácido sulfúrico (35% aproximadamente). Sin embargo, los niños muestran menor capacidad de glucuronidación de PC que los adultos. La dosis máxima terapéutica para el PC es de 160 mg/kg de peso en niños y 4000 mg/día/persona adulta (Giri y col., 1992; Hardman y col., 1996).

El análisis del efecto del PC con relación a la inducción de Ret-MN, evidenció que tiene un comportamiento dosis dependiente, ya sea a 24 o 48 h de exposición. Sin embargo, se obtuvo mayor frecuencia de Ret-MN a las 24 h con las diferentes dosis de PC, en comparación a lo observado a las 48 h. Esta observación coincide con lo reportado por Giri y col. (1992), quienes determinaron la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y aberraciones cromosómicas (AC) inducidas por PC (50, 100, 200, y 400 mg/kg de peso) en células de médula ósea de ratón, y obtuvieron un efecto dosis dependiente en la inducción de ICH y AC. Por otra parte, Kocisová y Srám (1990) determinaron la frecuencia de MN inducida por PC en linfocitos de sangre periférica a 0, 24, 72 y 168 h de exposición y observaron que la frecuencia de células con MN, incrementaron 24 h después de la primera dosis. Lo que concuerda con lo obtenido en este trabajo, ya que también hubo un incremento

de Ret-MN a 24 h de exposición con las diferentes dosis de PC, sin embargo se eligió la dosis de 400 mg/Kg porque es la dosis que induce la frecuencia intermedia de Ret-MN.

La introducción de la combinación de TMP-SMX constituyó un progreso importante en la obtención de antimicrobianos eficaces, su sinergismo se debe a que actúan en fases seriadas en la vía de la biosíntesis del tetrafolato. Esta combinación de fármacos es ampliamente utilizada por su alta eficacia para combatir infecciones recurrentes de vías urinarias, respiratorias y gastrointestinales causadas por microorganismos gram-negativos y gram-positivos (Sorensen y Jensen, 1981; Hardman y col., 1996). Dichas infecciones se presentan frecuentemente en niños desnutridos.

La curva dosis respuesta de TMP-SMX, fue determinada en ratas BN de 21 días de edad, considerando que la vida media de TMP es de 10 ± 2 h y de SMX es de 10 ± 4.6 h. Por otra parte la dosis terapéutica es de 8-40 mg/kg de peso en niños entre 3 y 6 años, la dosis en adultos es de 160-800 mg/kg de peso (Hardman y col., 1996).

El análisis de la inducción de Ret-MN por TMP-SMX, mostró que tiene un comportamiento dosis dependiente a las 48 h de exposición. Esto coincide con lo reportado por Abou-Eisha y col. (1999) quienes evaluaron la frecuencia de ICH y MN en cultivos de linfocitos humanos expuestos a dosis entre 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TMP, estos autores indicaron también que la concentración de ésta droga en el plasma después de administrar la dosis terapéutica es alrededor de 1 a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 48 h de exposición al TMP, observaron un incremento en la frecuencia de ICH y MN principalmente en las dosis altas (25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo que indica que la frecuencia de ICH y MN es dosis dependiente. En otro estudio, determinaron la frecuencia de ICH y MN inducida por SMX en cultivos de linfocitos utilizando dosis de 10 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observaron un incremento en la frecuencia de ICH y MN (Abou-Eisha y col., 2004).

Sin embargo, en este trabajo a 24 h de tratamiento con las diferentes dosis de TMP-SMX, no se observa el comportamiento dosis dependiente en la inducción de Ret-MN, probablemente debido a que en las primeras horas el TMP se une a proteínas plasmáticas alrededor de $37 \pm 5\%$ y SMX $62 \pm 5\%$ (Hardman y col., 1996). Por lo cual se seleccionó la dosis de TMP-

SMX que indujera la frecuencia media de Ret-MN, es decir, la dosis de 80-400 mg/kg de peso durante 48 h de exposición.

Para determinar el tiempo de exposición a PC + TMP-SMX se utilizaron las dosis de cada uno de los fármacos previamente establecidas en las curvas dosis respuesta de PC (400 mg/kg) y TMP-SMX (80-400 mg/kg) en ratas BN expuestas a 24 y 48 h. Se encontró que la producción de Ret-MN en estos dos periodos de exposición no mostraron diferencia significativa, probablemente debido a la vida media de los diferentes fármacos, los cuales tendrán su efecto de manera independiente uno del otro y en el caso de TMP-SMX se relaciona con la unión a proteínas plasmáticas. Se observó que el PC tiene mayor efecto a 24 h y el TMP-SMX a 48h. No obstante, la frecuencia media de Ret-MN tiende a ser mayor con PC + TMP-SMX a 48 h, por lo que se eligió este tiempo de exposición a PC + TMP-SMX. Es importante recalcar que no existen datos previos en los cuales se evalúe el efecto genotóxico de la combinación de estos dos fármacos.

Otro agente químico que causa la formación de MN es la COL, este se liga a la tubulina e interfiere en la función del huso mitótico, ocasionando despolimeración de los microtúbulos, por lo tanto afecta la migración de los cromosomas, y origina MN que contienen al menos un cromosoma y por lo tanto cinetocoro (Pacchierotti y col., 1991). Los datos mostrados en el presente estudio demuestran que la inducción de Ret-MN es dependiente del tiempo de exposición a COL, ya que la frecuencia media de Ret-MN es mayor a las 48 h. Por lo que se optó por el tratamiento a 48 h para las ratas BN y DN. Posteriormente, Grawé y col. (1993) evaluaron la frecuencia de Ret y Ret-MN de médula ósea y de sangre periférica inducidos por COL (1mg/Kg) a 30 y 50 h de exposición, los autores observaron un incremento de Ret-MN en médula ósea a 30 h y en sangre a 50 h de exposición.

En el presente trabajo no se pudo determinar si la frecuencia de Ret-MN inducida por COL es dosis dependiente ya que las ratas expuestas a la dosis de 1 mg/kg de peso murieron después de presentar diarrea, este síntoma es una manifestación frecuente y temprana que aparece por la sobredosificación de COL (Hardman y col., 1996), lo que indica que esta dosis es letal para las ratas BN de 21 días de edad. Sin embargo existen reportes de que la COL induce alteraciones cromosómicas dosis dependiente, por ejemplo Parry y col. (2002) determinaron que COL induce MN en fibroblastos humanos, observaron un incremento de

los MN (de 0.08% de células binucleadas con MN hasta 7.8%) al incrementar la concentración de COL (0 a 9 µg/mL) en el medio de cultivo.

