

GENERACION 1999A-2004A

CODIGO 699000236

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**PRESENCIA DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN RECIEN  
NACIDOS PREMATUROS Y SU RELACION CON DIABETES  
MELLITUS, HIPERTENSION ARTERIAL E INFECCION VAGINAL  
MATERNA**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOLOGIA**

**PRESENTA :**

**ADELINA LUNA VARGAS**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, NOVIEMBRE 2004.**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de Carrera de Licenciado en Biología*

**C. ADELINA LUNA VARGAS**  
**PRESENTE.**

Por medio de la presente hacemos de su conocimiento que se acepto su cambio de tema de titulación en la modalidad TESIS E INFORME opción TESIS, con el titulo "ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN RECIEN NACIDOS PREMATUROS Y SU RELACION CON DIABETES MELLITUS, HIPERTESION ARTERIAL E INFECCIÓN VAGINAL METERNA" por el titulo "PRESENCIA DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN RECIEN NACIDOS PREMATUROS Y SU RELACION CON DIABETES MELLITUS, HIPERTESION ARTERIAL E INFECCIÓN VAGINAL METERNA"

Sin más por el momento agradezco su atención ofrecida y esperando sea de su agrado nuestra opinión ofrecida.

**A T E N T A M E N T E**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 07 de septiembre de 2004

**DR CARLOS ALVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



**COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE**  
**LICENCIADO EN BIOLÓGIA**

**DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACION**

CAM/AIRQ/cpa\*

Dr. Carlos Álvarez Moya.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Carrera de Licenciado en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e Informes**, opción **Tesis** con el título: **"PRESENCIA DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN RECIEN NACIDOS PREMATUROS Y SU RELACION CON DIABETES MELLITUS, HIPERTENSIÓN ARTERIAL E INFECCION VAGINAL MATERNA"** que realizó el/la pasante **Adelina Luna Vargas** con número de código **699000236** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Lugar y fecha.

Los Agujas, Zapecan, Jal., 19 de Octubre de 2004

Firma

Nombre *Cecilia Margarita Batista González*  
 Director/a del trabajo,

firma

nombre *Adelina Luna Vargas*  
 Asesor(es) *Adelina Luna Vargas*

| Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación | Firma de aprobado el anteproyecto | Fecha de aprobación |
|--|-----------------------------------|---------------------|
| <i>Dr. Daniel Cortés S.</i>  | <i>[Firma]</i>                    | <i>19 Oct 04</i>    |
| <i>Dr. Alfredo Feria V.</i>  | <i>[Firma]</i>                    | <i>20 Oct 04</i>    |
| <i>Dr. Alfonso Isla</i>  | <i>[Firma]</i>                    | <i>26 Oct 04</i>    |
| Supl. <i>Dr. Carlos Álvarez Moya</i>                                   | <i>[Firma]</i>                    | <i>3/Nov/04</i>     |

PRESENCIA DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN  
RECIÉN NACIDOS PREMATUROS Y SU RELACIÓN CON  
DIABETES MELLITUS, HIPERTENSIÓN ARTERIAL E  
INFECCIÓN VAGINAL MATERNA

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presenta:

*Adelina Luna Vargas*

Dirección de Tesis:

**Biol. Cecilia Margarita Batista González**

Asesoría de Tesis:

**Dra. en C. Belinda Claudia Gómez Meda**

**Dr. en C. Carlos Álvarez Moya**

Este trabajo se realizó en el  
**LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS**  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente  
Instituto Mexicano del Seguro Social

Colaboradores:

**M. en C. Román Corona Rivera**

**M. en C. María Luisa Ramos Ibarra**

**Dra. en C. Ana Lourdes Zamora Perez**

**Dr. en C. Guillermo M. Zúñiga González**

## *Agradecimientos*

A Dios por el hermoso regalo de la vida y por rodearme de personas que me han ayudado a realizar mis sueños.

A mis padres, hermanas y hermanos que a pesar de la distancia, las fronteras no existen para enviarme su valioso apoyo.

A Alicia Magallanes una gran señora que junto con mi madre ha estado en contacto con Dios, pidiendo que mis sueños se realicen.

A CECI, por su entrega y paciencia en la dirección de mi tesis.

Al maravilloso y gran equipo del Laboratorio de Mutagénesis:

Dr. en C. Guillermo Zúñiga González.

Dra. en C. Belinda C. Gómez Meda.

Dra. en C. Ana Lourdes Zamora Perez.

M. en C. María Luisa Ramos Ibarra.

Por brindarme la oportunidad de realizar del presente trabajo de tesis así como su apoyo en el desarrollo del mismo.

A mis amigos y amigas que juntos hemos saboreado las derrotas y disfrutado al máximo las victorias.

# Índice

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Resumen</b>                               | 1      |
| <b>Antecedentes</b>                          | 2      |
| * Pruebas de genotoxicidad                   | 2      |
| * Micronúcleos                               | 2      |
| * Agentes micronucleogénicos                 | 3      |
| * Prueba de micronúcleos                     | 4      |
| * Eritrocitos                                | 5      |
| * Sistema reticuloendotelial                 | 7      |
| * Enfermedad y micronúcleos                  | 8      |
| * Radicales libres y micronúcleos            | 10     |
| * Ácido fólico y micronúcleos                | 10     |
| <b>Justificación</b>                         | 12     |
| <b>Pregunta de investigación</b>             | 13     |
| <b>Hipótesis</b>                             | 14     |
| <b>Objetivos</b>                             | 15     |
| * General                                    | 15     |
| * Específicos                                | 15     |
| <b>Material y método</b>                     | 16     |
| * Sede                                       | 16     |
| * Diseño                                     | 16     |
| * Definición de variables                    | 16     |
| * Criterios                                  | 16     |
| * Formación de grupos                        | 17     |
| * Preparación y análisis de las muestras     | 17     |
| * Tinción con naranja de acridina            | 17     |
| * Lectura de las laminillas                  | 18     |
| * Criterios para el análisis de las muestras | 19     |
| * Consideraciones éticas                     | 19     |
| * Análisis estadístico                       | 19     |
| * Diagrama de flujo                          | 20     |
| <b>Resultados</b>                            | 21     |
| <b>Discusión</b>                             | 24     |

|   | Página |
|---|--------|
| <i>Conclusiones</i>   | 26     |
| <i>Bibliografía</i>   | 27     |
| <i>Glosario</i>   | 33     |
| <i>Figuras</i>  |        |
| 1. Formación de micronúcleos  | 3      |
| 2. Células micronucleadas en diferentes tejidos   | 5      |
| 3. Eritrocitos micronucleados de sangre periférica  | 7      |
| <i>Cuadros</i>  |        |
| I. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en niñas vs niños                                  | 21     |
| II. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en madres con y sin patología                     | 22     |
| III. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en los diferentes grupos de estudio              | 22     |
| IV. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en relación con la administración de ácido fólico | 23     |



## Resumen

La prueba de micronúcleos (MN), sirve para detectar daño al DNA y se realiza en tejidos en proliferación. Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que se pierden durante la mitosis y se incrementan cuando los organismos se exponen a agentes genotóxicos. Previamente ha sido demostrada la presencia de eritrocitos micronucleados (EMN) espontáneos en humanos recién nacidos prematuros, no así en neonatos nacidos a término o en adultos. En algunas enfermedades los EMN se encuentran incrementados, como consecuencia del aumento en la producción de radicales libres, lo que a su vez incrementa el daño al DNA, con esto surge la duda de si diversas patologías, que involucren la formación de radicales libres durante el embarazo, son condicionantes de teratogénesis potencial para el producto. El objetivo del presente trabajo de tesis fue comparar los valores de EMN en recién nacidos prematuros de madres con diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA) e infección vaginal (IU) con los valores de hijos de madres sin patología.

