

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

1992 E

89636612



CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

ERITROCITOS MICRONUCLEADOS
EN SANGRE PERIFERICA EN EL
NIÑO ESPLENECTOMIZADO, CON
Y SIN QUIMIOTERAPIA
ANTINEOPLASICA

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

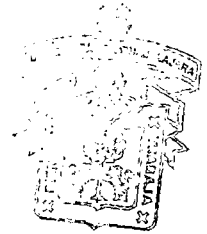
PRESENTA:

ANA LOURDES ZAMORA PEREZ

GUADALAJARA, JAL. FEBRERO DE 1998

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE MUTAGENESIS
DIVISION DE MEDICINA MOLECULAR.
CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE
OCCIDENTE
C. I. B. O.
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL
I. M. S. S.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

PRESENTA:

ANA LOURDES ZAMORA PEREZ

BAJO LA DIRECCION DE:

M. EN. C. OLIVIA TORRES BUGARIN

LA ASESORIA DE:

**M. EN. C. MARIA DE LA PAZ RAMIREZ
MUÑOZ**

CON LA COLABORACION DE :

DRA. AMPARO ESPARZA

DRA. BEATRIZ LOPEZ-GUIDO

Dr. en C. GUILLERMO ZUÑIGA GONZALEZ

**ERITROCITOS MICRONUCLEADOS
EN SANGRE PERIFERICA EN EL
NIÑO ESPLENECTOMIZADO, CON
Y SIN QUIMIOTERAPIA
ANTINEOPLASICA**

" Si pudiera decir con palabras
claras lo que siento, sería casi como
pensar claro ¿No es cierto? "

AGRADECIMIENTOS

A mi familia (Hector, Griselda, Xochitl) : Todo se los debo a ustedes, mil gracias por todo el apoyo y comprensión que recibí de cada cada uno de ustedes.

Dr. en C. Guillermo Zuñiga González : Por creer en mi y darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Mutagénesis y lo más importante por ser mi amigo.

Olivia Torres Bugarín : Torres que quieres que te diga, gracias a ti este trabajo esta listo.. Gracias por tu amistad, apoyo, y paciencia sobre todo lo primero. Eres un gran ejemplo para los que venimos empezando, muchas gracias Torres.

María de la Paz Ramírez Muñoz (Medi Piz):
Por tu paciencia (es de oro y casi me la acabo)
Este trabajo se entiende gracias a ti. Te agradezco tu amistad y apoyo en las buenas y en lasmalas.

A mis maestros: por todo los tipos de ejemplos (buenos y malos) que me sirvieron a formar un criterio..

MVZ Alberto Ramos: Por usted conocí el mejor lugar del C.I.B.O. el Laboratorio de Mutagénesis.

CONTENIDO

RESUMEN	2
ANTECEDENTES	5
• Prueba de micronúcleos	6
• Eritrocitos en mamíferos	12
• El bazo	14
• Quimioterapia antineoplásica	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
HIPOTESIS	32
OBJETIVOS	34
METERIAL Y METODO	36
RESULTADOS	40
• Cuadro I	42
• Cuadro II	43
• Cuadro III	44
• Cuadro IV	45
• Cuadro V	46
• Cuadro VI	47
• Gráfica I	48
• Gráfica II	49
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	55

CUBA



REPUBLICA CENTRAL

GLOSARIO

BIBLIOGRAFIA

CUCBA



57

60

BIBLIOTECA CENTRAL

RESUMEN

La prueba de micronúcleos sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas; mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas completos, que al quedar fuera del núcleo, forman estas estructuras. Por otra parte, el bazo elimina de la circulación los eritrocitos con anomalías, entre ellos los eritrocitos micronucleados (EMN), por lo que al esplenectomizar a un individuo, éstos se hacen evidentes.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el número de EMN en sangre periférica de niños esplenectomizados, con y sin quimioterapia antineoplásica (QA).

Se incluyeron en el estudio 56 muestras. Los frotis se tiñeron con Wright y Giemsa, se observaron al microscopio contando los EMN en 10,000 eritrocitos por muestra. Se revisaron los expedientes para clasificar las muestras en los 4 grupos de estudio: no esplenectomizados (con y sin QA) y esplenectomizados (con y sin QA).

Al hacer la comparación global de esplenectomizados vs no esplenectomizados, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$). No se encontró diferencia en el grupo no esplenectomizado con y sin QA. Al comparar el grupo esplenectomizado sin QA vs con QA, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$).

Se presenta también información sobre la micronucleogenicidad de los medicamentos administrados. Estos resultados revelan que el niño esplenectomizado es un bioindicador de agentes genotóxicos.

ANTECEDENTES

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

La contaminación en diferentes ciudades del mundo ha sido asociada con el incremento en el riesgo de contraer cáncer (1). Varias actividades humanas aumentan la contaminación; agentes físicos como las radiaciones pueden ocasionar daño celular y mutaciones (2,3), otros químicos, como los residuos de las minas, pesticidas, desechos urbanos, etc, pueden afectar ecosistemas marinos y subsecuentemente, dañar al hombre a través de cadenas tróficas (4). Extractos de partículas llevadas por el viento pueden producir tumores en ratones y existen evidencias que sugieren que el desarrollo de tumores es un proceso de múltiples etapas, que inicia con una mutación (5). Numerosos químicos medio ambientales e industriales causan daño genético en animales experimentales, el potencial para efectos similares en el hombre es obvio, así, el daño citogenético en el humano está generalmente asociado a algún padecimiento clínico.

Un primer paso para evitar el incremento del daño ecológico, es impedir la liberación de sustancias tóxicas al medio ambiente, mismas que pueden ser detectadas con organismos indicadores (4). El monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos, requiere de gran precisión y de un conocimiento amplio del contaminante a verificar; además, su evaluación está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado. Ante esto, los bioensayos ofrecen ventajas, ya que un organismo vivo puede procesar o metabolizar un compuesto a su forma tóxica (4).

El método clásico para detectar daño citogenético es el exámen de metafases de células tratadas *in vivo* o *in vitro* con el agente a probar, pero desafortunadamente, este estudio es costoso, consume mucho tiempo y la mayoría de las veces requiere de la observación de un gran número de metafases para poder concluir validez estadística (6,7).

PRUEBA DE MICRONUCLEOS.

La prueba de micronúcleos (MN) *in vivo* sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas completos, que al quedar fuera del núcleo, forman estas estructuras (8,9). La prueba permite detectar tanto agentes clastógenos (que rompen cromosomas) como aneuploidógenos (que afectan el huso mitótico) (7,10), pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN o por la presencia o ausencia de centrómero o cinetocoro (6,11) (Fig. 1a). En humanos, esta prueba es más sensible que el propio análisis cromosómico al fármaco Metotrexate, utilizado en el tratamiento del cáncer (12). La técnica de MN ha sido ampliamente aceptada y se realiza en diferentes especies y en gran variedad de tejidos (Fig. 1); es posible encontrar MN en eritrocitos policromáticos de médula ósea (8), cultivos de linfocitos de sangre periférica (9,13), en sangre periférica de ratones expuestos por lo menos cuatro días a un agente genotóxico (14). En

queratinocitos se ha demostrado utilidad para investigar tanto genotoxicidad como carcinogénesis, ya que la inducción de MN puede ser un signo inicial de cáncer de piel (15), en células de mucosa bucal, la presencia de MN se ha asociado a alteraciones citológicas en individuos fumadores (16,17), en células germinales, en las que de existir un daño genético, éste podría ser transmitido a la descendencia (18,19).

También se utilizan los hepatocitos de rata, induciendo la división celular mediante la extirpación de 2/3 del hígado o bien con promotores mitogénicos, facilitando la manifestación de MN en los hepatocitos nuevos cuando se exponen a agentes genotóxicos o carcinógenos (20-22).

Muchas sustancias mutagénicas u oncogénicas deben su acción a un producto posterior a su metabolismo en el hígado, por esta razón, cualquier prueba *in vitro* debe incluir un sistema de activación metabólica del compuesto original mediante una preparación de microsomas de hígado (5).

En la prueba de MN se utilizan principalmente animales de laboratorio, los más comunes son la rata (23), el ratón (10,24), el hámster (7) y algunos primates (25). Recientemente se ha propuesto al gato (26) así como a otros tipos de organismos vertebrados no mamíferos como los anfibios, cuyos eritrocitos son muy grandes y por lo tanto facilitan la observación de MN (27), o algunas aves, (28) (Fig. 1).

Por último, las plantas también son tomadas en cuenta como medios de prueba, ya que al igual que otros organismos, pueden manifestar daño por agentes contaminantes de efecto genotóxico con la formación de MN (29).

La formación de MN se basa en el siguiente principio (Fig. 2): en anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse al núcleo, pues carece del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático.

Después de la telofase, los cromosomas normales así como los fragmentos que posean centrómero darán origen a los núcleos de las células hijas, los elementos rezagados (fragmentos o cromosomas completos) quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una considerable proporción es transformada en uno o varios núcleos secundarios que son mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de MN (7).