Por otra parte la MMC es un agente alquilante, se une covalentemente al ADN generando fragmentos cromosómicos, por esta acción es considerado un agente clastogénico (Krishna y col., 1989; Giri y Chatterjee, 1998), es utilizado como control positivo en la inducción de MN sin cinetocoro.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se evaluó el efecto de la MMC sobre la frecuencia de Ret-MN de sangre periférica de ratas BN y DN, utilizando las dosis de 0.5, 0.75 y 1 mg/kg de peso por 32 h. Se determinó que la inducción de Ret-MN es dosis dependiente y la dosis de 0.5 mg/kg es la dosis mínima para encontrar diferencia significativa en la frecuencia de Ret-MN inducidos en ratas BN (Ortiz y col., 2004). Por ello en este estudio se consideraron las dosis de 0.75 y 1 mg/kg de peso a 24 y 48 h de exposición. Se observó un comportamiento dosis dependiente en la producción de Ret-MN, asimismo, la frecuencia de Ret-MN también es dependiente del tiempo de exposición, en el caso de la dosis de 0.75 mg/kg se observa claramente el efecto del tiempo, siendo mayor la frecuencia de Ret-MN a 48h. Sin embargo, para la dosis de 1 mg/kg no hubo diferencia significativa entre las 24 y 48, además se observa mayor variabilidad de los datos a 48 h, probablemente debido a la respuesta que presenta cada organismo a este agente. La dosis que se eligió fue de 0.75 mg/kg de peso durante 48 h de exposición.

7.4 Frecuencia de Reticulocitos (Ret) con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas

Los datos de este estudio demuestran que la frecuencia de Ret en ratas BN expuestas a PC, TMP-SMX y PC + TMP-SMX no es afectada comparada con la población de Ret de las ratas BN sin tratamiento. Sin embargo, en las ratas BN tratadas con COL la población de Ret experimentó una drástica disminución, de alrededor del 70% en comparación con la frecuencia de Ret observada en el grupo de ratas BN testigo y en los diferentes grupos tratados.

Esto se relaciona con el mecanismo de acción de la COL, ya que detiene la división celular en vegetales y animales *in vivo* y/o *in vitro*. La detención del ciclo celular se presenta en la metafase al no formarse el huso mitótico. Además las primeras en ser afectadas son las células con tasas máximas de división, tales como las células hemopoyéticas y entre ellas los eritroblastos (Hardman y col., 1996). Asimismo Pacchierotti y col. (1991) observaron disminución en el porcentaje de Ret de médula ósea de ratones tratados con COL, sobre el total de células rojas, lo cual es un indicador de la toxicidad celular.

En el caso de las ratas DN la población de Ret no se ve afectada con los tratamientos de TMP-SMX y COL comparada con la población de Ret obtenida en las ratas DN testigo. Sin embargo, en las ratas DN tratadas con COL la población de Ret es igual o incluso mayor a la observada en DN sin tratamiento, hay que considerar que en este caso únicamente se trabajaron con 2 ratas, ya que 3 de las ratas DN tratadas con COL murieron, esto nos indica que los organismos desnutridos son más susceptibles a este agente y probablemente las ratas que sobrevivieron de alguna manera responden para mantener la población de Ret.

Como se observó en los resultados, la población de Ret en las ratas desnutridas se encuentra disminuida, aproximadamente en un 41% en relación al porcentaje de Ret de las ratas BN. Esto coincide con lo detectado por Reichlmayr-Lais y Kirchgessner (1981), ellos demostraron que en ratas en crecimiento, existen alteraciones hematológicas inducidas por una alimentación deficiente, mostrando un valor bajo de hematocrito respecto a los valores testigo. Del mismo modo, el grupo de Ortiz y col. (2004), observaron una tendencia en las ratas DN a disminuir el porcentaje de Ret comparado con el obtenido en ratas BN. También en otro estudio se evaluó el efecto causado por la desnutrición de segundo y tercer grado en la serie leucocitaria y eritrocitaria de sangre periférica de ratas DN, se observó una disminución significativa en el recuento de eritrocitos de ratas desnutridas comparado con el grupo de ratas BN (Cervantes, 2003).

La frecuencia de Ret en el grupo de ratas DN tratadas con PC es mayor que en el grupo de ratas DN testigo, este efecto fue observado por Dybing y col. (1984) quienes reportaron que el PC es principalmente un agente citotóxico más que genotóxico. También se ha determinado que en hepatocitos este fármaco tiene efecto necrogénico, lo cual puede causar una fuerte estimulación de proliferación en células de hígado (Giri y col., 1992).

La población de Ret de ratas BN tratadas con COL es menor que la obtenida en las ratas DN sin tratamiento, sin embargo en las ratas DN hay mayor variabilidad en la población de Ret, lo cual afecta para determinar un comportamiento de esta población en ratas DN tratadas con COL.

7.5 Reticulocitos-Micronúcleados (Ret-MN) con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas

La frecuencia de Ret-MN con los tratamientos PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL fue mayor (2, 3.8, 3.5, y 5.2 veces, respectivamente) comparado con la frecuencia de Ret-MN en ratas BN sin tratamiento. Estos datos concuerdan con trabajos previos realizados por diferentes grupos que han determinado que estos agentes tienen efecto citogenético. Por ejemplo, Severin y Beleuta (1995) observaron daño celular inducido por PC provocando principalmente aberraciones cromosómicas y fragmentos ácentricos en células de médula ósea de ratón expuestos a 400 y 800 mg/kg. Resultados similares fueron publicados por Giri y col. (1992) y Kocisová y Srám (1990).

Entre otros estudios realizados están los de Abou-Eisha y col. (1999, 2004), y el de Sorensen y Jensen (1981), quienes hicieron análisis citogenéticos en células de médula ósea de pacientes con infecciones del tracto urinario tratados con TMP-SMX. Los pacientes presentaron un incremento de MN comparado con el grupo control, mientras que en la determinación de aberraciones cromosómicas no se observó un incremento, indicando que el ensayo de MN es más sensible que el análisis de aberraciones cromosómicas.

Asimismo se determinó que el TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL, a las concentraciones utilizadas en este estudio, tienen mayor efecto genotóxico que el PC, debido a que estos tres tratamientos indujeron mayor frecuencia de Ret-MN (1.93, 1.7 y 2.6 veces, respectivamente) en relación con el porcentaje de Ret-MN observado después del tratamiento con PC. El grupo de las ratas BN tratadas con COL presentó 1.3 y 1.4 veces mayor frecuencia de Ret-MN, en relación con los grupos de ratas tratadas con TMP-SMX y PC + TMP-SMX, respectivamente.