Se tomaron 75 muestras de sangre de recién nacidos prematuros y se agruparon de acuerdo a la enfermedad de la madre. Grupo (1): hijos de madres sin patología, (2): con IU, (3): con HTA, (4): con DM. Se realizaron frotis y se contaron los EMN en 10,000 eritrocitos totales mediante microscopia de fluorescencia. Los resultados fueron analizados con prueba *t* de Student.

Comparativamente con el grupo de madres sin patología, el número de EMN en los grupos de madres con IU y HTA estuvo incrementado, si bien las diferencias no fueron significativas, mientras que el grupo de madres con DM mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), esto pudiera ser una de las causas de la alta frecuencia de malformaciones en hijos de madres con DM. Por otro lado, también se hicieron comparaciones por género y por administración o no de ácido fólico durante la gestación, con lo cual se observó menor número de EMN en las niñas y en los hijos de madres con ácido fólico, pero sin llegar a ser estadísticamente significativa dicha diferencia.

## *Antecedentes*

Todos los organismos vivos están expuestos constantemente a elementos que por sus propiedades físicas, químicas o biológicas al ser ingeridos, inhalados, aplicados tópicamente o inyectados, son capaces de provocar alteraciones orgánicas, funcionales y aún la muerte (1,2). Tal exposición puede ser inadvertida, accidental o incluso inevitable o intencional. Algunos de estos elementos son "inocuos", pero una parte de ellos pueden provocar reacciones biológicas de naturaleza farmacológica o tóxica. A menudo estas reacciones dependen de la conversión de sustancias absorbidas en un metabolito activo, que puede provocar con ello fenómenos de mutagenicidad, teratogenicidad o carcinogenicidad (3-6).

### • **Pruebas de genotoxicidad**

Las pruebas para la detección de agentes que dañan al DNA son de gran importancia, ya que los compuestos genotóxicos tienen la capacidad de alterar el material genético en los organismos, incluido el ser humano (7), además pueden tener efectos teratogénicos (8), mutaciones en células germinales (7), inducir enfermedades cardíacas (7,9), influir en procesos de envejecimiento (7), e inducir mutaciones en células somáticas que pueden contribuir al desarrollo del cáncer (10-12).

Una alternativa para determinar daño citogenético es la prueba de eritrocitos micronucleados (EMN) en sangre periférica. (13,14). Esta prueba ofrece resultados claros y contundentes, la posibilidad de trabajarla *in vivo* y la necesidad de sólo una gota de sangre para el estudio, lo que la hace una prueba sencilla, rápida y económica.

### • **Micronúcleos**

Los micronúcleos (MN) son cromosomas completos o fragmentos de cromosomas que quedan fuera del núcleo en mitosis (14,15). En hematología, los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, su forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía generalmente desde 1/20 a 1/5 (0.4 a 1.6 micras) del tamaño normal

de un eritrocito (14,16). Los MN se presentan de manera espontánea en sangre periférica en algunas especies (17,18,19) y se incrementan cuando el organismo se expone a genotóxicos (20,21). Su formación se basa en el siguiente principio: en anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo, por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático, situación que sucederá también en los cromosomas completos en los que el huso mitótico se dañe. Después de la telofase, los cromosomas normales darán origen a los núcleos de las células hijas. Los elementos rezagados quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de éstos es transformada en uno o varios núcleos secundarios, mucho más pequeños que el núcleo principal, por lo que son llamados MN (Figura 1) (22).

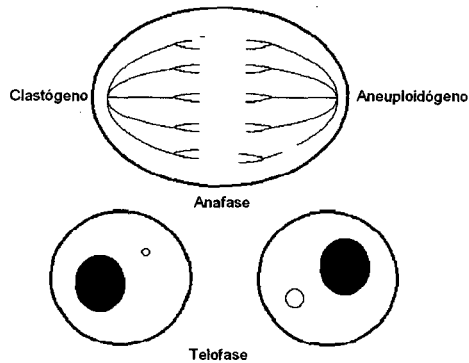


Figura 1. Formación de micronúcleos

#### \* **Agentes micronucleogénicos**

Los agentes micronucleogénicos se clasifican en dos tipos de acuerdo a su mecanismo de acción:

**Aneuploidógenos:** Los cuales bloquean la formación del huso mitótico, lo que origina rezagos de cromosomas completos, que no serán incluidos en el núcleo de las células hijas (22,23), como colchicina, taxol, vinblastina y vincristina.

**Clastógenos:** Los cuales rompen las hebras de DNA, estos pueden ser análogos de base y actuar por intercalarse en las hebras de DNA, lo que inhibe su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlaces, lo cual puede producir fracturas cromosómicas (24), como las radiaciones y medicamentos antineoplásicos como cidofofamida, arabinosa-C, metotrexate, entre otros.

### • **Prueba de micronúcleos**

La prueba de MN *in vivo* detecta agentes clastogénicos que rompen cromosomas, así como aneuploidogénicos que dañan el huso mitótico, mediante la identificación de fragmentos acéntricos o cromosomas rezagados, que al quedar fuera del núcleo forman estas estructuras (22,23). Ambos efectos se diferencian por el tamaño de los MN o por ausencia o presencia de centrómero (13,22,23,25).

Dentro de las ventajas de la prueba de MN se incluyen la facilidad y la rapidez del estudio, la posibilidad de contar con abundantes células analizables en diferentes períodos del ciclo celular, la posibilidad de probar un químico sin otros compuestos, y el hecho de que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase (14,22,26). El examen se realiza en tejidos con rápida proliferación celular (27,28), sin embargo, la manera más sencilla es utilizar una gota de sangre, cuando esto es factible.

La prueba de MN se puede realizar en diferentes tejidos, como eritrocitos policromáticos (EPC) de médula ósea, eritrocitos de sangre periférica (14,19,29,30) linfocitos (15,31), hepatocitos (27), células germinales (32) y en células de mucosa bucal, entre otros (Figura 2) (33).

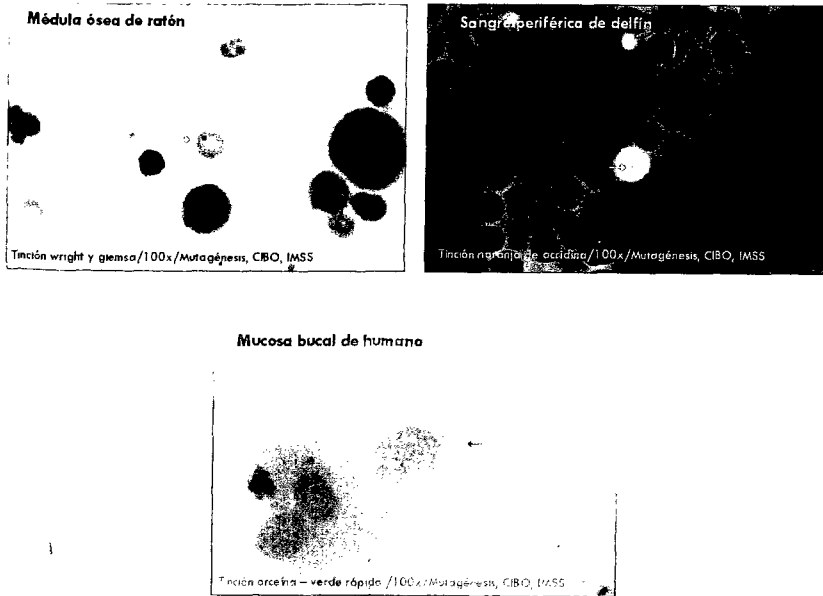


Figura 2. Células micronucleadas en diferentes tejidos.