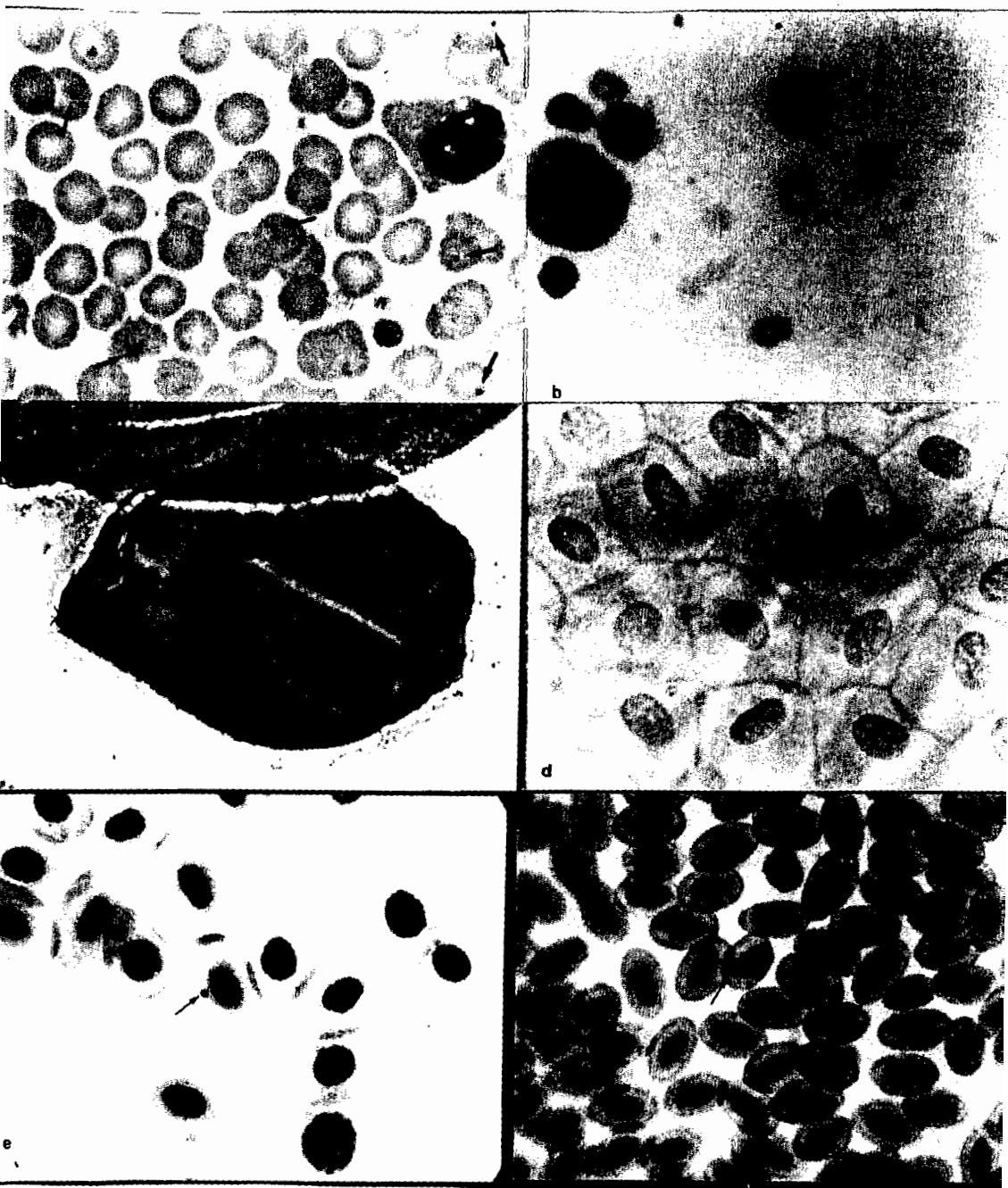


Figura 1. Micronúcleos en: a) Sangre periférica de humano esplenectomizado, diferente tamaño de micronúcleo, b) Medula ósea de ratón, c) Mucosa bucal de humano, d) Muda de Ambystoma, e) Sangre periférica de sapo, f) Sangre periférica de tortola.

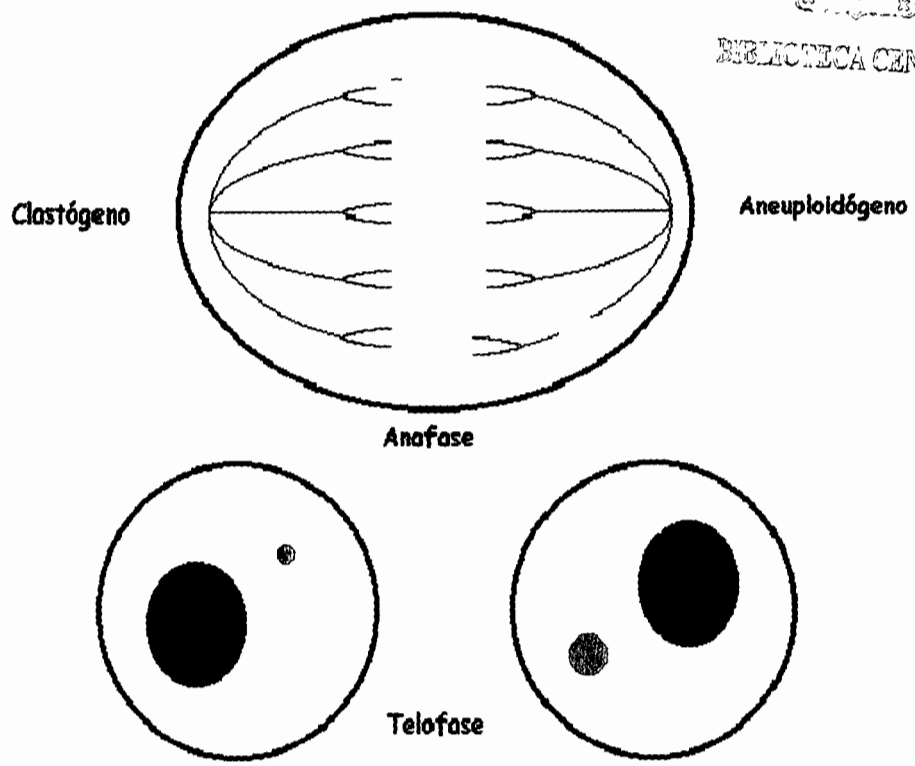


FIGURA 2. Formación de micronúcleos (ver texto).

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE MICRONUCLEOS.

Ventajas (6-8,24):

1. Facilidad y rapidez.
2. La abundancia de células analizables en diferentes períodos del ciclo celular.
3. La posibilidad de probar un sólo químico sin otros compuestos.
4. Los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase.

Desventajas (7,8):

1. No detecta agentes que no producen fracturas o rezagos anafásicos (esto es, aberraciones que no implican la ocurrencia de fragmentos acéntricos, como translocaciones e inversiones.)
2. No es útil en poblaciones celulares que no se dividen.
3. Puede dar resultados erróneos cuando se prueban carcinógenos organo-específicos o especie-específicos.
4. Puede dar falsos negativos en el caso de procarcinógenos y promutágenos que requieran activación metabólica en períodos cortos de exposición.

ERITROCITOS EN MAMIFEROS.

Los precursores nucleados del eritrocito, llamados normoblastos, se distinguen de otras células primitivas por su cromatina nuclear más densa, la ausencia de gránulos citoplasmáticos y, en las etapas tardías, por la aparición de hemoglobina en el citoplasma (30). Los normoblastos pierden su núcleo cuando pasan de la médula ósea al torrente circulatorio, debido a que los poros entre las células endoteliales de los sinusoides medulares tienen un diámetro menor que el núcleo esférico del normoblasto y como éste tiene que atravesar dichos poros, la membrana y el citoplasma, que son deformables, logran pasar, pero el núcleo queda atrapado (Fig. 3). La membrana se desgarró pero es reparada, mientras que el núcleo expulsado queda en la médula y es fagocitado por los macrófagos del estroma medular (31, 32). Aproximadamente 5 horas después de completar la última mitosis, los eritroblastos expelen su núcleo y los MN permanecen en el citoplasma (7,8).

En el humano, el eritrocito maduro es un disco bicóncavo, con un diámetro promedio de $8 \mu\text{m}$ y un espesor de $2 \mu\text{m}$ aproximadamente, su limitado metabolismo es apenas suficiente para sustentarlo durante los 120 ± 20 días que dura su vida en la circulación (30).

BIBLIOTECA CENTRAL

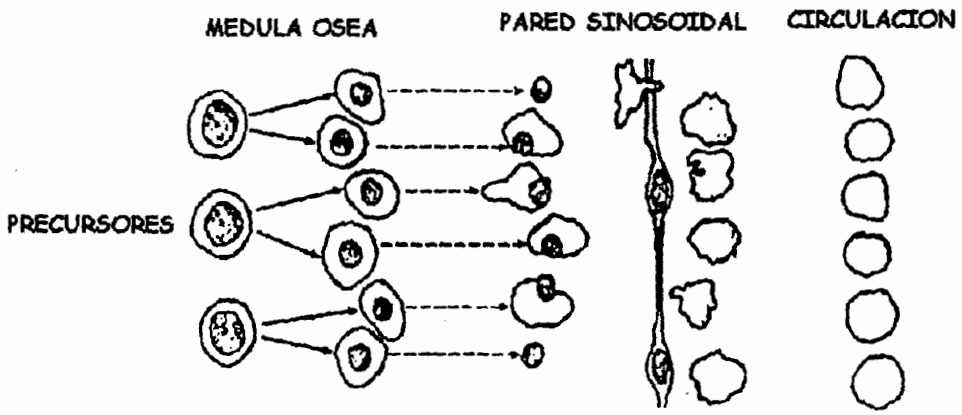


FIGURA 3. En mamíferos; de cada precursor eritroide se forma una progenie de 14 a 16, que más tarde pierde sus núcleos y se convierten en reticulocitos medulares y, después en reticulocitos circulantes y eritrocitos maduros. Estos últimos entran a la circulación como reticulocitos o eritrocitos policromaticos que contienen una pequeña cantidad de ARN residual para otras 24 horas.

El BAZO.

En hematología los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, cuya forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde $1/20$ a un $1/5$ del tamaño normal de un eritrocito.

Los MN son las anormalidades más características después de la esplenectomía, por lo que su presencia puede indicar un mal funcionamiento del bazo (8,33-36). Los hematólogos verifican el éxito de la esplenectomía mediante la observación de cuerpos de Howell-Jolly en los eritrocitos periféricos del paciente (35), si bien no se maneja un valor determinado de manera formal.