En los grupos de las ratas DN tratadas con TMP-SMX y COL, se observó 1.98 y 3.2 veces mayor frecuencia de Ret-MN comparados con el grupo de ratas DN sin tratamiento; por otra parte el grupo DN TMP-SMX y DN COL presentaron 1.7 y 2.7 veces mayor frecuencia de Ret-MN respecto al grupo DN PC, lo que indica que TMP-SMX es más genotóxico que el PC, finalmente entre el grupo de ratas DN TMP-SMX y COL no hay diferencia aunque este resultado se debe tomar con prudencia, por la alta variabilidad y el reducido número de ratas en el grupo de DN COL.

La frecuencia espontánea de Ret-MN es 2.7 veces mayor en las ratas DN en relación con las ratas BN, esto indica que la DCP es capaz de causar daño cromosómico. Del mismo modo cuando las ratas desnutridas se trataron con PC estas presentaron mayor frecuencia de Ret-MN, 1.5 veces mayor, a la observada en las ratas BN tratadas con el mismo fármaco. Asimismo la frecuencia de Ret-MN en el grupo de ratas DN es 1.3 veces mayor que la frecuencia del grupo BN cuando ambos grupos fueron tratados con TMP-SMX. Estos datos indican que los organismos desnutridos son más susceptibles al daño genotóxico producido por estos fármacos. Entre el grupo de BN y DN tratado con COL no se observa diferencia, probablemente por la alta variabilidad del grupo DN.

Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos en trabajos realizados anteriormente. Se ha evaluado *in vitro* la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica de niños con desnutrición (Ortiz y col., 1997) y en linfocitos de bazo de ratas desnutridas experimentalmente (Ortiz y col., 1995). También recientemente en nuestro laboratorio iniciamos el estudio *in vivo* en reticulocitos de sangre periférica de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. En los tres estudios se observó que la frecuencia de MN es mayor en las células de los organismos desnutridos en relación a la observada en las células de organismos bien nutridos. Estos resultados señalan que la DCP produce daño celular *in vivo*, y este daño puede producir efectos negativos para el desarrollo del organismo (Ortiz y col., 2004).

7.6 Eritrocitos maduros-Micronúcleados (Nor-MN) con los diferentes tratamientos en ratas bien nutridas y desnutridas

Los datos de este trabajo demuestran que la frecuencia de Nor-MN en las ratas desnutridas sin tratamiento (frecuencia espontánea) es 3.5 veces mayor a la observada en las ratas BN testigo, lo que apoya la hipótesis de que la desnutrición por sí sola es capaz de inducir daño cromosómico. Al comparar los grupos de BN y DN tratados con PC y TMP-SMX, no hubo diferencia significativa, sin embargo hay una tendencia de los organismos desnutridos a presentar mayor frecuencia de Nor-MN. Estos resultados indican que los organismos desnutridos presentan una acumulación de daño cromosómico causado por las condiciones nutricionales, de estrés y ambientales; a las cuales han estado sometidas en al menos un mes, ya que los Nor persisten en la circulación alrededor de 1 mes (Mavournin y col., 1990; Dertinger y col., 1996; Hayashi y col., 2000).

También se demostró que la población de Nor-MN en las ratas BN fue 4.2, 5.9, 9.9 veces mayor en las ratas tratadas con PC, TMP-SMX y PC +TMP-SMX, respectivamente comparado con la frecuencia de Nor-MN en ratas BN testigo. Lo que indica daño cromosómico producido probablemente, por factores del medio donde se encuentran y por el tratamiento con los fármacos (Mavournin y col., 1990; Dertinger y col., 1996; Hayashi y col., 2000).

Los Nor-MN producidos en ratas BN tratadas con TMP-SMX y PC + TMP-SMX presentan 1.3 y 2.3 veces mayor frecuencia de Nor-MN comparados con las ratas tratadas con PC, lo que indica nuevamente que TMP-SMX es más genotóxico que PC. Como se mostró en los resultados la frecuencia de Nor-MN es mayor en ratas BN tratadas con PC + TMP-SMX en comparación con las ratas BN TMP-SMX y las ratas BN PC, de lo que se deduce que el daño cromosómico producido por PC, es acumulado en Nor-MN. Esto indica que cuando se administra la combinación de PC + TMP-SMX, se tiene un efecto aditivo del daño cromosómico causado por ambos fármacos. Al comparar el porcentaje de Nor-MN producidos por PC (2.6 veces), TMP-SMX (3 veces) y PC +TMP-SMX (6 veces) es mayor que el observado en ratas BN COL, esto puede deberse a que la COL tiene efecto citotóxico y por lo tanto provoca disminución en el porcentaje de Ret-MN que posteriormente darán origen a los Nor-MN.

Dentro de los grupos de ratas desnutridas, el grupo de las ratas tratadas con COL presentó la mayor frecuencia de Nor-MN, lo cual está relacionado con el incremento de la población de Ret-MN, los que posteriormente dan origen a los Nor-MN aunque, hay que recordar que existe una alta variabilidad en este grupo de ratas DN COL.

Existen tres mecanismos por los cuales el PC tiene su efecto genotóxico: 1) inhibición de la ribonucleótido reductasa; 2) incremento de los niveles de Ca^{2+} en el espacio intranuclear y citosol; 3) daño al ADN causado por NAPQI después de la depleción de glutatión (Bergman y col., 1996). Además se ha determinado que es un agente clastogénico (Giri, 1993).

En el caso de TMP-SMX no es conocido claramente el mecanismo de inducción de MN, sin embargo, desde 1978 Golde y col. determinaron el efecto *in vitro* de TMP-SMX sobre la hematopoyesis, en particular demostraron que el TMP inhibió 50 % de las colonias eritroide y granulocítica. SMX también dañó la hematopoyesis *in vitro*, ambos causan daño por la inhibición de la síntesis de tetrahidrofolato. Posteriormente Steinberg y col. (1980) en cultivos de células de niños con eritroleucemia tratados con TMP-SMX a dosis terapéuticas o inferiores, observaron que el ciclo celular se altera, detectando detención en la fase S, por lo que se postuló que se relaciona con una inhibición en la síntesis del ADN.