Dado que la presencia de MN se traduce en el ámbito celular como pérdida de DNA, esta técnica es entonces una alternativa muy eficaz para el monitoreo de genotóxicos de una manera fácil, sencilla, rápida y con resultados contundentes. Además, la prueba de MN no deja lugar a duda del daño producido en el DNA, ya que es claro que los MN incrementan cuando los organismos son expuestos a agentes con acción micronucleogénica.

#### \* **Eritrocitos**

Los eritrocitos (glóbulos rojos) son uno de los elementos de la sangre periférica de los organismos (34). En el humano la forma madura del eritrocito adulto normal es un disco bicóncavo, con diámetro promedio de 8  $\mu$ , espesor de 2  $\mu$  y volumen de 90  $\mu^3$ . En frotis teñidos, se observan en forma de corpúsculos circulares con borde neto y liso (35,36).

El glóbulo rojo está formado de 60 a 70% por agua, una matriz de sustancias orgánicas e inorgánicas (hasta 5% del volumen del eritrocito), y aproximadamente 33% de su volumen consiste en hemoglobina, la cual realiza la función de transporte de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ). El eritrocito normal tiene una longevidad limitada en circulación, de  $120 \pm 20$  días (35,36).

Es normal encontrar variaciones en el tamaño del eritrocito ya que los más jóvenes son un poco más grandes y disminuyen ligeramente con su edad. El EPC o eritrocito con basofilia difusa que recién ha perdido el núcleo, es ligeramente mayor que el eritrocito maduro (16).

Por otro lado, la cantidad de EPC presentes en la circulación sanguínea se utiliza como parámetro para determinar citotoxicidad, ya que esta proporción de células es constante pero suele alterarse si el individuo recibe compuestos citotóxicos (valor que puede disminuir hasta quedar en cero), lo que indica mielodepresión.

Es importante tomar en cuenta que debido a que los EPC no pierden los ribosomas por aproximadamente 24 horas después de la enucleación, estos se tiñen de color rojo o naranja con el colorante naranja de acridina, debido a su gran contenido de RNA (37,38), (Figura 3), lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas de periodos cortos de exposición, ya que estos eritrocitos después de 24 horas se transforman en eritrocitos normocromáticos (ENC), por lo que una de las maneras de utilizar la prueba de MN es mediante el conteo de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN), ya que estos reflejan el daño producido pocas horas antes por un compuesto (Figura 3) (14,18).

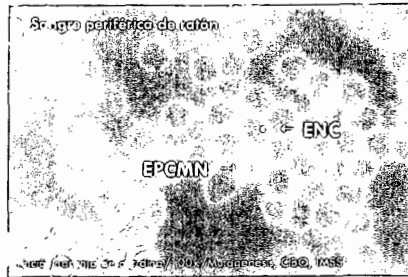


Figura 3. Eritrocitos micronucleados en sangre periférica.

En la formación del glóbulo rojo, después de que el eritroblasto expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito (en mamíferos, aproximadamente cinco horas después de completar la última mitosis), por razones no conocidas los MN permanecen en el citoplasma de los eritrocitos jóvenes y es entonces cuando es posible visualizarlos (14,22).

#### • **Sistema reticuloendotelial**

El sistema reticuloendotelial es el encargado de retirar a los eritrocitos con alteraciones, incluidos los EMN, entre otras anomalías presentes (5). El bazo, como parte del sistema reticuloendotelial, filtra la sangre, elimina partículas extrañas mediante células fagocíticas, y destruye a los eritrocitos viejos o sus fragmentos. Cuando los eritrocitos envejecen, ocurren ciertos cambios que reducen su flexibilidad, esto dificulta su paso 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 eritrocítica (35,39).

Se conoce que el humano, tanto adulto como en la niñez, presenta un número basal de EMN en sangre periférica cercano a cero y que aún recibiendo drogas genotóxicas antineoplásicas de conocida micronudeogenicidad, este valor no se eleva de manera importante debido a la eficiencia del bazo (16,17,40), por lo que sólo se pueden

observar cuando la persona tiene mal funcionamiento del bazo (14,16,41,42), o cuando a sido esplenectomizado (43). Esta última condición es como se pueden tener los datos precisos cuando se quiere conocer la genotoxicidad de los fármacos administrados a los pacientes (43,44).

El sistema reticuloendotelial en personas adultas es tan eficiente como para retirar a los EMN de la circulación; por otro lado, los organismos con mayor número de EMN espontáneos tienen menor control sobre éstos, tal que se pueden observar variaciones en su frecuencia como resultado de su acumulación. En niños prematuros, dada su inmadurez, el sistema reticuloendotelial no es tan eficiente, de manera que no puede retirar estas estructuras de la circulación, por lo cual es posible observar EMN en su sangre periférica, no así en niños nacidos a término. Esto último fue descrito en un estudio previo en el que se demostró la presencia de EMN espontáneos en recién nacidos prematuros y en animales jóvenes de varias especies (18) y con esta base se consideró la posibilidad de utilizar esta característica para estudios de genotoxicidad, desde el punto de vista del potencial teratogénico en el medio ambiente intrauterino (45), así como del efecto que podrían ocasionar algunas patologías maternas a sus productos. Por tanto, en el presente estudio se pretende identificar si la condición de que la madre tenga alguna patología durante el embarazo, influye en el aumento de EMN del recién nacido prematuro.

#### • **Enfermedad y micronúcleos**

Se ha descrito que en algunas enfermedades el número de MN espontáneos está incrementado, por ejemplo, en el lupus eritematoso sistémico, enfermedad caracterizada por la presencia de auto-anticuerpos en el plasma, en el cual factores clastógenos pueden inducir rompimientos cromosómicos (46). Los pacientes con artritis reumatoide son más propensos a desarrollar leucemia comparados con otras poblaciones y presentan significativamente mayor número de MN que el resto de la población (47).



Esto mismo se ha observado en pacientes con diferentes tipos de cáncer (48), posiblemente debido a sustancias que son liberadas por el tumor a la circulación (49).

Por otro lado, la diabetes mellitus (DM) es una de las causas más frecuentes de muerte por enfermedad cardiovascular prematura, enfermedad cerebro vascular y falla renal (50). Se caracteriza por hiperglucemia, la cual resulta de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambos. Esta hiperglucemia crónica es la responsable del daño, falla y disfunción de varios órganos y sistemas.

Se han hecho estudios en los que se plantea que la incidencia de malformaciones congénitas en recién nacidos prematuros hijos de madres diabéticas es mayor que en recién nacidos prematuros del resto de la población (51). Estas malformaciones incluyen síndrome de regresión caudal, anencefalia, espina bífida, hidrocefalia y anomalías cardíacas (52). Como resultado de estudios con animales de experimentación, se ha sugerido que estas malformaciones congénitas resultan de las alteraciones de factores del suero, asociadas a la diabetes, en el medio ambiente intrauterino (52). El mecanismo biológico exacto de teratogenicidad no se conoce, pero varios factores teratogénicos han sido identificados en las malformaciones de hiperglicemia-inducida, en las que se incluye la acumulación de sorbitol, deficiencia de mio-inositol, deficiencia de ácido araquidónico y metabolismo alterado de prostaglandinas, y aumento en la producción de radicales libres ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$ ), lo que a su vez, se conoce, incrementa el daño al DNA de linfocitos de sangre periférica (53).

La diabetes mellitus gestacional (DMG) o pregestacional (DMP) afecta al 5% de los embarazos aproximadamente, la DMG representa el 90% de la diabetes en el embarazo y tiene prevalencia del 6% en población mexicana. La DMP se ha asociado a riesgo incrementado de abortos espontáneos y malformaciones congénitas durante el primer trimestre del embarazo. La frecuencia de defectos al nacimiento se ha calculado entre el 6 y el 10%, que es 2 a 4 veces mayor que en la población general. Por otro lado,

aunque no se ha demostrado asociación de la DMG con incremento en la prevalencia de malformaciones congénitas, algunos estudios clínicos y epidemiológicos han descrito la presencia de DMG en madres de niños con malformaciones congénitas o en mayor cantidad que en la de madres sin patología (54).