Siendo parte del sistema reticuloendotelial, el bazo participa en la eliminación de los eritrocitos con anormalidades, el control de calidad que ejerce el bazo sobre la masa de eritrocitos se manifiesta por el aumento de formas anormales circulantes después de la esplenectomía, aquí se incluyen residuos nucleares (cuerpos de Howell-Jolly), inclusiones de hemoglobina desnaturalizada (cuerpos de Heinz), siderocitos y células deformes o fragmentadas (37). En ausencia del bazo, el número de MN incrementa al ser expuesta una persona a quimioterapia antineoplásica (QA) (33,34).

El bazo es un órgano linfoide localizado por debajo del diafragma, en el hipocondrio izquierdo, a la altura de las costillas 9ª a 11ª. Es un órgano blando, vascular, cuyo peso y tamaño varían dependiendo de la especie. En el

humano, es considerado como la tercera línea de defensa, ya que los nódulos linfáticos (primera línea) son los primeros que establecen contacto con los agentes patógenos, cuando éstos logran pasar, continúan a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos (segunda línea), si logran atravesarlos, llegarán al bazo a través de la circulación sanguínea (31,32).

Las funciones del bazo son múltiples, pero pueden ser realizadas por otros órganos en ausencia de él (31,32):

1. Filtrar la sangre.
2. Eliminar partículas extrañas, mediante células fagocíticas.
3. Destruir o eliminar los eritrocitos viejos, o sus fragmentos.
4. Participa en el metabolismo del hierro.
5. Producción de bilirrubinas.
6. Es eritropoyético durante un periodo de la vida fetal, y después del nacimiento forma linfocitos y monocitos.
7. Al contraerse y relajarse, modifica su volúmen, permitiendo así que los eritrocitos sean expulsados a la circulación general.
8. Participa en las funciones inmunitarias.

Ciertos cambios morfológicos y la presencia de inclusiones intracelulares, proporcionan información respecto a la producción y destrucción celular, en especial del papel del bazo y el sistema reticuloendotelial en la depuración de los eritrocitos defectuosos. Cuando las células envejecen, ocurren

ciertos cambios que reducen su flexibilidad, esto dificulta el paso del eritrocito por la microcirculación, y en algún momento se produce lisis celular o fagocitosis y eliminación por el sistema reticuloendotelial. Aunque todas las células reticuloendoteliales participan en la destrucción de los eritrocitos viejos, las del bazo están situadas anatómicamente de tal modo que son los detectores más sensibles de cualquier anomalía eritrocitaria (30).

En el bazo, la sangre atraviesa la malla de la pulpa esplénica desde las arteriolas terminales. El flujo a través de la pulpa roja es lento y el volumen plasmático es mínimo, sometiendo a la maquinaria metabólica del eritrocito a mayor esfuerzo. Por último, para alcanzar la circulación venosa, el eritrocito debe estrecharse para pasar a través de un orificio pequeño (2-3 μm) en la pared sinusoidal (Fig. 4), ésta es la prueba final de flexibilidad del eritrocito (37).

Además de la prueba mecánica de flexibilidad celular, las células reticuloendoteliales reconocen a la globulina-anticuerpo en la superficie del eritrocito. Las células reticuloendoteliales esplénicas tienen receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina IgG, destruyen los eritrocitos recubiertos con IgG. Las células reticuloendoteliales del hígado y bazo reconocen al componente C3b del complemento en la superficie de una célula

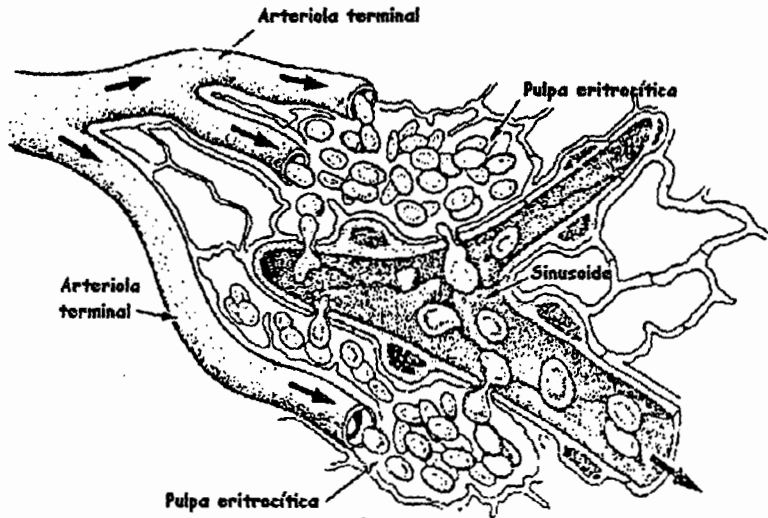


FIGURA 4. En el humano; el bazo se ocupa de descubrir los eritrocitos anormales y separarlos de la circulación. La estructura característica del bazo proporciona una prueba difícil para la viabilidad del eritrocito. Las células anormalmente rígidas o con inclusiones intracelulares son atrapadas por filtración y son fagocitadas por las células reticuloendoteliales sinusoidales.

Y aún en ausencia de cambios de flexibilidad, atrapan y fagocitan al eritrocito (37).

Con lo dicho anteriormente se comprende que al esplenectomizar a un paciente, ese control sobre los eritrocitos "anormales" queda únicamente supeditado al resto del sistema reticuloendotelial, el cual no es capaz de eliminar a todos los EMN, por lo que la cantidad de éstos aumenta (34).

Cuando los pacientes con problemas hematológicos (como púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica, leucemia granulocítica), no sanan aún después de recibir QA, son valorados para esplenectomía, ya que extirpar el bazo puede ser valioso en enfermedades donde la destrucción eritrocítica excesiva continúa a pesar del tratamiento (30), y la mayoría de las veces mejoran. Sin embargo, si los pacientes aún así no responden al tratamiento, siguen recibiendo algún tipo de medicamento que de alguna manera puede afectar al ADN (36, 38). Este grupo de pacientes es muy numeroso.

QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLASICA.

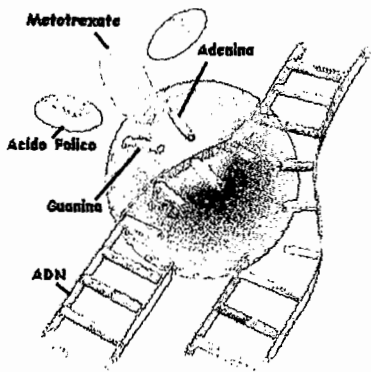
Los mecanismos de acción de los diferentes agentes químicos que causan rompimientos cromosómicos varían; algunos afectan a los grupos sulfhidrilo de proteínas, mientras otros actúan sobre los puentes de hidrógeno de los

ácidos nucleicos, o afectan el sistema de óxido-reducción dentro del núcleo (39).

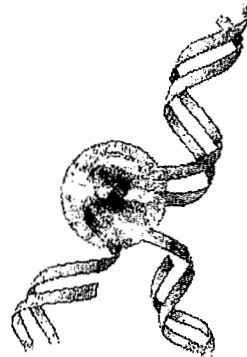
La mayor parte de los medicamentos que afectan la síntesis o la función del ADN, se han ensayado buscando actividad anticancerosa (40); en resumen, existen fármacos o compuestos que ejercen su acción de diferente manera, por consiguiente están clasificados según sus mecanismos de acción. Estos mecanismos varían y pueden producir efectos diferentes sobre las células normales y cancerosas, según el lugar de origen de la célula (41,42):

1. **Antimetabolitos:** Algunos compuestos anti-cancerígenos actúan como sustancias análogas en las reacciones bioquímicas. Como ejemplo tenemos al Metotrexate, el cual es análogo del ácido fólico, se une a una enzima (naranja) involucrada normalmente en la conversión del ácido fólico en adenina y guanina, inhibiendo así la síntesis de nuevo ADN (Fig. 5a).
2. **Inhibidores de la Topoisomerasa:** La replicación del material genético requiere que la cadena de ADN se separe. Esta separación se lleva a cabo con la ayuda de un enzima especial llamada Topoisomerasa (naranja) que rompe temporalmente una de las hebras, pasa la otra hebra a través de la ruptura y posteriormente reúne los extremos rotos. Los medicamentos que inhiben la capacidad de la topoisomerasa de reunir los extremos rotos provocan rompimientos permanentes que ocasionan la muerte celular (Fig. 5b).

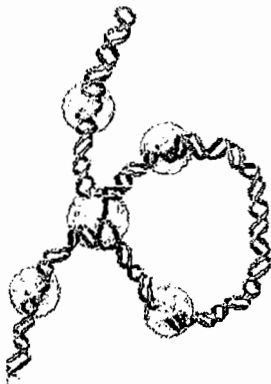
3. **Agentes Alquilantes:** Ciertos compuestos forman uniones químicas con bases específicas del ADN y producen alteraciones en la estructura normal de doble hélice de la molécula. Estas alteraciones pueden reflejarse en rompimientos y uniones inapropiadas entre o dentro de las cadenas. Si no son corregidas por los mecanismos de reparación del ADN, el daño causado provocará la muerte celular (Fig. 5c).
4. **Derivados de Plantas:** Ciertas sustancias inhiben la división celular al unirse a la proteína tubulina. La tubulina, como su nombre lo indica, forma fibras microtubulares (rosa) que ayudan a dirigir la división celular. Estas fibras jalan a los cromosomas duplicados a cada lado de la célula parental, asegurando que cada célula hija reciba un juego completo de cromosomas. Los medicamentos que interfieren con el ensamblaje o desensamblaje de estas fibras de tubulina pueden evitar una división celular exitosa. (Fig. 5d).
5. **Hormonales:** Es conocido que las hormonas forman un complejo móvil esteroide-receptor que se une directamente al ADN en el núcleo y altera la transcripción de los genes estructurales o reguladores (Fig 6).