Abou-Eisha y col. (1999, 2004) postularon que el TMP y SMX son drogas que inhiben a la enzima, dihidrofolato reductasa y dihidropteroato sintetasa respectivamente. La primera enzima es responsable de la reducción del dihidrofolato a tetrafolato que promueve la incorporación de timidina al ADN, por lo que la inhibición de esta enzima impide la biosíntesis de ADN, ARN y proteínas resultando en detención del ciclo o muerte celular. La enzima bacteriana dihidropteroato sintetasa incorpora el ácido para-aminobenzoico en el ácido dihidropteroico, precursor de ácido fólico en bacterias. Por lo que el efecto antifólico de ambos fármacos es el que estaría produciendo la inducción de MN.

Las drogas son generalmente metabolizadas a derivados más solubles en agua por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico y citoplasma de células hepáticas. La tasa del metabolismo de las drogas puede ser influenciado por varios factores tales como fisiológicos, genéticos y ambientales (Shim y col., 2004). Debido a que la desnutrición es una condición

compleja en la cual muchas deficiencias ocurren simultáneamente, la patofisiología de la desnutrición puede alterar procesos farmacocinéticos, respuesta de las drogas y toxicidad.

Diversos autores determinaron que la disposición de PC en niños con DCP, se encuentra alterada debido a que algunos parámetros farmacocinéticos son perturbados tales como: la constante de eliminación, la cual fue significativamente menor, la vida media del PC se incrementó y el área bajo la curva también se observó aumentada comparado con el grupo de niños testigo (Krishnaswamy, 1989; Mehta y col. 1985 y 1990; Jung 1985).

Asimismo Lares-Asseff y col. (2003) determinaron en ratas desnutridas de 21 días de edad, que la vida media de TMP-SMX se incrementó comparada con el grupo de ratas BN testigo, así como la depuración es menor en las ratas DN y disminuye la capacidad de biotransformación del TMP-SMX, además la acumulación de los fármacos en riñón, pulmón, hígado y bazo es mucho mayor en las ratas DN que las BN. Por otra parte Bravo y col. (1984) determinaron que la vida media de SMX en niños con marasmo fue prolongada, y el área bajo la curva es mayor en los niños DN comparado con el grupo control.

7.7 Detección de cinetocoro

Varios trabajos han determinado el origen de los MN, ya sea por inmunofluorescencia marcando proteínas del complejo centrómero-precinetocoro utilizando anticuerpos anti-cinetocoro (tinción con CREST) o por FISH; ambos métodos de marcaje se analizan por microscopia de fluorescencia (Gudi y col., 1990; Krishna y col., 1994; Attia y col., 2003).

Ya se ha mencionado que el análisis de MN por microscopia es tedioso y consume demasiado tiempo, por lo cual uno de los objetivos de este trabajo fue estandarizar la detección de MN con cinetocoro por citometría de flujo.

Es importante considerar que el complejo centrómero-cinetocoro esta formado por tres placas, la interna, intermedia y externa. Dentro de la placa interna se encuentra la proteína centromérica CENP-A, la cual es una histona tipo H3 especializada, es una proteína constitutivamente, esta presente durante el ciclo celular y marca el dominio precinetocoro en

el centrómero destinado a ser el cinetocoro mitótico (Shelby y col., 2000; Sullivan y col., 2001).

La proteína CENP-A como siempre está presente en el ciclo celular es marcada para determinar la presencia de cinetocoro en los MN, cuando se utiliza anticuerpos anti-cinetocoro (anticuerpo primario). Sin embargo la detección de cinetocoro se realiza por inmunofluorescencia indirecta, debido a que se requiere de un anticuerpo secundario conjugado con algún fluorocromo (en este caso Cy5) que se une al anticuerpo primario, la fluorescencia del anticuerpo secundario es detectada por el citómetro de flujo indicando la presencia de cinetocoro.

Para la detección de cinetocoro en los MN de eritrocitos, ya sea en los Ret-MN o Nor-MN, se utiliza Tween para permeabilizar la membrana celular y envoltura nuclear que rodea al MN, para permitir que el anticuerpo anti-cinetocoro (anti-cinetocoro humano) reconozca proteínas del complejo centrómero-precinetocoro (principalmente CENP-A) en el material cromosómico que forma el MN. Para advertir la presencia de cinetocoro se detecta por la fluorescencia del anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con Cy5), éste se une al anticuerpo anti-cinetocoro. Los resultados obtenidos en los análisis efectuados con linfocitos apoyan que se podrá detectar la presencia del cinetocoro en eritrocitos micronucleados por citometría de flujo.

7.8 Eritrocitos un modelo celular para la detección de MN

Hay que considerar que los eritrocitos son un tipo celular que facilita la detección de MN por CMF, ya que carecen de núcleo principal.

La eliminación del núcleo se lleva a cabo porque los vasos especializados de la médula ósea (sinusoides de la médula) presentan un endotelio que se caracteriza por presentar poros (1-4 μm) que solo permiten el paso de organelos citoplasmáticos, tales como mitocondrias, ribosomas y pequeños fragmentos nucleares (cuerpos de Howell-Jolly o MN) que son bastante pequeños y se ajustan al diámetro de los poros del endotelio y pueden atravesarlo, lo que no sucede con el núcleo. Entonces cuando el citoplasma de los eritroblastos atraviesan el endotelio para salir de médula, es presionado y las células rojas pierden su núcleo pero mantienen el MN y entran a la circulación como reticulocitos, mientras tanto el núcleo permanece en el compartimiento hematopoyético de la médula, donde es degradado por macrófagos (Tavassoli y Crosby, 1973, Figura 12)