#### • **Radicales libres y micronúcleos**

Si bien, se sugirió que los radicales libres están relacionados con dismorfogénesis embrionarias en embarazos de madres diabéticas, los mecanismos biológicos exactos no se conocen, pero se ha propuesto que el incremento en radicales ejerce efecto teratogénico, en presencia de un sistema inmaduro "depurador" de radicales libres (52).

Ya que los radicales libres incluyen, por ejemplo, radicales superóxido e hidroxilo, peróxido de hidrógeno, ozono, peroxinitrito, cetoaldehídos y cetoaminas, entre otros, el daño oxidativo al DNA puede ocurrir por muchas rutas, incluidas modificaciones oxidativas de las bases de los nucleótidos, azúcares o por la formación de ligaduras. Tales modificaciones pueden producir mutaciones, patologías, muerte celular y envejecimiento. Además, la oxidación de proteínas parece jugar un papel causal en muchas enfermedades crónicas de la edad como cataratogénesis, artritis reumatoide y enfermedades neurodegenerativas (55).

Por otro lado, el efecto micronucleogénico de los radicales libres es conocido. Estos ocasionan rompimientos de la cadena de DNA y degradación de la desoxirribosa y se ha sugerido que los radicales oxígeno se encuentran involucrados en la acción de gran número de drogas y otros xenobióticos que dañan el DNA (55-59).

#### • **Ácido fólico y micronúcleos**

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble (B9). El folato exógeno es indispensable para la conservación de la eritropoyesis normal y para la síntesis de nucleoproteínas, además, estimula la producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas de ciertas anemias

megaloblásticas. El ácido fólico de la dieta está presente en los alimentos, principalmente como poliglutamato reducido de folato. Esta vitamina sólo puede absorberse después de hidrólisis, reducción y metilación que ocurren en vías gastrointestinales (60,61).

Por otro lado, existen factores de la dieta que afectan directamente el número de EMN en el humano. Se ha demostrado que deficiencias dietéticas de nutrientes requeridos para la síntesis de nucleótidos, tales como el ácido fólico, pueden incrementar el daño cromosómico espontáneo y pueden influir fuertemente en la respuesta genotóxica de otros compuestos tanto *in vivo* (3) como en cultivos de linfocitos (62). La deficiencia de folatos produce incorporación masiva de uracilo dentro del DNA humano y rompimientos cromosómicos, sin embargo, los niveles de uracilo y la elevada frecuencia de MN se revierten con la administración de folatos (63). Además, es conocido que mediante la suplementación de ácido fólico a mujeres pre y periconcepcionalmente, se disminuye la recurrencia de defectos de cierre del tubo neural en los bebés, lo cual ha sido establecido como tratamiento preventivo y muestra la inocuidad y las ventajas producidas por dicha vitamina (64).

## Justificación

Se han hecho estudios en los que se plantea incremento en la incidencia de malformaciones congénitas, en neonatos de madres con patologías relacionadas con aumento en la producción de radicales libres (51). Como resultado de estudios con animales de experimentación, se ha sugerido que estas malformaciones congénitas resultan de las alteraciones de factores del suero, asociadas a la enfermedad, en el medio ambiente intrauterino (52).

La DM, hipertensión arterial sistémica (HTA), así como otras patologías, frecuentemente muestran aumento en producción de radicales libres ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$ ), lo que a su vez, se conoce, incrementa el daño al DNA de linfocitos de sangre periférica (53). Con esto surge la duda de si diversas patologías que involucren la formación de radicales libres durante el embarazo son condicionantes de teratogénesis potencial para el producto.

Por otro lado, se ha propuesto que el incremento de radicales libres ejerce efecto teratogénico, en presencia de un sistema inmaduro "depurador" de radicales libres (52). Además, es conocido el efecto micronucleogénico de los radicales libres, los cuales ocasionan rompimientos de la cadena de DNA y degradación de la desoxirribosa y se ha sugerido que los radicales oxígeno se encuentran involucrados en la acción de gran número de drogas y otros xenobióticos que dañan el DNA (55-59).

Por lo anterior, se hace necesario contar con mayor conocimiento acerca de los efectos de las enfermedades *per se* y de los medicamentos administrados durante el embarazo, a fin de reducir los costos del tratamiento causados por éstos, además de tener la posibilidad de determinar el posible daño al producto, en forma sencilla y económica mediante el uso de sólo una gota de sangre y la prueba de MN, ya que la presencia de MN se traduce en el ámbito celular como pérdida de DNA, con las consecuencias que esto genera (28).

## *Pregunta de investigación*

¿Presentan mayor número de EMN los recién nacidos prematuros de madres con DM, HTA o infección vagino-uterina (IVU) en comparación con los de madres sin patología?

## *Hipótesis*

Los recién nacidos prematuros de madres con DM, HTA o IUJ presentan mayor número de EMN que los de madres sin patología.

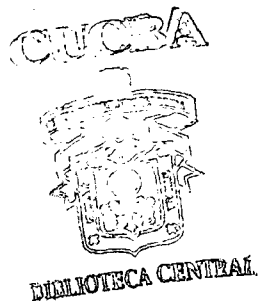
# Objetivos

## General

Comparar el número de EMN de recién nacidos prematuros de madres con DM, HTA o IMU con relación a los valores de hijos de madres sin patología.

## Específicos

- Cuantificar los valores de EMN de recién nacidos prematuros.
- Comparar los valores de EMN de recién nacidos prematuros con respecto a las semanas de gestación.
- Comparar los valores de EMN de recién nacidos prematuros con respecto al género.
- Cuantificar los valores de EPC, EMN y EPCMN de recién nacidos prematuros agrupándolos de acuerdo a la patología materna, incluidos sin patología.
- Comparar los valores de EPC, EMN y EPCMN de los diferentes grupos patológicos contra los valores del grupo sin patología.
- Comparar los valores de EMN de recién nacidos prematuros de los diferentes grupos, de acuerdo a la administración de ácido fólico a la madre durante el embarazo.



## *Material y métodos*

### **Sede**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Mutagénesis, División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, con la colaboración del Servicio de Pediatría del Hospital Civil "Juan I. Menchaca" de la Universidad de Guadalajara.

### **Diseño**

- Tipo de estudio: observacional
- Por el tipo de captación de la información: transversal
- Por la medición de fenómeno en el tiempo: prospectivo
- Por la presencia de un grupo control: comparativo

### **Definición de variables**

- Independientes: Patología materna (DM, HTA, IU, sin patología)
- Dependientes: Número de EMN.

### **Criterios**

- Inclusión: Muestras de sangre de recién nacidos prematuros de cualquier edad gestacional, hijos de madres sin patología, madres con DM, HTA o IU.
- No inclusión: Niños prematuros que se encuentren extremadamente delicados de salud, de los cuales no se pueda obtener muestra.
- Exclusión: Todas aquellas muestras que por cuestiones metodológicas estén incompletas (mala realización del frotis, mal teñidas o con recopilación de la información incompleta).



### ***Formación de grupos***

Se tomaron muestras de sangre periférica de recién nacidos prematuros y se agruparon de acuerdo a la patología materna. Grupo 1: hijos de madres sin patología, 2: hijos de madres con MU, 3: hijos de madres con HTA, 4: hijos de madres con DM.