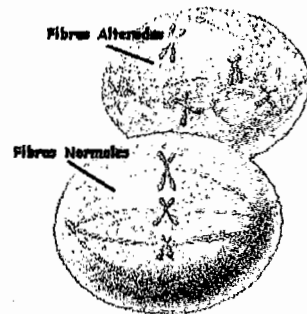
a



b



c



d

FIGURA 5. Mecanismos de acción de las diferentes drogas antineoplásicas: a) Antimetabolitos, b) Inhibidores de la Topoisomerasa, c) Agentes Alquilantes, d) Derivados de Planta.

BIBLIOTECA CENTRAL

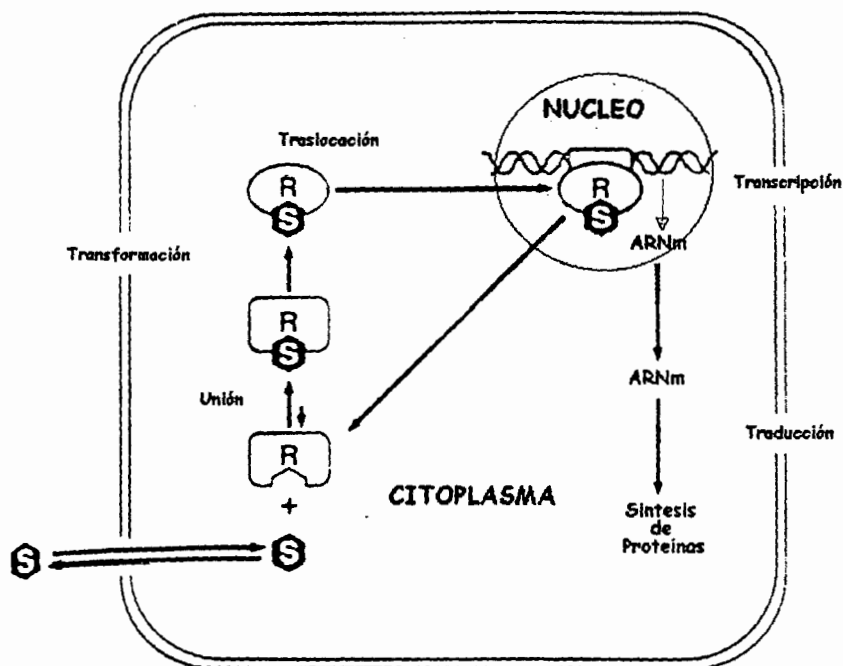
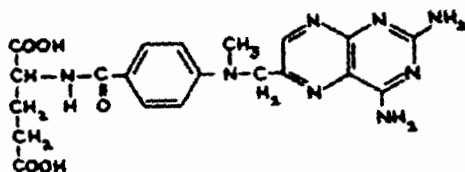


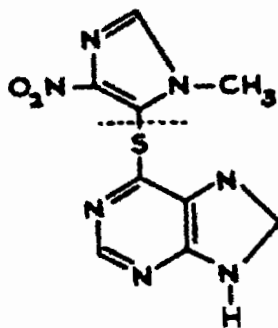
Figura 6. Mecanismos de Acción de las Hormonas Esteroides.

A continuación se describen algunos de los compuestos importantes en este estudio:

- **Metotrexate:** Agente clastógeno (19,43), antimetabolito (Fig. 5a). Es usado en una gran variedad de enfermedades neoplásicas tales como: carcinosarcoma, carcinoma de cérvix, leucemia aguda, cáncer de mama, entre otras. Sus principales efectos tóxicos se observan en depresión de la médula ósea, leucopenia y trombocitopenia (42).

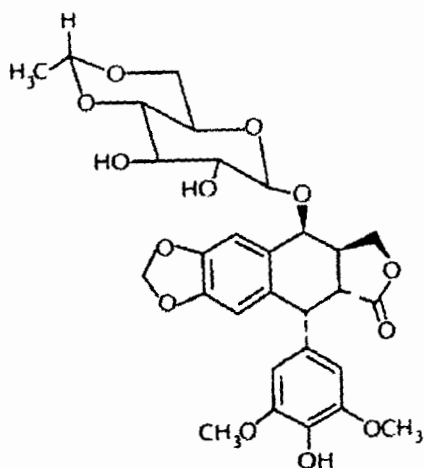


- **Azatriopina.** Es un imidazol derivado de la mercaptopurina y funciona como un análogo estructural o antimetabolito (Fig. 5a). Es utilizado en humanos como un inmunosupresor o agente modulador en el tratamiento



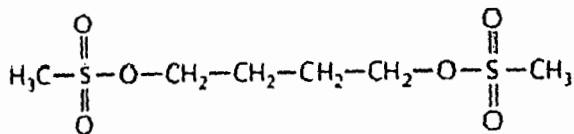
de la púrpura trombocitopénica idiopática y en las anemias hemolíticas autoinmunitarias. Su principal efecto tóxico es la depresión de la médula ósea (44).

- **Etopósido (VP16):** Derivado de la planta *Podophyllum pletatum*, agente clastógeno, inhibidor de la topoisomerasa (Fig. 5b). Se utiliza principalmente en el tratamiento de tumores testiculares, linfoma de Hodking, cáncer de mama, sarcoma de Kaposi.

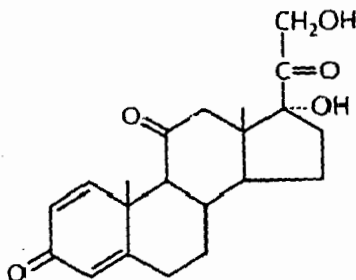


Su mayor efecto tóxico se ve reflejado en la mielosupresión, leucopenia, trombocitopenia, así como náuseas y diarrea (42). En roedores, el etopósido induce MN en médula ósea así como en células germinales (45) y en el humano se ha descrito como leucemiogénico (46).

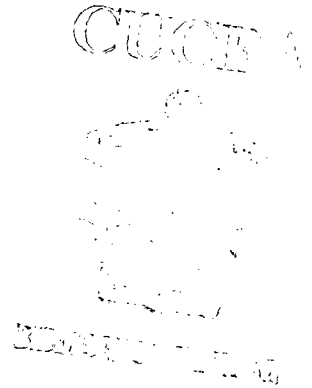
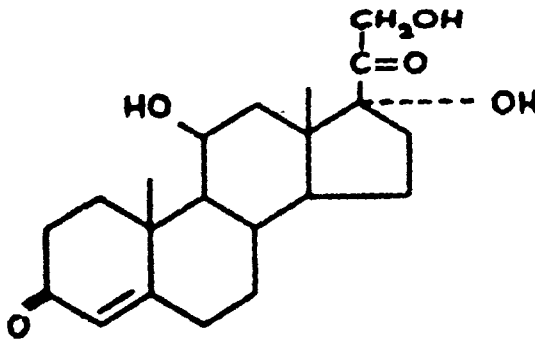
- **Busulfán:** Agente alquilante (Fig. 5c). Este radiomimético, es un mutágeno que pertenece al grupo de los clastógenos (11). Se utiliza en una gran variedad de enfermedades hemáticas malignas y tumores sólidos. Su mayor efecto tóxico se ve reflejado en la mielosupresión, infiltración pulmonar, así como náuseas, vómitos, diarrea, impotencia, esterilidad, amenorrea (42).



- **Prednisona:** Es una hormona esteroide que se utiliza principalmente en el tratamiento de cáncer de mama, sus principales efectos tóxicos se observan en alteración de la conducta, osteoporosis, cataratas, mayor susceptibilidad de infecciones y tuberculosis (42).



- **Hidrocortisona:** Potente glucocorticoide anti-inflamatorio que se utiliza principalmete en el tratamiento de reacciones alérgicas, neoplasias e insuficiencia adrenal (42).



En resumen, existen fármacos o compuestos que en dosis terapéuticas son tóxicos para las células de rápida división (36). Sus principales efectos tóxicos, se producen en:

- 1) Médula ósea y tejido linforreticular (mielosupresión e inmunosupresión).
- 2) Mucosa gastrointestinal (estomatitis, diarrea, hemorragia, septicemia).
- 3) Folículos pilosos (alopecia).
- 4) Testículo (esterilidad y mutaciones).
- 5) Feto (teratogénesis y abortos).
- 6) Cicatrización retardada.

Las teorías actuales tienden a considerar a la oncogénesis y la mutagénesis como expresiones diferentes de un mismo mecanismo básico. La mayor parte de los agentes oncógenos pueden causar mutaciones y se ha demostrado que muchos mutágenos producen tumores en condiciones de prueba apropiadas (40).

Pocos agentes químicos han sido estudiados en humanos utilizando médula ósea o linfocitos de sangre periférica para la prueba de MN (9). En estudios realizados en adultos esplenectomizados, se encontró un aumento significativo de EMN, al comparar un grupo con QA contra un grupo sin medicamento; obteniéndose 66.96 ± 18.25 y 29.15 ± 7.11 EMN/10,000 eritrocitos respectivamente, que son valores altos en relación con los encontrados en pacientes con bazo y QA: 2.5 ± 1.52 (34).

**VALORES PROMEDIO DE EMN EN ADULTOS ESPLENECTOMIZADOS,
CON Y SIN QA**

No Esplenectomizados	Esplenectomizados	
Con QA	Sin QA	Con QA
n=6	n= 26	n=23
$\bar{X} = 2.5 \pm 1.52$	$\bar{X} = 29.15 \pm 7.11$	$\bar{X} = 66.96 \pm 18.25$

Con el objeto de conocer el efecto de mutágenos en niños esplenectomizados mediante la prueba de MN, se obtuvieron 56 muestras de sangre periférica, de las cuales 29 correspondían a pacientes no

esplenectomizados y 27 a pacientes esplenectomizados con y sin QA respectivamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

CUCBA



BIBLIOTECA GENERAL

El niño esplenectomizado presenta un alto número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica. Los valores en los niños esplenectomizados que reciben quimioterapia antineoplásica ¿ Serán aún más altos ?