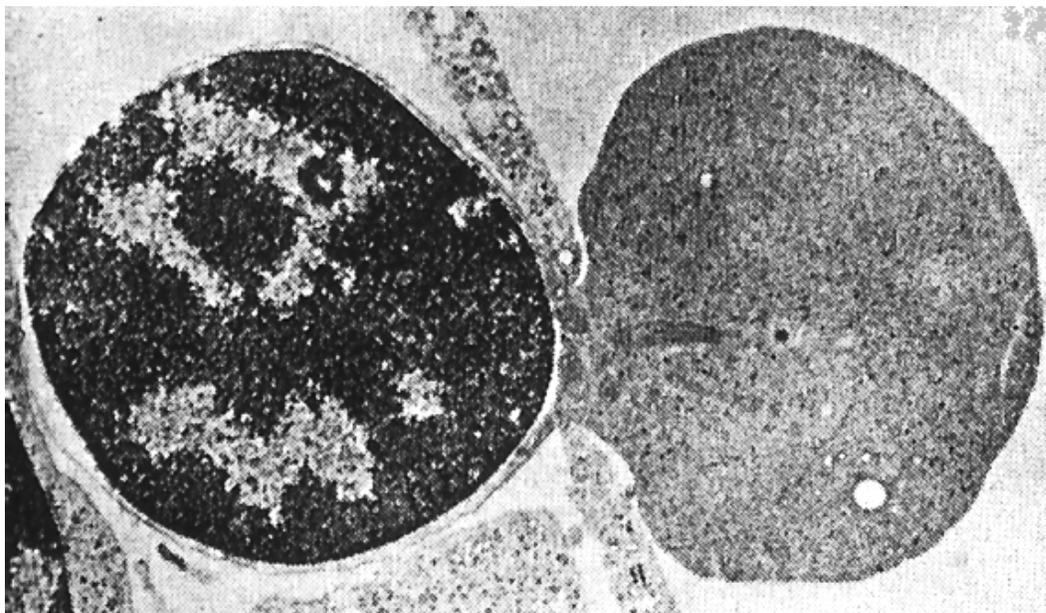


Figura 12. Eritroblasto en el proceso de eliminación de su núcleo. Se observa una célula roja nucleada en el proceso de atravesar la pared del endotelio; el núcleo del eritroblasto se encuentra en la médula (izquierda) y el citoplasma de la célula esta completamente dentro del lumen, penetrando a torrente sanguíneo (derecha). Entre los dos hay una delgada célula endotelial y el núcleo de las células rojas, no puede pasar a través de la apertura y tiene que permanecer en el compartimiento hematopoyético de la médula. X8500. (Tomada de Tavassoli y Crosby, 1973.)

VIII. CONCLUSIONES

A) La frecuencia de reticulocitos con micronúcleos (Ret-MN) en ratas bien nutridas en las curvas dosis-respuesta; es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. La mayor frecuencia de Ret-MN, con los diferentes agentes en relación al tiempo, fue la siguiente:

- PC a 24 h de exposición.
- TMP-SMX a 48 h de exposición.
- MMC a 48 h de exposición.

B) Con relación a la frecuencia de reticulocitos (Ret) en ratas de 21 días de edad los datos indican que:

- La desnutrición severa disminuye la población de Ret, respecto al grupo de ratas bien nutridas testigo.
- El PC incrementa la población de Ret en las ratas desnutridas comparado con el grupo de ratas desnutridas testigo, indicando un posible efecto de estimular la proliferación de Ret.
- La COL disminuye la población de Ret en ratas bien nutridas, lo que indica que este agente tiene un efecto citotóxico.

C) En cuanto a la frecuencia de Ret-MN en ratas de 21 días de edad se detectó:

- La desnutrición severa aumenta la frecuencia de Ret-MN, es decir incrementa la susceptibilidad de los organismos desnutridos gravemente a sufrir daño cromosómico.
- El tratamiento de ratas bien nutridas con PC, TMP-SMX, PC + TMP-SMX y COL incrementaron la frecuencia de Ret-MN, respecto al grupo de ratas bien nutridas testigo; lo cual indica que estos fármacos tienen efecto genotóxico.
- La frecuencia de Ret-MN fue mayor en ratas bien nutridas tratadas con TMP-SMX y COL, lo que indica que estos fármacos tienen mayor efecto genotóxico que el producido por el PC.
- Las ratas desnutridas tratadas con PC y TMP-SMX, presentaron mayor frecuencia de Ret-MN que la obtenida en las ratas bien nutridas expuestas con los mismos

fármacos, indicando que las ratas desnutridas son más susceptibles a sufrir daño cromosómico causado por los fármacos.

D) Con referencia a la frecuencia de eritrocitos normocromáticos micronúcleados (Nor-MN) en ratas de 21 días de edad se registró:

- Las ratas desnutridas testigo presentan mayor frecuencia de Nor-MN respecto a las ratas bien nutridas testigo, indicando nuevamente que la desnutrición causa daño a nivel cromosómico.
- La frecuencia de Nor-MN aumentó en las ratas bien nutridas tratadas con PC, TMP-SMX y PC + TMP-SMX con respecto a las ratas bien nutridas testigo. Sin embargo la frecuencia de Nor-MN fue mayor en las ratas tratadas con PC + TMP-SMX, observando un efecto aditivo sobre la frecuencia de Nor-MN por ambos fármacos.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Abou-Eisha A, Creus A, Marcos R. 1999. Genotoxic evaluation of the antimicrobial drug, trimethoprim, in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 440:157-162.

Abou-Eisha A, Marcos R, Creus A. 2004. Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 564:51-56.

Albertini R, Anderson D, Douglas G, Hagmar J, Hemminki K, Merlo F, Nataranja A, Norppa H, Shuker D, Tice R, Waster M, Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463:111-172.

Alu V, Murthy P. 1993. Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats in utero upon rehabilitation. *Experientia* 49:258-262.

Armendares S, Salamanca F, Frenk S. 1971. Chromosome abnormalities in severe protein calorie malnutrition. *Nature* 232:271-273.

Attia S, Kliesch U, Schriever-Schwemmer G, Badary O, Hamada F, Alder D. 2003. Etoposide and merbarone are clastogenic and aneugenic in the mouse bone marrow micronucleus test complemented by fluorescence in situ hybridization with the mouse minor satellite DNA probe. *Environ Mol Mutagen* 24:51-60.

Avila-Curiel A, Shamah-Levy T, Galindo-Gómez C, Rodríguez-Hernández G, Barragán-Heredia L. 1998. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano. *Salud Pública Mex* 40:150-160.

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

Bergman K, Müller L, Teigen S. 1996. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re)view. *Mutat Res* 349:263-588.

Betancourt M, Balvanera P, 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, Hernandez G, Cravioto J. 1979. Essential aminoacids deficiency and the production of chromosomal anomalies. *Rev Invest Clin* 31:45-52.

Betancourt M, Ortiz R. 1991. Efectos de la desnutrición severa en el nivel citogenético. *Ciencia* 42:367-373.

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

Boule N, Tremblay A, González-Barranco J, Aguilar-Salinas C, López-Alvarenga J, Despres J, Bouchard C, Gómez-Pérez F, Castillo-Martínez L, Ríos-Torres J. 2003. Insulin resistance and abdominal adiposity in young men with documented malnutrition during the first year of life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:598-604.

Bravo I, Bravo M, Plate G, Merlez J, Arancibia A. 1984. The pharmacokinetics of cotrimoxazole sulphamide in malnourished (marasmic) infants. *Pediatr Pharmacol* 4:167-176.