### ***Preparación y análisis de las muestras***

Se recuperó una gota de sangre periférica de los recién nacidos prematuros de la muestra que rutinariamente les es tomada, para realizar con ésta dos frotis. Las muestras fueron extendidas sobre portaobjetos y se fijaron en etanol al 80% por 10 min, y se tñeron con naranja de acridina (65). Las muestras fueron analizadas mediante microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x. De cada muestra se contó el número de EMN en 10,000 eritrocitos totales (ET), y EPCMN en 1,000 EPC, para determinar daño acumulado y a corto plazo, respectivamente; asimismo, se consideró la proporción de EPC en 1,000 ET como control del sistema.

### ***Tinción con naranja de acridina***

La tinción de las laminillas se realizó con naranja de acridina, colorante específico para ácidos nucleicos. El naranja de acridina emite fluorescencia y dado que el núcleo y los MN están formados por DNA, ésta propiedad se aprovecha para la visualización de MN, los cuales, al igual que el núcleo se tiñen de color amarillo brillante, mientras que el RNA se tiñe de color rojo cuando son observados por microscopía de fluorescencia, por otra parte el citoplasma es teñido de color verde opaco semitransparente.

Se debe de considerar que el naranja de acridina es un compuesto que se intercala entre las bases del DNA y por tanto, se deben de tomar en cuenta las medidas de seguridad necesarias como son uso de guantes, cubrebocas y bata, para evitar el contacto y aspiración por el manejo.

Procedimiento:

- a. Se prepara la solución amortiguadora de fosfatos, para lo cual se pesan 21.6 g de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y 11.49 g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Estas cantidades se disuelven en 1,000 ml de agua desmineralizada.
- b. Se recomienda separar en una jeringa (10 ml) aproximadamente 5 ml de solución amortiguadora para emplearlo posteriormente en las lecturas de las laminillas.
- c. En dos cajas de tinción con capacidad para 50 laminillas se vacían 500 ml de la solución en cada una.
- d. En oscuridad, en una de las cajas se agregan 0.02 g de naranja de acridina y se mezcla con abatelenguas para disolver completamente.
- e. Posteriormente, se sumerge una gradilla con las laminillas a teñir en el naranja de acridina y se deja ahí por 10 min, se mueve de vez en cuando para que el colorante llegue a todas las laminillas.
- f. Una vez transcurrido el tiempo, se saca la gradilla y se elimina el exceso de líquido al sacudir suavemente la gradilla sobre papel absorbente para posteriormente colocarla por 10 min en la caja que contiene únicamente de solución amortiguadora, con la finalidad de lavar los excesos del colorante.
- g. Pasado este tiempo se saca la gradilla, se sacude para eliminar excesos, se pasan las laminillas a una caja con tapa y se dejan secar en la estufa a  $45^\circ\text{C}$  con la tapa abierta, en oscuridad.
- h. Una vez secas las laminillas, se tapa bien la caja y se guardan en oscuridad hasta su lectura.
- i. Se recomienda leer las laminillas en un plazo no mayor a 5 semanas posterior a la tinción, ya que la fluorescencia se pierde con el tiempo.

### ***Lectura de las laminillas***

Para la lectura de las laminillas, se toma una de la caja tapada, se le agregan unas gotas de la solución amortiguadora que se separó en una jeringa, se cubre la laminilla con un

cubreobjetos, se eliminan excesos de solución amortiguadora con presión suave por ambos lados con una gasa y se coloca la laminilla en la platina del microscopio para su lectura con lámpara de fluorescencia, mediante observación con el objetivo 100x, para contar los EMN en un total de 10,000 células.

### ***Criterios para el análisis de las muestras***

Las características tomadas en cuenta para considerar una célula como normal fueron que presentara el citoplasma intacto y relativamente homogéneo, poco o ningún empalmo con células adyacentes; mientras que en el caso de los EMN se tomó en cuenta que tuvieran las características de una célula normal, además de que el MN tuviera una forma redonda o almendrada, con tamaño menor a un tercio del eritrocito, que presentaran perímetro liso y redondo que sugiriera membrana, así como intensidad de tinción, textura y plano focal similar al del núcleo de un leucocito.

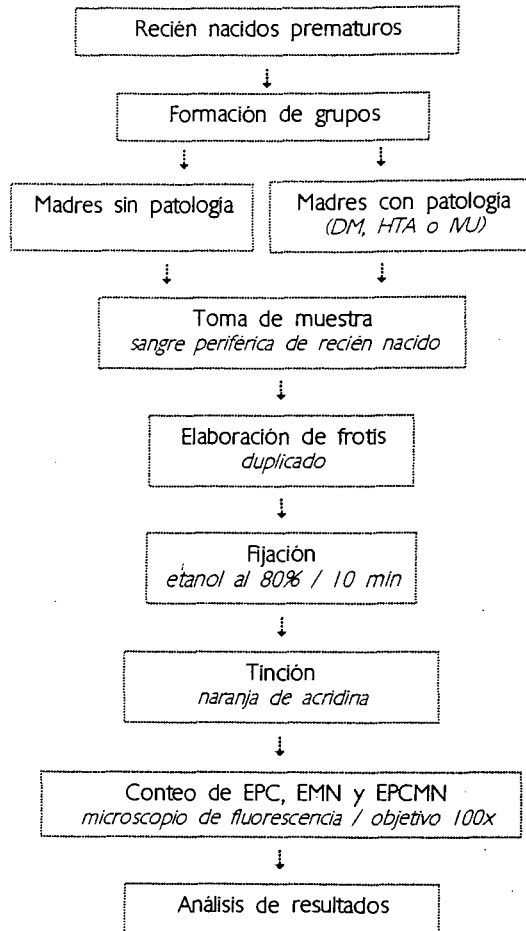
### ***Consideraciones éticas***

A todos los tutores de los participantes se les informó el objetivo del estudio (66), asimismo, se obtuvieron datos del expediente, que fueron recopilados en un cuestionario. En el caso de la sangre de los recién nacidos prematuros, ésta fue recuperada a partir de la muestra que rutinariamente les es tomada (67), de acuerdo con las disposiciones de la Ley General de Salud (68).

### ***Análisis estadístico.***

Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar y se evaluaron mediante la prueba *t* de Student, y se consideraron estadísticamente diferentes cuando el valor de P fue menor a 0.05.

## Diagrama de Flujo



## Resultados

El promedio de los valores obtenidos en los 75 niños prematuros estudiados en el presente fue de EPC:  $33.2 \pm 26.4$ , EMN:  $4.3 \pm 4.4$ , EPCMN:  $1.00 \pm 1.5$ . Cuando los datos se analizaron acorde con las semanas de gestación, no se observó relación con el número de EMN.

Al clasificar los datos de acuerdo al género del recién nacido (niñas vs niños), no se consideraron 3 muestras para el análisis (pues no se contó con la información respecto a su género), y se observó que el grupo de las niñas presentó valores menores de EMN y EPCMN en comparación con el grupo de los niños, pero estas diferencias por género no fueron estadísticamente significativas (Cuadro I).

Cuadro I. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en niñas vs niños

|       | Niñas<br>n= 25  | Niños<br>n= 47  |
|-------|-----------------|-----------------|
| EPC   | $36.7 \pm 26.7$ | $29.7 \pm 24.8$ |
|       | NS              | NS              |
| EMN   | $3.6 \pm 3.5$   | $4.7 \pm 4.9$   |
|       | NS              | NS              |
| EPCMN | $0.8 \pm 1.2$   | $1.2 \pm 1.7$   |
|       | NS              | NS              |

Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. EPC: Eritrocitos policromáticos; EMN: Eritrocitos micronucleados; EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados; ET: Eritrocitos totales; n: tamaño de muestra; NS: no significativo.