HIPOTESIS

El niño esplenectomizado que recibe quimioterapia antineoplásica presenta mayor número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica que el niño esplenectomizado que no recibe quimioterapia antineoplásica.

OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

BIBLIOTECA CENTRAL

- 1.0 Comparar el número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de niños esplenectomizados con y sin quimioterapia antineoplásica.**

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Valorar la micronucleogenicidad de la quimioterapia antineoplásica utilizada en el niño esplenectomizado con problemas hematológicos.**
- 1.2 Comparar la frecuencia de eritrocitos micronucleados de niños esplenectomizados contra datos previos de adultos esplenectomizados.**

MATERIAL Y METODO

• OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Se obtuvieron 96 muestras de sangre periférica (con EDTA como anticoagulante) de 49 pacientes del Servicio de Hematología de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente, I.M.S.S. Los cuales fueron de ambos sexos, de 1 a 18 años de edad.

Las muestras fueron colectadas y registradas, se elaboraron dos frotis de sangre por cada muestra, dejándose secar a temperatura ambiente por 24 horas. Se tiñeron con Wright (3 minutos) y Giemsa (3 ml en 50 ml de buffer de fosfatos pH 6.8 durante 10 minutos) de la manera convencional para una diferencial leucocitaria utilizada en hematología (8). Se observaron al microscopio con el objetivo 100x de inmersión y se contaron 10,000 eritrocitos por muestra (el segundo frotis se archivó para ser utilizado sólo en caso necesario) (Fig. 6).

Los expedientes de cada paciente fueron exhaustivamente revisados para determinar el tipo de medicamento y dosis de QA.

• CRITERIOS DE INCLUSION.

Muestras de sangre periférica de niños atendidos por el Servicio de Hematología de Pediatría, del Centro Médico Nacional de Occidente, I.M.S.S.

• CRITERIOS DE EXCLUSION.

Se excluyeron aquellas muestras de las que no fué posible conseguir la información necesaria para su clasificación en alguno de los grupos de estudio, niños que fueron esplenectomizados como consecuencia de un traumatismo, transfundidos y autoesplenectomizados.

• GRUPOS DE ESTUDIO:

De las 96 muestras obtenidas, se utilizaron 56, con las que se formaron los siguientes grupos:

Grupo 1. No Esplenectomizados sin QA, 14 muestras de 13 pacientes.

Grupo 2. No esplenectomizados con QA, 15 muestras de 13 pacientes.

Grupo 3. Esplenectomizados sin QA, 16 muestras de 10 pacientes.

Grupo 4. Esplenectomizados con QA, 11 muestras de 6 pacientes .

• TIPO DE ESTUDIO.

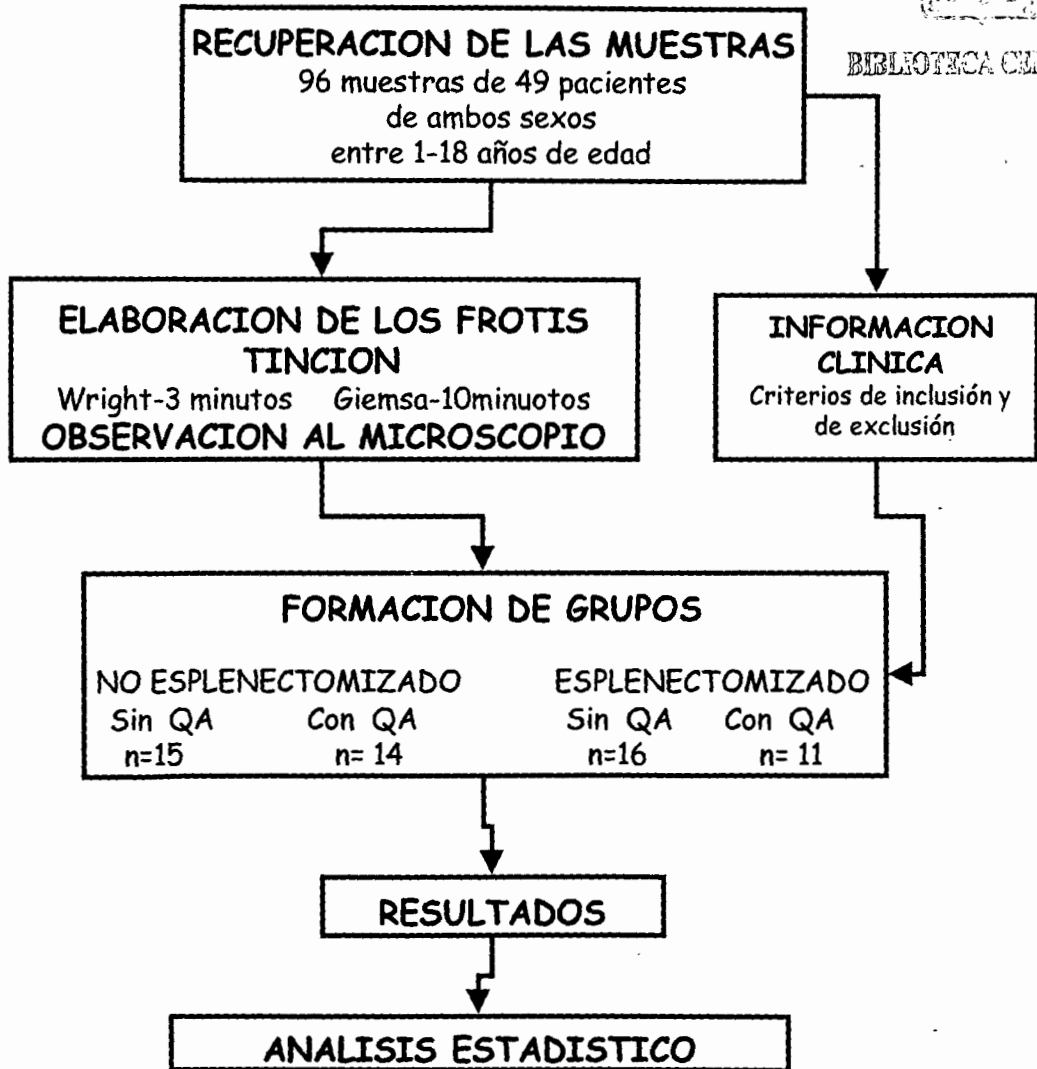
Retrospectivo y observacional.

• ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de la prueba "t" de Student para muestras independientes.

FIGURA 7

METODOLOGIA



RESULTADOS

En el cuadro I se puede apreciar el número de EMN en cada muestra obtenida de los 49 pacientes, así como los padecimientos de éstos. Se obtuvieron 96 muestras, de las cuales, 40 fueron excluidas del estudio.

El Cuadro II presenta los datos de los pacientes esplenectomizados que no recibían QA. Los valores de EMN más altos se encontraron en una muestra que no tenía ningún tipo de tratamiento (paciente 21), así como en las muestras con Ac. Valproico + Metilfenidato (paciente 6) y con Penicilina + Ambroxol (paciente 15), mientras que los valores más bajos se encontraron en muestras sin tratamiento (pacientes 6 y 24) y una muestra con Naproxeno (paciente 6).

Al hacer el análisis por diagnóstico, el valor más alto de EMN se encontró en los pacientes con Esferocitosis y Linfoma de Hodking (19.3 EMN) y el valor más bajo en el paciente con β -talasemia (8 EMN) (Cuadro III). Sin embargo, para poder determinar si el número de EMN es constante para cada enfermedad y cual de estas presenta el valor mas alto, es necesario captar un mayor número de pacientes.

En el Cuadro IV se muestran los datos de los pacientes esplenectomizados que recibían QA durante la toma de las muestras. Los valores más altos de EMN se encontraron en muestras con Metotrexate + Prednisona (paciente

9), seguido por la de Azatriopina + Prednisona (paciente 7), mientras que el valor más bajo se encontró en la de Etopósido + Metilprednisolona (paciente 19).

Las pruebas estadísticas (Cuadro V) mostraron que al comparar los valores globales de pacientes no esplenectomizados vs esplenectomizados, existe diferencia estadísticamente significativa con $P < 0.001$ (Gráfica 1). No se encontró diferencia entre los pacientes no esplenectomizados con y sin QA, sin embargo, entre los pacientes esplenectomizados con y sin QA se observó una diferencia estadísticamente significativa con $P < 0.001$ (Cuadro V, Gráfica 2).

Los niños esplenectomizados mostraron valores de EMN significativamente más bajos que los adultos (Cuadro VI), tanto al comparar esplenectomizados sin QA ($P < 0.001$), como esplenectomizados con QA ($P < 0.001$).