Cervantes E. 2003. Evaluación del efecto causado por la desnutrición de segundo y tercer grado en la serie leucocitaria y eritrocitaria de sangre periférica de ratas desnutridas. UAM, Tesis de Licenciatura en Biología Experimental.

Chandra R. 1996. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14304-14307.

Chávez M, Madrigal H, Villa A, Guarneros N. 2003. Alta prevalencia de desnutrición en la población infantil indígena mexicana. Encuesta nacional de nutrición 1999. *Rev Esp Salud Pública* 77:245-255.

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

Cliet I, Fournier E, Melcion C, Cordier A. 1989. *In vivo* micronucleus test using mouse hepatocytes. *Mutat Res* 216:321-326.

Cole R, Taylor J, Cole J, Arlett C. 1981. Short-term test for transplacentally active carcinogens. 1 Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *Mutat Res* 122: 347-357.

Cortés E. 1997. Detección de daño en el ADN por medio de electroforesis unicelular en células de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. UAM, Tesis de Maestría en Biología Experimental.

Cortés E, González C, Betancourt M, Ortiz R. 2001. Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratog Carcinog Mutag* 21: 231-247.

Cravioto J, Vega-Franco L. 1995. Historical highlights of mexican contributions to human nutrition. *Arch Med Res* 26:S133-S137.

Dertinger S, Torous D, Tometsko K. 1996. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat Res* 371:283-292.

Ding G, Nakahara T, Miyakoshi J. 2003. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis* 18(5): 439-443.

Dorr R. 1988. New findings in the pharmacokinetic, metabolic, and drug-resistance aspects if mitomycin C. *Semin Oncol* 15 Suppl 4: 32-41.

Dybing E, Holme J, Gordon W, Soderlund E, Dahlin D, Nelson S. 1984. Genotoxicity studies with paracetamol. *Mutat Res* 138:33-38.

Fawcett D. 1995. Tratado de histología. 12^{va} ed. Ed. INTERAMERICANA. Madrid. pp:266-270.

Fechner A, Bohme C, Gromer S, Funk M, Schirmer H, Becker K. 2001. Antioxidant status and nitric oxide in the malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediatr Res* 49(2): 237-243.

Feledi C, Goldman A, Hebe L, Massouh E, Roux M. 1993. B and T cells in the intestinal mucosa of malnourished rats after the oral administration of cholera toxin. *Com Biol* 11:275-282.

Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 455:81-95.

Fenech M, Morley A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147:29-36.

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

Fondu P, Haga P, Halvorsen S. 1978. The regulation of erythropoiesis in protein-energy-malnutrition. *Br J Haematol* 38(1):29-36.

Galler J, Kanis K. 1987. Animal models of malnutrition applied to brain research. In: basic and clinical of nutrition and brain development. Rassin D, Haber B, Drujan B. eds., Liss A, N.Y. *Currents Topics in nutrition and Disease* 16:57-73.

Giri A. 1993. The genetic toxicology of paracetamol and aspirin. A review. *Mutat Res* 296:199-210.

Giri S, Chatterjee A. 1998. Modulation of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges and cell cycle delay by buthionine sulfoximine and reduced glutathione in mouse bone marrow cells *in vivo*. *Mutat Res* 413:227-234.

Giri A, Sivam S, Khan K. 1992. Sister-chromatid exchange and chromosome aberrations induced by paracetamol *in vivo* in bone-marrow cells of mice. *Mutat Res* 78:253-258.

Golde D, Bersch N, Quan S. 1978. Trimethoprim and sulphamethoxazole inhibition of haematopoiesis *in vitro*. *Br J Haematol* 40:363-367.

Golden M. 2002. The development of concepts of malnutrition. *J Nutr* 137:2117S-2122S.

Gómez F. 1946. Desnutrición. *Bol Med Hosp Infant Méx* 3:543-551.

Gómez F, Ramos-Galván R, Cravioto J, Frenk S. 1999. Desnutrición de tercer grado en México (kwashiorkor en África). *Bol Med Hosp Infant Mex* 56:238-240.

Goshima G, Kiyomitsu T, Yoda K, Yanagida M. 2003. Human centromere chromatin protein hMis12 essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol* 160: 25-39.

Grawé J, Zetterberg G, Amneus H. 1992. Flow-cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Cytometry* 13: 750-758.

Grawé J, Zetterberg G, Amnéus H. 1993. DNA content determination of micronucleated polychromatic erythrocytes induced by clastogens and spindle poisons in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis* 8: 249-255.

Grunfeld C. 2002. Editorial: Leptin and the immunosuppression of malnutrition. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3038-3039.

Gudi R, Sandhu S, Athwal R. 1990. kinetochore identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: an assay for the detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutat Res* 234:263-268.

Gujral J, Knight T, Farhood A, Bajt M, Jaeschke H. 2002. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 67:322-328.

Gupta P, Sharma T. 1981. Nonrandom distribution of aberrations and identification with C and G bandings of the position of breakage points on muntjac chromosome induced by mitomycin C, bromodeoxyuridine and hydroxylamine. *Mutat Res* 81:63-74.

Hamada S, Sutou S, Morita T, Wakata A, Asanami S, Hosoya S, Ozawa S, Kondo K, Nakajima M, Shimada H, Osawa K, Kondo Y, Asano N, Sato S, Tamura H, Yajima N, Marshall R, Moore C, Blakey D, Weaver J, Torus D, Proudlock R, Ito S, Namiki C, Hayashi M. 2001. Evaluation of the rodent long-term micronucleus assay: summary of the 13th collaborative study by CSGMT/JEMS. *MMS. Environ Mol Mutagen* 7:93-110.

Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman-Gilman A. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8^a ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. pp: 1129-1132.

Hayashi M, Kodama Y, Awogi T, Suzuki T, Asita A, Sofuni T. 1992. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C and cyclophosphamide-treated rats. *Mutat Res* 278:209-213.

Hayashi M, McGregor J, Gatehouse D, Adler I, Blakey D, Detinger S, Krishna G, Monta T, Russo A, Sutou S. 2000. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environ Mol Mutagen* 35:234-252.

Hayashi M, Norppa H, Sofuni T, Ishidate M. 1992 a. Mouse bone marrow micronucleus test using flow cytometry. *Mutagenesis* 7:251-256.

Hayashi M, Norppa H, Sofuni T, Ishidate M. 1992 b. Flow cytometric micronucleus test with mouse peripheral erythrocytes. *Mutagenesis* 7: 257-264.

He S, Baker R. 1989. Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cell. *Environ Mol Mutagen* 14:1-5.

Heddle J. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutat Res* 18:187-192.

