

C0381
2ej.
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTO DE LA DESNUTRICION SOBRE
LAS CELULAS DE LA MEDULA OSEA
DE RATA”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)**

P R E S E N T A :

ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

MEXICO, D. F.,

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Páginas
RESUMEN	1 - 3
I. ANTECEDENTES	4 - 57
A) <u>Desnutrición</u>	4 - 31
1) Definición e importancia	4
2) Breve revisión histórica	11
3) Estudios sobre desnutrición en animales	15
4) Alteraciones causadas por la desnutrición	17
4.1 Alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas.	17
4.2 Alteraciones inmunológicas.	21
4.3 Alteraciones en la conducta, desarrollo mental y aprendizaje.	23
4.4 Alteraciones a nivel celular.	24
4.5 Alteraciones a nivel citogenético.	28
4.6 Alteraciones a nivel molecular.	30
B) Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH)	32-40
1) Definición y detección	32
2) Significado biológico	34
3) Mecanismos propuestos sobre la formación de ICH	35

4) Los ICH como indicadores de daño	38
4.1 Por agentes químicos y físicos	38
4.2 En padecimientos genéticos	40
C) Proliferación Celular	41-55
1) Definición del ciclo celular	41
2) Características de las fases del ciclo	41
3) Regulación del ciclo	44
4) Estudios sobre proliferación celular	49
5) Estudios sobre proliferación mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas	54
D) Médula Osea.	55-57
1) Características generales	55
2) Estudios citogenéticos en médula ósea	56
E) Planteamiento del estudio	58
II OBJETIVOS	59
III MATERIALES Y METODOS	60-67
1) Animales	60
2) Desnutrición experimental	60
3) Recuperación de la desnutrición	62

4) Incorporación de 5-Bromodesoxiuridina	62
a) <u>In vivo</u>	
b) <u>In vitro</u>	
5) Extracción de la médula ósea	62
6) Cosecha de células	63
7) Realización de preparaciones	64
8) Tinción diferencial de cromátidas hermanas	64
9) Análisis de las preparaciones	65
a) Proliferación celular	
b) Índice mitótico	
c) Frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas	
10) Cuantificación de proteínas séricas	66
11) Estadística	66
 IV RESULTADOS	 67-104
A) Estudio <u>In Vivo</u> en Ratas Desnutridas de 21 días de edad:	67-76
1) Evaluación de la desnutrición.	67
a) Peso corporal	
b) Proteínas séricas	
2) Proliferación celular	71
3) Índice mitótico	71
4) Frecuencia de ICH	71

B)	Estudio de la Recuperación Nutricional <u>In Vivo</u> en Ratas de 42 días de edad	76-88
	5) Evaluación de la recuperación nutricional	76
	a) Peso corporal	
	b) Proteínas séricas	
	6) Proliferación celular	81
	7) Índice mitótico	84
	8) Frecuencia de ICH	84
C)	Estudio <u>In Vitro</u> en Ratas Desnutridas de 21 días de edad	89-101
	9) Proliferación celular	89
	10) Índice mitótico (IM)	100
	11) Frecuencia de ICH	101
V	DISCUSION	105-118
A)	Desnutrición	105
B)	Estudio <u>In Vivo</u> a los 21 días de edad	105-112
C)	Recuperación Nutricional. Estudio <u>In Vivo</u> a los 42 días de edad	113-115
D)	Estudio <u>In Vitro</u> a los 21 días de edad	115-118
VI	CONSIDERACIONES FINALES	119
VII	BIBLIOGRAFIA	120-138

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Interrelación entre factores biosociales y baja ganancia de peso	10
Figura 2. Reacciones celulares por deficiencia de proteínas	25
Figura 3. Mecanismo para la tinción diferencial entre cromátidas hermanas por la incorporación de BrdU	53
Figura 4. Diagrama del Diseño Experimental	61
Cuadro 1. Peso corporal (gr) de ratas testigo y desnutridas desde el día siguiente a su nacimiento hasta el destete (21 días) de edad	68
Gráfica 1. Desnutrición durante la lactancia. Curva de incremento en peso	69
Cuadro 2. Concentración de proteínas séricas (ug/ml de suero) en ratas desnutridas y testigo de 21 días de edad	70
Cuadro 3. Porcentaje de mitosis en primero, segundo y tercer ciclo de duplicación <u>in vivo</u> en ratas testigo y desnutridas de 21 días de edad (18 hrs de incorporación de BrdU)	73
Cuadro 4. Tiempo promedio de generación (TPG) <u>in vivo</u> en ratas testigo y desnutridas de 21 días de edad	<u>73</u>