CUADRO I

DIAGNOSTICO, MUESTRAS OBTENIDAS Y EMN DE LOS PACIENTES

Paciente	Diagnóstico	Número de Muestras	EMN /10,000 Eritrocitos/Muestra	\bar{X} de EMN
1	Linfoma de Hodking	6	1*, 2*, 3°, 2*, 0°, 0°	1.3 ± 1.21
2	β -talasemia	2	0,4	2 ± 2.82
3	β -talasemia	2	2,4	3 ± 1.41
4	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	1	6°	6 ± 0
5	Esferocitosis	1	1	1 ± 0
6°	Leucemia Granulocítica Crónica / Síndrome convulsivo	12	44*, 29, 40, 44*, 14, 4, 23*, 11, 3, 4, 39°, 11°	22 ± 16
7°	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	6	25, 24, 46*, 20, 7, 7	21.5 ± 14
8°	Diabetes Mellitus/ β -talasemia / Hemocromatosis Hepática	8	8 [∇] , 29°, 9°, 3 [∇] , 102, 65°, 18°, 29 [∇]	35.37 ± 32.81
9°	Anemia Hemolítica	4	90*, 79°, 3°, 89*	65 ± 41.79
10°	Linfoma de Hodking	1	18	18 ± 0
11°	Anemia Hemolítica	6	⊕20, 13, 6, 17, 21, 11	14.66 ± 5.75
12°	Linfoma de Hodking	1	3*	3 ± 0
13°	Linfoma de Hodking	2	14°, 20°	17 ± 4.24
14°	Anemia Hemolítica/ Esferocitosis	1	12°	12 ± 0
15°	Esferocitosis	2	18, 27	22.5 ± 6.36
16	β -talasemia	2	6, 1	6 ± 0
17	β -talasemia	2	3, 0	3 ± 0
18	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	3	17 [∇] , 6°, 27°	16.6 ± 10.5
19°	Linfoma de Hodking	1	13*	13 ± 0
20°	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	2	8, 39	23.5 ± 21.9
21°	Linfoma de Hodking	1	37	37 ± 0
22	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	2	14, 0	14 ± 0
23°	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	1	8	8 ± 0
24°	Linfoma de Hodking	2	4°, 26°	15 ± 15.5
25°	Anemia Hemolítica/Talasemia	1	1 [∇]	1 ± 0
26	Anemia/Deficiencia de Hierro	1	0	0 ± 0
27	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	1	0	0 ± 0
28°	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	1	42*	42 ± 0
29	Linfoma de Hodking	1	0*	0 ± 0
30°	Esferocitosis	1	13	13 ± 0
31	Esferocitosis	1	0	0 ± 0
32	Esferocitosis	1	0	0 ± 0
33	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	1	0*	0 ± 0
34	Anemia	1	0	0 ± 0
35	Púrpura Trombocitopénica Idiopática Crónica	1	2°	2 ± 0
36	Leucemia	1	0*	0 ± 0
37	Anemia Hemolítica / Esferocitosis Hereditaria	1	0	0 ± 0
38	Aplasia Medular Severa	1	0	0 ± 0
39	Hemofilia	1	0	0 ± 0
40	Anemia Hemolítica	1	0	0 ± 0
41	Leucemia Linfoblástica	1	0*	0 ± 0
42	Leucemia Linfoblástica Aguda	1	0*	0 ± 0
43	Histiocitosis	1	0	0 ± 0
44	Leucemia Linfoblástica Aguda	1	0*	0 ± 0
45	Leucemia Linfoblástica Aguda	1	0*	0 ± 0
46	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	1	0	0 ± 0
47	Leucemia Linfoblástica Aguda	1	0*	0 ± 0
48	Leucemia Linfoblástica Aguda	1	0*	0 ± 0
49	Leucemia Linfoblástica Aguda	1	0*	0 ± 0
		Total: 96		

EMN Eritrocitos micronucleados

* Con QA
♣ Bazo remanente

⊙ Esplenectomizados
◊ Sin datos

∇ Transfundidos
⊕ Autoesplenectomia

CUADRO II
EMN en Pacientes Esplenectomizados
sin Quimioterapia Antineoplásica

Paciente	Edad	Sexo	EMN/10,000	Tratamiento
6	12	M	29	23 días de estar recibiendo Ac. Valproico (1-1-1) Metilfenidato (1-1-0)
			14	20 días de estar recibiendo Ac. Valproico (400mg)
			11	28 días de haber suspendido el Busulfán y 20 días de estar recibiendo Ac. Valproico (400mg)
			3	30 días sin tratamiento
			4	8 días de estar recibiendo Naproxeno (250 mg cada 8h)
7	17	F	20	30 días de estar recibiendo Danazol (50 mg cada 12h)
			7	15 días de estar recibiendo Danazol (100mg cada 12 h)
8	15	F	8	Tratamiento quelante para hierro-postransfucional
10	17	M	17	5 años sin quimioterapia antineoplásica
14	11	M	12	44 días de estar recibiendo Penicilina Procaínica cada 24h y Ambroxol
15	10	M	18	26 días de estar recibiendo Penicilina y Ambroxol
			27	26 días de estar recibiendo Penicilina y Ambroxol
21		F	37	Sin quimioterapia antineoplásica /asintomático
23	12	F	8	5 años sin quimioterapia antineoplásica
24	17	M	4	Sin tratamiento/ asintomático
30	14	F	13	30 días sin tratamiento/asintomático

CUADRO III
Número de Muestras por Diagnóstico y EMN
en Pacientes Esplenectomizados sin QA

PACIENTE	DIAGNOSTICO	NUMERO DE MUESTRAS	\bar{X} de EMN
15	Esferocitosis	2	19.3 ± 7.1
30		1	
10	Linfoma de Hodking	1	19.3 ± 7.1
21		1	
24		1	
6	Leucemia Granulocítica Crónica	5	12.2 ± 10.5
14	Anemia Hemolítica	1	12.0 ± 0
7	Púrpura Trombocitopénica Idiopática	2	11.6 ± 7.2
23		1	
8	β-talasemia	1	8 ± 0

CUADRO IV

EMN en Pacientes Esplenectomizados con Quimioterapia Antineoplásica

Paciente	Edad	Sexo	EMN/10,000	Tratamiento
6	12	M	44	10 días de haber suspendido Busulfán (1mg x3 capsulas/24h)
			44	22 días de estar recibiendo Busulfán (2mg /24 h)
			23	57 días de estar recibiendo Busulfán (1 mg /12 h)
20	9	F	39	33 días de estar recibiendo Hidrocortisona (300 mg IV)
7	17	F	24	Azatriopina 1/24h
			25	30 días de estar recibiendo Azatriopina 1/24h
			46	39 días de estar recibiendo Azatriopina(50 mg/24h), Prednisona (5mg /72h) y Sulfato ferroso 3 veces al día.
9	9	F	90	30 días de estar recibiendo Metotrexate (2.5 mg/24h), Prednisona(12.5 mg /24h)
			89	59 días de estar recibiendo Metotrexate (2.5 mg), Prednisona (12.5 mg/24h)
19	17	F	13	35 días de estar recibiendo Etopósido (200 mg IV) y Metilprednisolona (400 mg IV)
28	8	M	42	63 días de estar recibiendo Prednisona (25 mg/24 h)

CUADRO V

EMN en los Diferentes Grupos de Estudio

No Esplenectomizados		Esplenectomizados	
$n = 29$		$n = 27$	
$\bar{X} = 0.76 \pm 1.27$		$\bar{X} = 26.33 \pm 22.59$	
$*P < 0.001$			
Sin QA	Con QA	Sin QA	Con QA
$n = 14$	$n = 15$	$n = 16$	$n = 11$
$\bar{X} = 0.43 \pm 0.76$	$\bar{X} = 1.7 \pm 1.58$	$\bar{X} = 14.50 \pm 9.78$	$\bar{X} = 43.55 \pm 25.17$
$*NS$		$*P < 0.001$	

n = Número de muestras

* = t de student para muestras independientes.

NS = No significativo

Los valores están expresados en $\bar{X} \pm$ desviación estándar

CUADRO VI

Comparación del Número de EMN en Niños
y Adultos Esplenectomizados

Sin QA		Con QA	
NIÑOS	• ADULTOS	NIÑOS	• ADULTOS
n= 16	n= 26	n= 11	n= 23
$\bar{X}= 14.50 \pm 9.78$	$\bar{X}= 29.15 \pm 7.11$	$\bar{X}= 43.55 \pm 25.17$	$\bar{X}= 66.96 \pm 18.25$
*P<0.001		*P<0.001	

n= Número de muestras

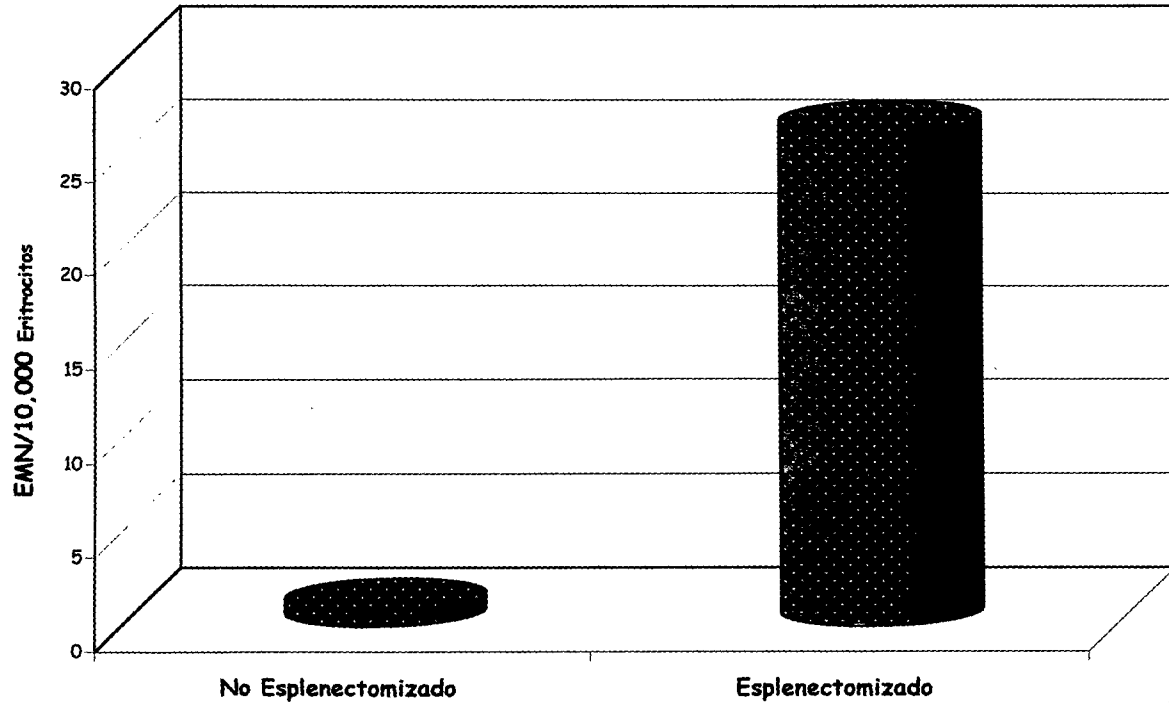
*= t de student para muestras independientes