Heddle J, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor J, Newel G, Salamone M. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, a report of the U.S. Environmental Protection Agency Genetox Program. *Mutat Res* 123:61-118.

Herrera F, Miranda L, Ramírez L, Palacios E. 2000. Cambios bioquímicos y morfológicos en el sistema nervioso central de ratas desnutridas durante la gestación y lactancia. *Interciencia* 25: 85-91.

Hongslo J, Bjorge C, Schwarze P, Brogger A, Mann G, Thelander L, Holme J. 1990. Paracetamol inhibits replicative DNA synthesis and induces sister chromatid exchange and chromosomal aberrations by inhibition of ribonucleotide reductase. *Mutagenesis* 5:475-480.

Hongslo J, Brogger A, Bjorge C, Holme J. 1991. Increased frequency of sister-chromatid exchange and chromatid breaks in lymphocytes after treatment of human volunteers with therapeutic doses of paracetamol. *Mutat Res* 261:1-8.

Icaza S, Béhar M. 1981. *Nutrición*. 2^a ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. pp:107-122.

Ivanovic D. 1996. Does undernutrition during infancy inhibit brain growth and subsequent intellectual development? *Nutrition* 12: 568-571.

Jelliffe D. 1985. *Nutrición infantil en países en desarrollo*. 2^a ed. Ed. Limusa, S.A. de C.V. México D.F. pp: 95-126.

Jung D. 1985. Disposition of acetaminophen in protein-calorie malnutrition. *J Pharmacol Exp Ther* 232:178-182.

Junqueira L, Carneiro J. 1996. *Histología básica*. 4^a ed. Ed. Masson, S.A. México. pp:229-245.

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Ardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate J, Lorge E, Norppa H, Surrallés J, Hude W, Wakata A. 2000. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Environ Mol Mutagen* 35:167-172.

Kocisová J, Srám RJ. 1990. Mutagenicity studies on paracetamol in human volunteers. III Cytokinesis block micronucleus method. *Mutat Res* 244:27-30.

Krawinkel M. 2003. Kwashiorkor is still not fully understood. *Bull WHO* 81: 910-911.

Krishna G, Brott D, Urda G, McKeel M, Zandee J, Theiss J. 1993. Comparative micronucleus quantitation in pre- and post-column fractionated mouse bone marrow by manual and flow methods. *Mutat Res* 302: 119-127.

Krishna G, Hayashi M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455:155-166.

Krishna G, Kropko M, Theiss J. 1989. Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat Res* 222:63-69.

Krishna G, Urda G, Theiss J. 1994. Comparative mouse micronucleus evaluation in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's Giemsa. *Mutat Res* 323:11-20.

Krishnaswamy K. 1989. Drug metabolism and pharmacokinetics in malnourished children. *Clin Pharmacokinet* 17:68-88.

Lähdetie J, Parvinen M. 1981. Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rats. *Mutat Res* 81: 103-115.

Lares-Asseff I, Perez M, Camacho G, Toledo A, del Carmen Lopez M, Guille A, Sosa M. 2003. Effect of severe protein-calorie malnutrition on the penetration kinetics of trimethoprim and sulfamethoxazole to the deep tissues of wistar rats. *J Pharm Pharmacol* 55: 469-477.

Leiva B, Inzunza N, Pérez H, Castro V, Jansana J, Toro T, Almagiá A, Navarro A, Urrutia M, Cervilla J, Ivanovic D. 2001. Algunas consideraciones sobre el impacto de la desnutrición en el desarrollo cerebral, inteligencia y rendimiento escolar. Archivos latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición 51: 64-71.

Lewerenz V, Hanelt S, Nastevska C, El-Bahay C, Rohrdanz E, Kahl R. 2003. Antioxidants protect primary rat hepatocyte cultures against acetaminophen-induced DNA strand breaks but not against acetaminophen-induced cytotoxicity. Toxicology 191:179-187.

Litron Laboratories. MicroFlow®, micronucleus analysis kit. Rochester, NY.

Manary M, Broadhead R, Yarasheski K. 1998. Whole-body protein kinetics in marasmus and kwashiorkor during acute infection. Am J Clin Nutr 67: 1205-1209.

Margen S, Melnick V, Neuhauser L, Ríos E. 1994. Infant feeding in México. A study of health facility and mothers practices in three regions. Washinton, D.C.: Nestlé Infant Formula Audit Commission.

Marin M, De Tomás M, Serres C, Mercuri O. 1995. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. J Nutr 125:1017-1024.

Mavournin K, Blakey D, Cimino M, Salamone M, Heddle J. 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental protection agency gene-toxic program. Mutat Res 239: 29-80.

Mehta S. 1990. Malnutrition and drugs: clinical implications. Dev Pharmacol Ther 15:159-165.

Mehta S, Nain C, Yadav D, Sharma B, Mathur V. 1985. Disposition of acetaminophen in children with protein calorie malnutrition. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 23:311-315.

Müller L, Kasper P, Madle S. 1991. Further investigations on the clastogenicity of paracetamol and acetylsalicylic acid in vitro. Mutat Res 263:83-92.

Murthy P, Bhaskaram P, Srikantia S. 1980. Sister chromatid exchanges in protein-energy malnutrition. *Hum Genet* 55:405-406.

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

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

Nájera-Medina O, González C, Betancourt M, Ortiz R. 2000. La desnutrición en México: revisión de los programas gubernamentales y los estudios diagnósticos de alcance nacional. *Bol Med Hosp Infant Mex* 58:120-133.

Nájera O, González C, Toledo G, López L, Ortiz R. 2004. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diag Lab Immunol* 11: 577-580.

Norppa H, Renzi L, Lindholm C. 1993. Detection of whole chromosomes in nuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis* 8:519-525.

Nüsse M, Miller B, Viaggi S, Grawé J. 1996. Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent in situ hybridization with a centromeric DNA probe. *Mutagenesis* 11: 405-413.

Onis M, Frongilio E, Blössner M. 2001. ¿Está disminuyendo la malnutrición? Análisis de la evaluación del nivel de malnutrición infantil desde 1980. *Bol OMS* 4:100-110.

Ortiz R, Betancourt M. 1990. Length of cell cycle *in vitro* and sister-chromatid exchange frequency in bone marrow cells from severely malnourished rats. *Mutat Res* 232: 71-75.

Ortiz R, Campos C, Gomez JL, Espinoza M, Ramos-Motilla M, Betancourt M. 1994. Sister-chromatid exchange (SCE) and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition (PCM). *Mutat Res* 312:33-37.