Cuadro 5.	Índice mitótico en ratas, testigo y desnutridas de 21 días de edad inyectadas con BrdU 18 horas antes del sacrificio	74
Cuadro 6.	Frecuencia de ICH <u>in vivo</u> en ratas testigo y desnutridas de 21 días de edad	75
Cuadro 7.	Distribución del número de ICH por mitosis <u>in vivo</u> en ratas testigo y desnutridas de 21 días	77
Gráfica 2.	Distribución de ICH <u>in vivo</u> en ratas de 21 días de edad.	78
Cuadro 8.	Peso corporal (gr) de ratas testigo y en recuperación nutricional desde el destete hasta los 41 días de edad	79
Gráfica 3.	Recuperación de la desnutrición. Curva de incremento en peso	80
Cuadro 9.	Concentración de proteínas séricas (ug/ml) de ratas testigo y recuperadas de la desnutrición de 42 días de edad	82
Cuadro 10.	Porcentaje de mitosis en primero, segundo y tercer ciclo de duplicación en ratas bien nutridas y en recuperación de la desnutrición de 42 días de edad	83
Cuadro 11.	Índice mitótico en ratas bien nutridas desde su nacimiento y en ratas en recuperación nutricional de 42 días de edad (IM/1000 células)	85

Cuadro 12.	Frecuencia de ICH en ratas con 21 días de recuperación nutricional (42 días de edad) y en ratas bien nutridas de la misma edad como testigos	86
Cuadro 13.	Distribución de ICH/mitosis en ratas bien nutridas desde su nacimiento y en ratas en recuperación nutricional de 42 días de edad.	87
Gráfica 4.	Distribución de ICH <u>in vivo</u> en ratas en recuperación nutricional	88
Cuadro 14.	Porcentaje de mitosis en primero, segundo y tercer ciclo de duplicación <u>in vitro</u> en ratas testigo y desnutridas con 20 horas de incorporación de BrdU	90
Cuadro 15.	Porcentaje de mitosis en primero, segundo y tercer ciclo <u>in vitro</u> en ratas testigo y desnutridas con 25 horas de incorporación de BrdU	91
Cuadro 16.	Porcentaje de mitosis en primero, segundo y tercer ciclo <u>in vitro</u> en ratas testigo y desnutridas con 30 horas de incorporación de BrdU	93
Cuadro 17.	Porcentaje de mitosis en primero, segundo y tercer ciclo <u>in vitro</u> en ratas testigo y desnutridas con 35 horas de incorporación de BrdU	94
Cuadro 18.	Porcentaje de mitosis en primero, segundo y tercer ciclo <u>in vitro</u> en ratas testigo y desnutridas con 40 horas de incorporación de BrdU	95

Cuadro	19.	Tiempo promedio de generación (TPG) <u>in vitro</u> en ratas bien nutridas y desnutridas	97
Cuadro	20.	Proliferación <u>in vitro</u> desde las 20 hasta las 40 horas en ratas desnutridas y bien nutridas de 21 días de edad	98
Gráfica	5.	Proliferación <u>in vitro</u> en ratas bien nutridas y desnutridas de 21 días de edad	99
Cuadro	21.	Indice mitótico <u>in vitro</u> desde las 20 a las 40 horas en ratas desnutridas y bien nutridas	101
Cuadro	22.	Frecuencia de ICH <u>in vitro</u> en ratas bien nutridas y desnutridas de 21 días de edad	102
Cuadro	23.	Distribución de ICH por mitosis <u>in vitro</u> en ratas desnutridas y bien nutridas de 21 días de edad	103
Gráfica	6.	Distribución de ICH <u>in vitro</u> en ratas de 21 días de edad	104

R E S U M E N

La desnutrición calórico proteica (DCP) es una enfermedad grave que representa un serio problema de salud pública en nuestro país. Los daños causados por ella se dan en primera instancia a nivel celular.

La médula ósea es un tejido de gran importancia biológica, con alta actividad celular y recambio además de ser una población de células que ha mostrado ser muy sensible a los efectos del medio ambiente y es también de fácil manejo técnico, por las razones anteriores se escogió en el presente estudio como modelo para evaluar en ella el efecto de la desnutrición.

En este trabajo se realizaron estudios sobre los efectos de la desnutrición tanto in vivo como in vitro sobre las células de la médula ósea de ratas desnutridas durante la lactancia por competencia de alimento, se escogió esta etapa de la vida por ser un momento crítico en el cual el desarrollo se encuentra acelerado. Dado que es de gran importancia el determinar si los efectos causados por la desnutrición pueden revertirse, se evaluó in vivo la recuperación en este tipo celular en ratas que después de ser desnutridas durante la lactancia fueron alimentadas adecuadamente durante un periodo de 21 días tiempo igual al de la lactancia.