NS= No significativo

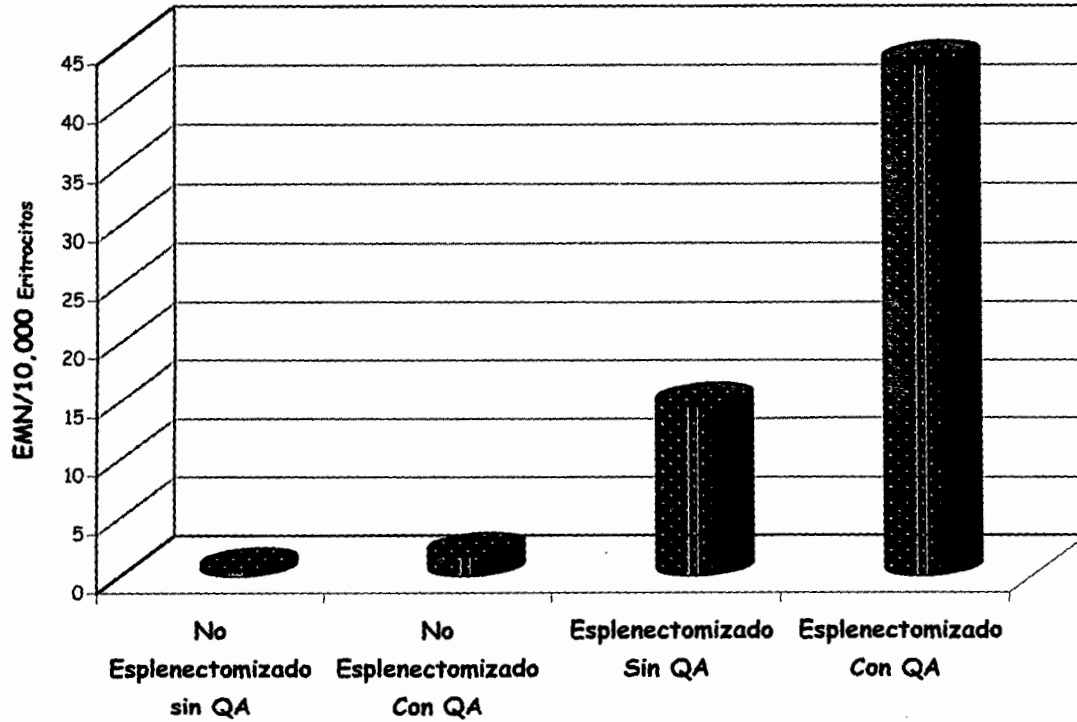
• = Datos publicados previamente (34)

Los valores están expresados en $\bar{X} \pm$ desviación estándar

GRAFICA I
EMN en Niños con y sin Bazo

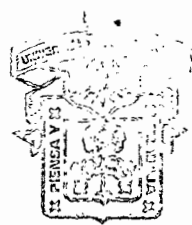


GRAFICA II
EMN en los Diferentes Grupos de Estudio



DISCUSION

CERCOJA



BIBLIOTECA CENTRAL

Las muestras de niños esplenectomizados como consecuencia de un traumatismo o autoesplenectomizados fueron excluidas del estudio debido a posible esplenosis (implantación de bazos accesorios), ya que estos niños presentan función esplénica residual, por lo que eliminan de su circulación los EMN. También se excluyeron las muestras de niños transfundidos debido a que las muestras quedan diluidas.

Al no encontrar diferencia estadísticamente significativa entre los niños no esplenectomizados, sin y con QA, se corrobora que el bazo elimina de la circulación los EMN. Las diferencias encontradas en el grupo de niños esplenectomizados, con y sin QA, demuestra que el niño sin bazo, al igual que el adulto (34), son indicadores de genotóxicos micronucleogénicos. Además, se cuenta con 2 casos de los cuales obtuvimos muestras del mismo paciente, sin y con QA:

Paciente 6	Sin QA	29	14	11	4	3
	Con QA	44	44	23		
Paciente 7	Sin QA	20	7			
	Con QA	46	25	24		

Donde se puede apreciar que los valores de EMN son mayores cuando el paciente se expone a QA.

Por otra parte, cuando el paciente 6 no recibía QA, estaba expuesto a otros medicamentos de desconocida micronucleogenicidad (Cuadro II), al recibir Ac. Valproico + Metilfenidato presentó 29 EMN, a diferencia de la muestra sin tratamiento que presentó 3 EMN, lo que hace pensar que estos medicamentos podrían tener efecto micronucleogénico.

El paciente 21 (Cuadro II) presentó 37 EMN aún sin recibir ningún tipo de medicamento, por lo que tal vez en el medio en que vive (Uruapan, Michoacán), estuvo expuesto a algún agente micronucleogénico no identificado.

Como se esperaba, los medicamentos descritos como micronucleogénicos: Metotrexate (12,43), Busulfán (11), Hidrocortisona (47), mostraron un elevado número de EMN (Cuadro IV).

Por otra parte, la Prednisona, hormona no considerada como micronucleogénica, mostró capacidad para incrementar el número de EMN a una dosis de 25 mg/24 h (paciente 28). Sin embargo, a dosis de 5 mg/24 h, en combinación con Azatriopina se observó un alto número de EMN, probablemente esto se deba a un efecto sinergista, ya que se cuenta con muestras del mismo paciente únicamente con azatriopina, donde el número de EMN es aproximadamente 50% menor (paciente 7) (Cuadro IV).

El Etopósido y la Metilprednisolona, descritos en roedores como micronucleogénico y fragmentador de ADN respectivamente (42,45), no mostraron tal efecto (paciente 19, Cuadro IV). Las dosis de Etopósido a la que encuentran efecto va desde 5 hasta 10 mg/kg (45), mientras que el niño recibió 6 mg/kg, es posible que este compuesto sea especie-específico, o que la dosis de 6 mg/kg no es micronucleogénica en humanos, por lo que es importante continuar con el estudio de este medicamento.

Es relevante resaltar que los niños presentaron valores de EMN más bajos que los adultos (Cuadro VI), una explicación a esto es que probablemente en los niños los sistemas de reparación del ADN son más eficientes (48), por otra parte se sabe que al envejecer el daño al ADN se acumula (49).

Como resultado de los datos aportados en el presente trabajo, se ampliará el estudio de la micronucleogenicidad de hormonas como la Prednisona y la Hidrocortisona, así como el Etopósido y el Acido Valproico.

CUCUTA



BIBLIOTECA CENTRAL

CONCLUSIONES

- ✓ El número de EMN en el niño esplenectomizado, al ser expuesto a QA incrementa significativamente.
- ✓ La Prednisona resultó ser micronucleogénica.
- ✓ El Etopósido, descrito como micronucleogénico, no resultó tal en el presente estudio.
- ✓ El Acido Valproico, medicamento anticonvulsivante indujo la formación de EMN.
- ✓ Los valores de EMN en niños esplenectomizados son menores que los descritos en adultos.

GLOSARIO

- **Anafase.** Tercera etapa de la mitosis o de la meiosis (I o II) durante la cual los cromosomas emigran hacia los polos opuestos de la célula.
- **Aneuploidógeno.** Agente capaz de producir en la célula que uno o más cromosomas completos de un conjunto normal falten o se presenten más de una vez.
- **Antineoplásica.** Inhibe o impide la evolución de neoplasia; que restringe la maduración y la proliferación de células .
- **Bioensayo.** Determinación del poder activo de una muestra de droga por comprobación de su efecto sobre un organismo vivo o un preparado aislado de órgano.
- **Biomonitor.** Organismo utilizado para detectar algún tipo de contaminante.
- **Carcinógeno.** Cualquier agente que produce cáncer.
- **Centrómero.** Pequeña masa de cromatina situada en el interior de un cromosoma y a la que se unen las dos cromátides. El centrómero ocupa una posición característica en todo cromosoma. Es la última parte del cromosoma que se divide y por medio de la cual se fija al huso.
- **Clastógeno.** Agente capaz ocasionar rupturas en el ADN.
- **Cromosoma.** Cuerpo constituido por ADN incluido dentro de una trampa proteica; son los portadores de la información genética. Se hallan en el núcleo de la célula y pueden observarse como estructuras intensamente teñidas en forma de bastón o de J durante la división celular.
- **Esplenectomía.** Escisión o extirpación del bazo.
- **Esplenosis.** Aparición de bazos accesorios como resultado de esplenectomía por trauma.
- **Genotóxico.** Agente que afecta al ADN.

- **Micronúcleo.** Fragmento de un cromosoma o cromosoma completo que por alguna causa no puede ser integrado al núcleo quedando en el citoplasma celular
- **Micronucleogénico.** Agente formador de micronúcleos.
- **Mitógeno.** Sustancia que estimula la mitosis de las células.
- **Mutación.** Cambio permanente y heredable del material genético. Definido comúnmente como un cambio en un solo gen (mutación en un punto), aún cuando el término se usa también para designar un cambio en el número o disposición de los cromosomas.
- **Quimioterapia.** Tratamiento de las enfermedades por agentes químicos.
- **Telofase.** Periodo de la división celular donde los cromosomas de las células hijas alcanzan los polos de la célula.