Al agrupar los datos respecto al estado de salud de la madre durante el embarazo (con o sin patología) se observó que los valores de EMN y EPCMN del grupo de recién nacidos prematuros de madres sin patología siempre estuvieron por debajo, en comparación con los del grupo de recién nacidos prematuros de madres con alguna patología, aunque no se encontraron diferencias significativas (Cuadro II).

Cuadro II. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en madres con y sin patología

|       | Sin patología<br>n= 37 | Con patología<br>n= 38 |
|-------|------------------------|------------------------|
| EPC   | 34.4±27.7<br>NS        | 32.5±25.5<br>NS        |
| EMN   | 3.5±4.1<br>NS          | 5.1±4.7<br>NS          |
| EPCMN | 0.7±1.4<br>NS          | 1.2±1.6<br>NS          |

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. EPC: Eritrocitos policromáticos; EMN: Eritrocitos micronucleados; EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados; ET: Eritrocitos totales; n: tamaño de muestra; NS: no significativo.

Al comparar los datos por el tipo específico de patología de la madre durante el embarazo, se observó que los valores de EMN y EPCMN del grupo de recién nacidos prematuros de madres con alguna patología siempre presentaron números mayores que los de madres sin patología y se observó incremento significativo respecto a los valores de los EMN de hijos prematuros de madres con DM (Cuadro III).

Cuadro III. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en los diferentes grupos de estudio

| Patología     | n  | EPC             | EMN                 | EPCMN         |
|---------------|----|-----------------|---------------------|---------------|
| Sin patología | 37 | 34.4±27.7<br>NS | 3.5±4.1<br>NS       | 0.7±1.4<br>NS |
| MU            | 24 | 31.8±27.3<br>NS | 4.7±3.2<br>NS       | 1.1±1.3<br>NS |
| HTA           | 10 | 20.8±14.9<br>NS | 4.6±6.9<br>NS       | 1.5±2.2<br>NS |
| DM            | 4  | 61.0±6.2<br>NS  | 8.3±5.0<br>*P <0.05 | 1.5±1.7<br>NS |

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. EPC: Eritrocitos policromáticos; EMN: Eritrocitos micronucleados; EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados; ET: Eritrocitos totales; n: tamaño de muestra; \* Prueba t de Student; NS: no significativo; MU: infección vagina-uterina; HTA: Hipertensión arterial; DM: Diabetes mellitus.

Cuando se consideraron los datos de acuerdo con la administración de ácido fólico a la madre durante el embarazo, se observó que los valores de EMN y EPCMN del grupo de recién nacidos prematuros de madres con ácido fólico fue menor, en comparación con los del grupo de recién nacidos prematuros de madres sin ácido fólico, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro IV).

Cuadro IV. EPC/1,000 ET, EMN/10,000 ET y EPCMN/1,000 EPC en relación con la administración de ácido fólico

|       | Ácido fólico<br>n= 8 | No ácido fólico<br>n= 67 |
|-------|----------------------|--------------------------|
| EPC   | 40.3±34.0<br>NS      | 32.3±25.6<br>NS          |
| EMN   | 2.5±2.5<br>NS        | 4.5±4.6<br>NS            |
| EPCMN | 0.9±1.1<br>NS        | 1.0±1.6<br>NS            |

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. EPC: Eritrocitos policromáticos; EMN: Eritrocitos micronucleados; EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados; ET: Eritrocitos totales n: tamaño de muestra; NS: no significativo.

## Discusión

La presencia de EMN en la sangre del recién nacido prematuro permite tener una herramienta para estudiar el potencial teratogénico de padecimientos de la madre o de medicamentos que haya ingerido durante el embarazo, como fue demostrado previamente en un modelo experimental (45). En el presente trabajo se pudieron observar diferencias significativas al comparar los EMN de los hijos prematuros de madres sin patología comparados con los de madres diabéticas, y posiblemente dentro de las patologías maternas aquí estudiadas esta sea la más micronucleogénica, ya que es conocido el incremento de radicales libres en esta enfermedad y su relación con malformaciones del embrión, lo mismo que la relación directa que tienen los radicales libres en la inducción de EMN. Por lo que es muy conveniente seguir con el estudio de la micronucleogenicidad de este padecimiento e incrementar el tamaño de la muestra con el fin de tener resultados más contundentes, que permitan obtener mayores conclusiones. En particular, las diferencias se observan respecto al conteo de EMN, y la razón de esto es probablemente por que este parámetro indica el daño acumulado en el tiempo (a diferencia de los EPCMN, que muestran el daño producido en las últimas 24 a 48 horas) y ya que la diabetes está presente durante todo el desarrollo del niño y no sólo durante un pequeño período del mismo, la diferencia observada en este parámetro resultó concordante con lo esperado.

Se sabe que varias patologías incrementan *per se* el número de MN, como es el caso de la artritis reumatoide (46), así como es conocido que otras incrementan la producción de radicales libres (como en el caso de la diabetes) y como consecuencia estas deberían incrementar los MN. Por esta razón, en el presente se esperaba incremento también en los valores de los hijos de madres con HTA, incremento que si fue notorio, si bien no alcanzó significancia. Por otro lado, como se mencionó en los antecedentes, se ha descrito que las diferencias de folatos afectan el número de EMN en el humano (61,62), pues son requeridos para la síntesis de nucleótidos y su deficiencia produce



incorporación masiva de uracilo dentro de DNA y rompimientos cromosómicos, lo que puede incrementar el daño cromosómico espontáneo e influir en la respuesta genotóxica de otros compuestos, tanto en cultivos de linfocitos (62), como en estudios *in vivo* (3), como es el caso del presente. Sin embargo, los niveles de uracilo y la elevada frecuencia de MN se revierten con la administración de folatos (63), así como se ha observado efecto protector de esta vitamina cuando es administrado a mujeres durante el embarazo para disminuir los problemas de cierre del tubo neural (63), lo que lleva a pensar que el grupo de madres que recibieron ácido fólico durante el embarazo presentarían disminución de EMN, lo cual también fue observado, si bien, como en el caso anterior esto no fue estadísticamente significativo. Es posible que las diferencias se pudieran hacer más evidentes si para estudios futuros se tuviera, por un lado, la posibilidad de contar con mayor tamaño de muestra o por otro lado, obtener el frotis lo más cercano posible al momento del nacimiento, ya que en el presente estudio esta fue una variable no controlada y las recuperaciones de sangre en el menor de los casos fueron de muestras tomadas pocas horas después del nacimiento y mayormente con diferencias que llegaron a ser de hasta varios días posteriores al nacimiento. Poder contar con estos dos parámetros, permitiría tener desviaciones estándar más pequeñas y con esto, que las diferencias posiblemente se manifesten significativas. De cualquier manera, aun así se tuvo diferencia significativa en uno de los grupos, lo cual hace prometedora esta opción para futuros estudios.

El presente trabajo plantea entonces la posibilidad de estudiar el potencial teratogénico de padecimientos de la madre durante el embarazo, al mismo tiempo deja abierta la opción de valorar de la misma manera drogas administradas a mujeres gestantes durante el mismo período, al aprovechar la característica que tienen los niños prematuros de presentar EMN espontáneos debido a su inmadurez. Asimismo, se muestra evidencia del incremento de EMN en recién nacidos de madres diabéticas.