Ortiz R, Cortés N, González C, López L, Pérez P, Cortés E, Betancourt M. 1997. Analysis of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. *Environ Mol Mutagen* 30: 363-370.

Ortiz R, Cortés E, González C, Pérez L, Betancourt M. 1995. Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environ Mol Mutagen* 26: 55-59.

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

Ortiz R, Cortés E, Pérez L, González C, Rodríguez E, Betancourt M. 1999. Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica. *Animales de Experimentación* 4(3):35-39.

Ortiz R, Medina H, Rodríguez L, González-Márquez H, Cortés E. 2004. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environ Mol Mutagen* 43: 179-185.

Pacchierotti F, Bassani B, Leopardi P, Zijno A. 1991. Origin of aneuploidy in relation to disturbances of cell-cycle progression. II: Cytogenetic analysis of various parameters in mouse bone marrow cells after colchicines or hydroquinone treatment. *Mutagenesis* 6:307-311.

Parra-Gámez L, Téllez-Girón J, Escobar C. 2003. La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. *Rev Fac Med UNAM* 46(1):32-36.

Parry E, Parry J, Corso C, Doherty A, Haddad F, Hermine T, Johnson G, Kayani M, Quick E, Warr T, Williamson J. 2002. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis* 17: 509-521.

Reichlmayr-Lais A, Kirchgessner M. 1981. Hematologic changes in nutritional lead deficiency. *Ann Nutr Metab* 25: 281-288.

Resnick O, Morgane P, Asno R, Millar M. 1982. Overt and hidden forms of chronic malnutrition in the rat and their relevance to man. *Neuroscience and Biobehavioral Rev* 6: 55-75.

Reyes H, Pérez-Cuevas R, Sandoval A, Castillo R, Santos J, Doubova S, Gutiérrez G. 2004. The family as a determinant of stunting in children living in conditions of extreme poverty: a case-control study. *BMC Public Health* 4:57.

Rice A, Sacco L, Hyder A, Black R. 2000. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bull WHO* 78:1207-1221.

Ruepp S, Tonge R, Shaw J, Wallis N, Pognan F. 2002. Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol Sci* 65:135-50.

Russell F, Shann F, Curtis N, Mulholland K. 2003. Evidence on the use of paracetamol in febrile children. *Bull WHO* 81:367-372.

Schlegel R, MacGregor J. 1982. The resistance of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mutat Res* 104:367-369.

Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9-15.

Senor K. 1995. Defending the use of animals to research human disease. *Mol Med Today* 5:220-225.

Serke S, Hunh D. 1992. Identification of CD71 (transferrin receptor) expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cyrometry (MP-FCM): correlation to the quantitation of reticulocytes as determined by conventional microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. *Br J Haematol* 81: 432-439.

Severin E, Beleuta A.1995. Induction of chromosome aberrations in vivo in bone-marrow cells of mice by paracetamol. *Rom J Morphol Embryol* 41:117-120.

Shelby R, Monier K, Sullivan K. 2000. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J Cell Biol* 151:1113-1118.

Shim H, Kim Y, Lee J, Ahn B, Kwon J, Kim W, Lee I, Lee M. 2004. Pharmacokinetics of intravenous and oral DA-8159, a new erectogenic, in rats with protein-calorie malnutrition. *JJP* 56:1543-1550.

Shindo Y, Hirano F, Maeda H, Takeda U. 1983. The micronucleus test with mouse spleen cells. *Mutat Res* 121: 53-57.

Skulman S, Wiren M, Garlick P, McNurlac M, Larsson J. 1994. Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. *J Hepatol* 21: 147-181.

Smith R. 1996. Toxic responses of the blood. *Toxicology, the basic science of poisons*. Casarett, Doull's. 5th edition. McGraw-Hill, N.Y. pp257-259.

Sorensen P, Jensen M. 1981. Cytogenetic studies in patients treated with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Mutat Res* 89:91-94.

Steinberg S, Campbell C, Rabinovitch P, Hillman R. 1980. The effect of trimethoprim/sulfamethoxazole on friend erythroleukemia cells. *Blood* 55:501-504.

Stoch M, Smythe P. 1963. Does undernutrition during infancy inhibit brain growth and subsequent intellectual development? *Arch Dis Child* 68:46-552.

Sullivan B, Blower M, Karpen G. 2001. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nature* 2:584-596.

Tavassoli M, Crosby W. 1973. Fate of the nucleus of the marrow erythroblast. *Science* 179:912-913.

Thompson O. 2000. La desnutrición infantil como un problema de Salud. *Rev Hosp Gral Dr M Gea González* 3:35-38.

Tomasz M, Chowdary D, Lipman R, Shimotakahara S, Veiro D, Walker V, Verdine G. 1986. Reaction of DNA with chemically or enzymatically activated mitomycin C: isolation and structure of the major covalent adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6702-6706.

Torous D, Dertinger S, Hall N, Tometsko C. 2000. Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: a flow cytometric study. *Mutat Res* 465:91-99.

Tortora G, Anagnostakos N. 1993. *Principios de anatomía y fisiología*. 6^a ed. Ed. HARLA. Méx. D.F. pag: 1027.

Vanderkerker K, Vanparys P, Verschaeve L, Kirsch-Volders M. 1989. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis* 4:6-11.

Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 244:95-103.

Vásquez E. 1998. Diagnóstico del estado nutricional en la infancia. *Acta Pediatr Mex* 19(S):1-11.

Veena P, Murthy P. 1994. Sister chromatid exchange frequency is elevated and cell proliferation is delayed in bone marrow cells of starved and marginally malnourished rats. *Mutat Res* 341: 101-108.

Vega-Franco L. 1999. Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteico-energética. *Salud Pública de Méx* 41:328-333.

Verschaeve L, Vanderkerken K, Kirsch-Volders M. 1988. C-banding as a simple tool to discriminate between micronuclei induced by clastogens and aneugens. *Stain Technol* 63:351-354.

Wickramasinghe S, Cotes P, Gill D, Tam R, Grange A, Akinyanju O. 1985. Serum immunoreactive erythropoietin in protein-energy-malnutrition. *Br J Haematol* 60: 515-24.

Widdowson E, McCance R. 1975. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res* 9:154-156.

Winick M, Noble A. 1966. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 89:300-306.

Yamamoto K, Kikuchi Y. 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res* 71:127-131.

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

Younghwa N, Ven-Shun L, Yuka N, Kenneth B, Harold K. 2001. Synthesis, DNA cross-linking activity, and cytotoxicity of dimeric Mitomycins. *J Med Chem* 44:3453-3462.