BIBLIOGRAFIA

1. Perera FP, Hemminki K, Gryzbouska E, Motykiewicz G, Michalska J, Sautella RM, Young TL, Dickey C, Brandt-Ranf P, De Vivo I, Blaner W, Tsail WY, Chorazy M. **Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland.** *Nature* 1992; 360: 256-258.
2. Schull WJ. **Late radiation responses in man: current evaluation from results from Hiroshima and Nagasaki.** *Adv Space Res* 1983; 3: 231-239.
3. Martin RH, Hildebrand K, Yamamoto J, Rademaker A, Barnes M, Douglas G, Arthur K, Ringrose T, Brown IS. **An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy.** *Mutation Res* 1986; 174: 219-225.
4. Rodriguez-Ariza A, Nieves A, Navas JI, Dorado G, Lopez-Barea J, Pueyo C. **Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts.** *Environ Mol Mutagen* 1992; 19: 112-124.
5. Miguel AG, Daisey JM, Sousa JA. **Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air.** *Environ Mol Mutagen* 1990; 15: 36-43.
6. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparrys Ph, Mac Gregor JT. **Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future.** *Environ Mol Mutagen* 1991; 18: 277-291.
7. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Mac Gregor JT, Newell GW, Salamone MF. **The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental protection agency gene-tox program.** *Mutation Res* 1983; 123: 61-118.
8. Schmid W. **The micronucleus tests.** *Mutation Res* 1975; 31: 9-15.

9. Heddle JA, Lue CB, Saunder F, Benz D. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res* 1978; 38: 2983-2988.
10. Hart JW, Hartley-Asp B. Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutation Res* 1983; 120: 127-132.
11. Yamamoto KI, Kikuchi Y. A comparasion of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res* 1980; 71: 127-131.
12. Krogh JM, Nyfors A. Cytogenetic effect of methotrexate on human cells *in vivo*. *Mutation Res* 1979; 64: 339-343.
13. Herrera A, Barrueco C, Caballo C, Peña E. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1992; 20: 218-228.
14. Tice RR, Luke CA, Shelby MD. Methyl isocyanate: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity. *Environ Mutagen* 1987; 9: 37-58.
15. Shuilin H, Baker RSU. Initiating carcinogen, triethylenemelamine, induces micronuclei in skin target cells. *Environ Mol Mutagen* 1989; 14: 1-5.
16. Livingston GK, Reed RN, Olson BL, Lockey JE. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ Mol Mutagen* 1990; 15: 136-144.
17. Doolittle DJ, Lee CK, Ivett JL, Mirsalis JC, Riccio E, Rudd CJ, Burger GT, Hayes AM. Comparative studies in the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn of only hot tobacco. *Environ Mol Mutagen* 1990; 15: 93-105.

18. Lähdetie J. Micronucleus induced during meiosis by ethyl methanesulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. *Mutation Res* 1983; 120: 257-260.
19. Russo A, Levis AG. Further evidence for the aneuploidogenic properties of chelating agents: induction of micronuclei in mouse male germ cells by EDTA. *Environ Mol Mutagen* 1992; 19: 125-131.
20. Schmezer P, Pool BL, Lefevre PA, Callander RD, Ratpan F, Tinwell H, Ashby J. Assay-Specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver in vivo. *Environ Mol Mutagen* 1990; 15: 190-197.
21. Sakahara H, Ono K, Saga T, Akuta K, Endo K, Kouishi J, Abe M. Hepatocyte response to continuous low dose-rate radiation in radioimmunotherapy assessed by micronucleus assay. *Int J Radiat Biol* 1992; 62: 443-448.
22. Ashby J, Lefebvre PA. Mitogenesis, micronuclei and carcinogenesis in the rat liver: Some basic inconsistencies. *Environ Mol Mutagen* 1992; 20: 29-38.
23. Trzos RJ, Petzold GL, Brunden MN, Suenberg JA. The evolution of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mutation Res* 1978; 58: 79-86.
24. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res*. 1990; 245: 245-249.
25. Choy WN, Henika PR, Willhite CC, Tarantal AF. Incorporation of a micronucleus study into a developmental toxicology and pharmacokinetic study of L-Selenomethionine in non human primates. *Environ Mol Mutagen* 1993; 21: 73-80.

26. Zañiga G, Ramirez-Muñoz MP, Torres-Bugarín O, Pérez JJ, Ramos MA, Zamora PA, Gallegos Arreola MP, Sanchez-Corona J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutation Res* 1997; En prensa.
27. Jaylet A, Deparis P, Ferrier V, Grinfeld S, Siboulet R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the new *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutation Res* 1986; 164:245-257.
28. Bhunya SP, Jena GB. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BHC): an in vivo study in chickens. *Mutation Res* 1992; 272: 175-181.
29. Grant WF, Lee HG, Logun DM, Salamone MF. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Res* 1992; 270: 53-64.
30. Hillman, RC, Finch, CA. El Eritrocito. 5ª ed. ed. Manual Moderno. 1987, 1-35.
31. Novales CX, Amato MJ. Sistema Linfhemático. 1ª ed. Ed. Limusa. 1993.
32. MacKey BE, MacGregor JT. The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mutation Res* 1979; 64: 195-204.
33. Schlegel R, Mac Gregor JT, Everson RB. Assessment of Cytogenetic Damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res* 1986; 46: 3717-3721.
34. Zañiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Delgado-Lamas JL, De Loza-Saldaña R, Cantú JM. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutation Res* 1996; 361: 107-112.

35. Corazza GR, Ginaldi L, Zoli G, Frisoni M, Lalli G, Gasbarrini G, Quaglino D. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function a reassessment. *Clin Lab Hematol* 1990; 12: 269-275.
36. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. *Hematology*. 4th ed. MacGraw-Hill, USA 1990; 308-698.
37. Hillman RS, Clement AF, Boggs DR, Winkelstein A. *Manual de hematología*. 8^{va} ed. DF. Manual moderno. México 1990. 317.
38. Pearson HA, Johnston D, Smith KA, Touloukian RJ. The born-again spleen. Return of splenic function after splenectomy for trauma. *N. Engl. J. Med* 1978; 298(25): 1389-1392.
39. Sharma AK, Sharma A. *Chromosome techniques theory and practice*. 3^a ed. Butterworth & Co. Boston. 1980; 711.
40. Bowman WC, Rand MJ, *Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas aplicaciones clínicas*. 2a ed. Interamericana. México. D.F. 1984.
41. Hellman S, Vokes EE. Advancing Current Treatments for Cancer. *Scientific American* 1996; 275: 84-89.
42. Pratt WB, Rudden RW, Ensminger WD, Maybaum J. *The Anticancer Drugs*. 2a ed. Oxford University Press. New York. 1994.
43. Jensen M, Nyfors A. Cytogenetic effect of methotrexate on human cells in vivo. Comparison between results obtained by chromosome studies on bone-marrow cells and blood lymphocytes and by the micronucleus test. *Mutation Res* 1979; 64: 339-343.

44. Meyers Frederik H, Jawetz E, Golfien A. *Farmacología Clínica*. 3^a ed. El Manual Moderno. Mexico. 1997.
45. Hakovirta H, Parvinen M, Lahdetie J. Effects of etoposide on stage-specific DNA synthesis during rat spermatogenesis 1993, En ; Ashby J, Tinwell H, Glover P, Poorman-Allen P, Krehl R, Callander RD, Clive D. Potent Clastogenicity of the Human Carcinogen Etoposide to The Mouse Bone Marrow and Mouse Lymphoma L5178Y Cells: Comparison to Salmonella Responses. *Environ Mol Mutagen* 1994; 24: 192-202.
46. Ratain JM, Kaminer SL, Bitran DJ, Larson AR, Le Beau MM, Skosey C, Puri S, Hoffman CP, Wade James, Vardiman WJ, Daly Karen, Rowley DJ. Acute Nonlymphocytic Leukemia Following Etoposido and Cisplatin Combination Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Carcinoma of the Lung. *Blood* 1987; 70: 1412-1417.
47. Deeksha B, Jai Rup S, Harbhajan S, Dharambir S. In Vitro and In Vivo Genotoxicity Evaluation of Hormonal Drugs. I. Hidrocortisome. *Environ Mol Mutagen* 1990; 16:250-254.
48. Eber KJ, Kotlatrek F, Habedank M, Müheler U, Müheler E. Chromosomal Investigations in epileptic children during long-term therapy with Pehenitoin or Primodone. *Human Genet* 1981; 56: 345-348.
49. Rao KS. DNA-damanage & DNA-repair in ageing brain. *Med Res* 1997; 106:423-437



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**C. ANA LOURDES ZAMORA PEREZ
P R E S E N T E.**

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN SANGRE PERIFERICA EN EL NIÑO ESPLENECTOMIZADO, CON Y SIN QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLASICA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al BIOL. OLIVIA TORRES BUGARIN, y como asesor a la M.C. MARIA DE LA PAZ RAMREZ MUÑOZ.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., FEBRERO 16 DE 1998


M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION



M. EN C. JOSE LUIS NAVARRETE HEREDIA
SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION



c.c.p. BIOL. OLIVIA TORRES BUGARIN.- Director del Trabajo.
c.c.p. M.C. MARIA DE LA PAZ RAMIREZ MUÑOZ.- Asesor del Trabajo.
c.c.p. El expediente del alumno.

AOB/JLNH/memn*

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DR. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AMBIENTALES

PRESENTE

Por medio de ésta nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante de la Lic. en Biología: **Ana Lourdes Zamora Perez**, código **089636612**, con el título: **ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN SANGRE PERIFERICA EN EL NIÑO ESPLENECTOMIZADO, CON Y SIN QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLASICA.**

Consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de examen de tesis y respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 11 de Febrero de 1998

ATENTAMENTE

EL DIRECTOR DE TESIS



M. en C. OLIVIA TORRES EUGARÍN

ASESOR




M. en C. MARIA DE LA PAZ RAMÍREZ MUÑOZ

SINODALES



Dr. EDUARDO VAZQUEZ VALLS



Dra. GALINA ZAIZETVA P.



Esp. OSWALDO PALACIOS R.