## Conclusiones

- La presencia de EMN en recién nacidos prematuros plantea la posibilidad de estudiar por medio de la prueba de MN el potencial teratogéno de padecimientos de las mujeres gestantes, así como de las drogas que les tengan que ser administradas en el mismo periodo.
- Al analizar los datos de acuerdo al género del recién nacido, así como de acuerdo a la presencia o no de patología, se observó que las niñas, así como los hijos de madres sin patología, presentaron valores menores de EMN y EPCMN en comparación con el grupo de los niños o de hijos de madres con patología, respectivamente, pero sin ser diferentes estadísticamente lo que indica una tendencia a que las niñas sean menos susceptibles a daño genotóxico, así como que el presentar patología materna puede ser condicionante de incrementar los valores de EMN.
- Al comparar los datos por el tipo específico de patología de la madre durante el embarazo, se observó incremento estadísticamente significativo en los valores de EMN de recién nacidos hijos de madres con DM, con lo que concluimos que la DM *per se* promueve la formación de MN.
- Se observó ligera disminución en el número de EMN en los recién nacidos prematuros cuya madre recibió ácido fólico respecto al grupo sin ácido fólico, aunque la diferencia no fue significativa, la disminución de la frecuencia de EMN por administración de ácido fólico demuestra el efecto protector de este tipo de compuestos, así como lo adecuado de su administración para prevenir daño al DNA.

## Bibliografía

1. Córdoba D. Toxocología. 4ª ed. Manual Moderno. Bogotá, Colombia. 2001: 18-19.
2. Zúñiga-González GM, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Gallegos-Arreola MP, Flores-García A, López-Urbe A. Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-Fluorouracil. Arch Med Res. 2003; 34: 141-144.
3. Pariza MW. Mutagens and carcinogens in the diet. Wiley-Liss. New York, USA. 1990: 1-9, 139.
4. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica. 4ª ed. Manual Moderno. México, D.F. 1991: 453-457.
5. Montoya Cabrera MA. Toxicología Clínica. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México. 1992: 315.
6. Gibson GG, Skett P. Pathways of Drug Metabolism. En: Introduction to Drug Metabolism. 2ª ed. Blackie Academic & Profesional An Imprint of Chapman & Hall. London. 1994: 1-34.
7. Plewa MJ, Gentile JM. The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: Hollander A, Series Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection. Plenum Press. New York. 1982; vol. VII: 401-420.
8. Teratogénesis. <http://www.cfnavarra.es/BIF/bxt/15/30terato.html>, 2001.
9. Venitt S. Short-term assays using bacteria. En: Montesano, R. (Eds): Long-term and Short-term Assays for Carcinogens A Critical Appraisal. IARC Scientific Publications. International Agency for Research on Cancer. Lyon. 1986; 83: 143-161.
10. Ames BN. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. En: Microbial test for Mutagenicity/Carcinogenicity. Ed. By Traul KA. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 1985; 12: 113-128.
11. Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. Mutat Res. 1985; 147: 65-78.
12. Kier LD. The Salmonella typhimurium/mammalian-microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res. 1986; 168: 69-240.
13. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, Vanparys P, MacGregor J. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. Environ Mol Mutagen. 1991; 18: 277-291.
14. Schmid W. The micronucleus test. Mutat Res. 1975; 31: 9-15.

15. Heddle J, Lue C, Saunder E, Benz R. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as a measure by the micronucleus method. *Cancer Res.* 1978; 38: 2983-2988.
16. Corazza G, 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 Haematol.* 1990; 12: 269-275.
17. Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramirez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 species. *Mutat Res.* 1996; 369: 123-127.
18. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Martínez-González S, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Ramos-Mora A, Ontiveros-Lira D, Gallegos-Arreola MP. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat Res.* 2001; 494: 161-167.
19. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguilar A, Ramos-Ibarra ML, Ramos-Mora A, Ortiz GG, Gallegos-Arreola MP. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part Two. *Mutat Res.* 2000; 467: 99-103.
20. Zúñiga-González G, Ramirez-Muñoz MP, Torres-Bugarín O, Pérez-Jiménez J, Ramos-Mora A, Zamora-Perez A, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutat Res.* 1998; 413: 187-189.
21. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguilar AJ, Ramos-Mora A, Ortiz GG, Álvarez-Moya C, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Gallegos-Arreola MP. Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: An increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine. *Environ Mol Mutagen.* 2001; 37: 173-177.
22. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor 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. *Mutat Res.* 1983; 123: 61-118.
23. Hart J, Hartley-Asp B. Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutat Res.* 1983; 120: 127-132.

24. Beaula KD, Subramanyam S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. *Mutat Res.* 1991; 263: 185-196.
25. Yamamoto KI, Kikuchi YA. Comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res.* 1980; 71: 127-131.
26. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronuclei assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1990; 245: 245-249.
27. 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.
28. Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y, Fukumoto M, Okonogi H, Kadokura M. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutagen.* 1993; 22: 101-106.
29. Zúñiga-González G. Selección de animales para ser utilizados como indicadores de agentes genotóxicos mediante el conteo de micronúcleos. Tesis doctoral, Universidad de Guadalajara. México. 1996.
30. Tice RR, Luke CA, Shelby MD. Methyl isocyanate: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity. *Environ Mol Mutagen.* 1987; 9: 37-58.
31. Herrera A, Barrueco C, Caballo C, Peña E. Effect of permethrin of the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 20: 218-228.
32. 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.
33. Torres-Bugarin O, De Anda-Casillas A, Ramirez-Muñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res.* 1998; 413: 277-281.
34. Dorland. Diccionario medico de bolsillo. 4ª ed. Interamericana-McGraw-Hill. España. 1993: 269, 685.
35. Hillman RS, Finch CA. El Eritrocito. 5ª ed. Manual Moderno. México. 1987: 18-23.

36. Guerrero-García R. Manual de Laboratorio de Hematología. Universidad Veracruzana. México. 1997: 39, 45, 50.
37. Hayashi M, Morita T, Ishidate M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res.* 1983; 120: 241-247.
38. Schreinemachers DM, Everson RB. Effect of residual splenic function and folate levels on the frequency of micronucleated red blood cells in splenectomized humans. *Mutat Res.* 1991; 263: 63-67.
39. Novales CX, Amato MJ. Sistema linfhemático. 1ª ed. Limusa. México. 1993: 57.
40. Schlegel R, MacGregor J, Everson R. Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res.* 1986; 46: 3717-3721.
41. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. *Hematology.* 4ª ed. McGraw-Hill. USA. 1990: 308.
42. Ramírez-Muñoz MP, Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Portilla E, García-Martínez D, Ramos A, Cantú JM, Sánchez-Corona J. Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model. *Lab Anim Sci.* 1999; 49: 418-420.
43. Zúñiga 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. *Mutat Res.* 1996; 361: 107-112.
44. Torres-Bugarín O, Zamora-Perez AL, Esparza-Flores A, López-Guido B, Feria-Velasco A, Cantú JM, Zúñiga G. Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1999; 56: 212-217.
45. Gómez-Meda BC, Zúñiga-González GM, Zamora-Perez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Torres-Mendoza BM. Folate supplementation of cyclophosphamide-treated mothers diminishes micronucleated erythrocytes in peripheral blood of newborn rats. *Environ Mol Mutagen.* 2004; 44: 174-178.
46. Migliore L, Bevilacqua C, Scarpato R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis* 1999; 14: 227-231.
47. Ramos-Remus C, Dorazco-Barragán G, Aceves-Ávila FJ, Alcaraz-López F, Fuentes-Ramírez F, Michel Díaz J, Torres-Bugarín O, Ventura-Aguilar A, Zúñiga-González G. Genotoxicity

- assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 208-212.
48. Torres Bugarín O. Evaluación de la genotoxicidad de drogas antineoplásicas mediante el conteo de micronúcleos y otras anomalías nucleares en mucosa bucal y micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica. Tesis doctoral. Universidad de Guadalajara. México. 2000.
  49. De Vita VT, Hellman SJr, Steven A, Rosenberg MD. *Oncology: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott-Raven Publishers, Multimedia. Philadelphia. 1997.
  50. Taylor SI. Diabetes mellitus. En: Scriver CHR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. 7ª ed. McGraw-Hill. USA. 1995: 843.
  51. Chang TI, Loeken MR. Genotoxicity and diabetic embryopathy: impaired expression of developmental control genes as a cause of defective morphogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*. 1999; 17: 153-165.
  52. Sakamaki H, Akazawa S, Ishibashi M, Izumino K, Takino H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Goto S, Urata Y, Kondo T, Nagataki S. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes*. 1999; 48: 1138-1144.
  53. Šardaš S, Yılmaz M, Öztok U, Çakır N, Karakaya AE. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat Res*. 2001; 490: 123-129.
  54. Lazalde MB. Impacto de la Diabetes mellitus gestacional en el desarrollo de anomalías congénitas y complicaciones neonatales. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. México. 2000.
  55. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Res*. 1999; 428: 17-22.
  56. Ortiz GG, Reiter RJ, Zúñiga G, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI, Oh CHS, Garcia JJ, Bitzer-Quintero OK. Genotoxicity of paraquat micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. *Mutat Res*. 2000; 464: 239-245.
  57. Lauffer MV, Retel J. Contrasting effects of SH-compounds on oxidative DNA damage: repair and increase of damage. *Mutat Res*. 1993; 295: 1-10.
  58. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 1359-1363.

59. Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, Spragg RG, Sklar LA, Cochrane ChG. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci*. 1986; 83: 4908-4912.
60. McVan BF. Índice de Medicamentos. Manual Moderno. México, D.F. 1995: 721.
61. Rodríguez-Carranza R. Vademécum Académico de Medicamentos. 3ª ed. Interamericana-McGraw-Hill. México. 2000: 19, 21, 171.
62. Fenech M, Rinaldi J. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid. *Carcinogenesis*. 1994; 15: 1405-1411.
63. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94: 3290-3295.
64. Smithells RW, Shepard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP. Possible prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet*. 1980; 1: 339-340.
65. Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Espinoza-Jiménez S, Gallegos-Arreola MP, Álvarez-Moya C, Torres-Bugarin O. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42: 306-310.
66. Frosini V. Derechos Humanos y Bioética. Temis: Colombia. 1997: 108.
67. Hernández-Arriaga JL. Ética en la Investigación Biomédica. Manual Moderno. México, DF. 1999: 43.
68. Ley General de Salud. SISTA. México, D.F. 2002: 32-34.



## Glosario

- **Anafase.** Tercera etapa de la mitosis o de la meiosis (I o II) durante la cual los cromosomas o cromátides 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.
- **Antineoplásico.** Inhibe o impide la evolución de neoplasia, mediante la restricción de la maduración y la proliferación de células malignas.
- **RNA.** ARN, ácido ribonucleico. Ácido nucleico de cadena sencilla similar al DNA pero que contiene el azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa y uracilo en lugar de timina como una de las bases nitrogenadas.
- **Cáncer.** Tumor maligno formado por la multiplicación desordenada de las células de un tejido o de un órgano, cuyo curso natural suele conducir a la muerte. Los cánceres se clasifican en dos grandes grupos: carcinomas y sarcomas.
- **Cancerígeno.** Cualquier agente que produce cáncer (carcinógeno).
- **Centrómero.** Región constreñida de un cromosoma nuclear a la que se unen las fibras del huso durante la división. 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 mitótico.
- **Clastógeno.** Agente capaz de ocasionar rupturas en las hebras de DNA.
- **Cromosoma.** Cuerpo constituido por DNA y proteínas; 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.
- **DNA.** ADN, ácido desoxirribonucleico. Doble cadena de nucleótidos enlazados (que contienen como azúcar desoxirribosa); materia fundamental de la que están compuestos los genes.

- **Eritrocitos micronucleados (EMN).** Eritrocitos que presentan micronúcleos. Se valora su número en 10,000 eritrocitos totales (normocromáticos y policromáticos) para determinar daño acumulado.
- **Eritrocitos policromáticos (EPC).** Eritrocitos que recién han salido a la circulación, Se observan de color rojo o naranja con la tinción de naranja de acridina. Se determina la proporción de EPC en 1,000 eritrocitos totales como control del sistema, para determinar si el compuesto se vuelve citotóxico.
- **Eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN).** Eritrocitos jóvenes que presentan micronúcleos. Se valora su número en 1,000 EPC para observar el efecto del compuesto probado en las últimas 24 a 48 horas.
- **Esplenectomizado.** Individuo que ha sufrido extirpación del bazo.
- **Exógeno.** Que se desarrolla o se origina fuera del organismo.
- **Genético.** Perteneciente o relativo a la reproducción, nacimiento u origen. Determinado por genes.
- **Genotóxico.** Agente que afecta al DNA.
- **Micronúcleo.** Fragmento de un cromosoma o cromosoma completo que por alguna causa no puede ser integrado al núcleo, por lo que permanece en el citoplasma celular.
- **Micronucleogénico.** Agente formador de micronúcleos.
- **Mitosis.** Tipo de división nuclear, que ocurre durante la división de la célula, que da lugar a dos núcleos idénticos al núcleo original.
- **Telofase.** Periodo de la división celular donde los cromosomas de las células hijas alcanzan los polos de la célula. Fase tardía de la división nuclear en la que se vuelven a formar los núcleos "hijos".
- **Teratógeno.** Agente o factor que produce defectos físicos en el embrión en desarrollo. Cualquier agente que interfiere con el desarrollo normal. Agente que

produce una anomalía congénita o aumenta la frecuencia de una anomalía en la población.

- **Xenobiótico.** Sustancias químicas extrañas, incluidas las fabricadas por el hombre o los productos naturales; se incluyen fármacos, sustancias industriales, plaguicidas, contaminantes, productos de pirólisis de alimentos cocinados, alcaloides, metabolitos secundarios de plantas y toxinas producidas por mohos, plantas y animales. Muchos xenobióticos deben someterse a biotransformación para ejercer su efecto tóxico o cancerígeno característico.

## *El conocimiento no te da la sabiduría*

Había una vez un sabio y un académico que entablaron el siguiente diálogo:

-Hay quienes piensan que son inteligentes porque han leído a los clásicos y han sido educados en las grandes universidades o porque ostentan títulos académicos -decía el hombre sabio.

-¿Cómo es que dices tantas barbaridades? -Protestó el académico-  
Tal parece que estas en contra de la ciencia.

-No estoy en contra de la ciencia, pero voy con todas mis fuerzas a favor de la verdadera sabiduría, la que está dentro de las plantas, de los animales, la que está a favor de la vida; la que se manifiesta en la contemplación callada de todo lo que sucede, a pesar de que sea a favor o en contra de las propias expectativas.

-¡Ah!, maestro loco, entonces para ti es mejor no pensar que pensar -insistió el académico.

-Estoy a favor de lo que te haga más sensible y te dé más vida. Estoy en contra de lo que te aprisiona en visiones pesimistas de ti y de los demás. Para mí el único sentido de tener razón es mejorar la existencia y no echarla a perder. La mente es la vara mágica que puede crear nuevos cielos o construir antiguos infiernos.

-No entiendo que quieres decir -dijo el académico.

-Mirate a ti mismo -insistió el sabio-. ¿De qué te sirve todo tu conocimiento, tus títulos, si te pasas el tiempo lamentando los mil sucesos que te han pasado, sufriendo y sufriendo en el mar de tus absurdos, ni para ti ni para nadie?

*El tener conocimientos, títulos académicos, no es malo -expresó la voz-. El mal está en creer que ya se sabe todo sobre la vida, porque eso no es cierto. La vida es mucho más de lo que dicen los libros o los conocimientos acumulados a través de los siglos. La vida es uno mismo, y el que no se da el tiempo para extraer de sí mismo la verdadera belleza para vivir a pesar de todo conocimiento es, en conclusión, un ignorante.*

*Dr. Horacio Jaramillo Loya.*