Como parámetros de apoyo del estado nutricional se analizaron el peso corporal y la concentración de proteínas séricas. A los 21 días de edad la diferencia en peso en las ratas desnutridas fue de alrededor de 50% en relación a ratas alimentadas adecuadamente. Durante la recuperación nutricional este déficit de peso disminuyó hasta llegar a ser de 21% a los 42 días de edad.

Otro indicador de desnutrición son los niveles bajos de proteínas presentes en el suero de organismos con DCP, en ellos esta concentración fue significativamente menor (53.0 $\mu\text{g/ml}$) al observado en las ratas bien nutridas (67.5 $\mu\text{g/ml}$). Después del periodo de recuperación se obtuvieron valores de 61.1 $\mu\text{g/ml}$ en el grupo testigo y 73.5 $\mu\text{g/ml}$ en las ratas recuperadas de la desnutrición, lo que demuestra que la diferencia no sólo se elimina sino que se obtienen valores mayores después del periodo de recuperación.

Se evaluaron la proliferación celular y la frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) mediante la técnica de tinción diferencial de cromátidas por incorporación de 5-bromo-desoxiuridina (BrdU).

Los resultados *in vivo* obtenidos en las ratas desnutridas a los 21 días de edad mostraron un severo retraso en la proliferación celular, tienen un tiempo promedio de generación (TPG) de 15.9 horas, significativamente mayor al observado en las células de las ratas bien nutridas de la misma edad, el cual fue de 11.6 horas.

La frecuencia de ICH *in vivo* fue significativamente mayor en las ratas desnutridas se obtuvo un promedio de ICH/mitosis de 3.4 para ellas y de 2.5 para las ratas testigo. La distribución fue también significativamente diferente se observó en las células de los organismos desnutridos un 23% de mitosis con cero o un ICH/mitosis y 39% en las de los bien nutridos, los primeros muestran los porcentajes más altos de células con mayor número de ICH.

Después de 21 días de recuperación nutricional se observó que la velocidad de proliferación en las células de la médula ósea se incrementó hasta alcanzar tiempos de duración de ciclo celular semejantes y aún ligeramente mayores a los que presentan las células de animales bien nutridos de la misma edad. Los TPG obtenidos fueron de 12.2 horas para las ratas testigo y 11.5 horas para las ratas en recuperación nutricional. En relación a la frecuencia de ICH se determinó que después de la recuperación nutricional no se observó diferencia entre el grupo testigo y el grupo en recuperación con valores de 2.3 ICH/célula en ambos casos, la distribución de ellos también fue similar en los dos grupos de ratas. Los datos observados en las ratas con recuperación nutricional en cuanto a la proliferación celular y frecuencia de ICH, mostraron que en las células de la médula ósea el daño causado por la desnutrición puede eliminarse lo que debe estar relacionado con el alto recambio celular de este tejido.

El estudio de la proliferación celular en cultivo de médula ósea mostró que la duración total del ciclo fue mayor en las células de organismos con DCP aún *in vitro*, a la que se observó en los bien nutridos, se obtuvo un TPG de 21 horas y 17.5 horas respectivamente.

El obtener tiempos de generación significativamente diferentes in vivo e in vitro y el hecho de que la diferencia obtenida en relación a la proliferación celular entre los dos grupos de animales es menor en las condiciones de cultivo, indican que el comportamiento celular en este caso es diferente, esto debe estar relacionado con el hecho de que al cultivar las células el medio y microambiente son diferentes.

La frecuencia de ICH in vitro en las ratas desnutridas y bien nutridas fue similar, de 5.0 para las primeras y de 4.8 para las segundas, se muestra que en cultivo la diferencia observada in vivo se pierde, las posibles explicaciones de esto serian: que el daño puede ser reparado o bien que las condiciones de cultivo enmascaran la producción de ICH. La frecuencia en ambos grupos es significativamente mayor a la observada en el estudio in vivo lo que representa una elevación en la frecuencia basal.

En este trabajo se quiere enfatizar una vez más la importancia que tiene la DCP, al estudiar los efectos causados por este padecimiento a nivel celular se pretende contribuir al mejor tratamiento de él, y en un futuro quizá conocer porque algunos organismos son más susceptibles que otros a padecerlo.

I - ANTECEDENTES

A) DESNUTRICION.

1) Definición e importancia.

La nutrición es un factor de suma importancia para el crecimiento y desarrollo óptimo. Actualmente es claro que una dieta adecuada en cantidad y calidad de alimento es un factor relevante en la vida del hombre desde su concepción hasta su muerte. La nutrición es capaz de afectar el crecimiento, el desarrollo y la salud.

La desnutrición es uno de los principales problemas de salud pública en los países subdesarrollados. Estudios sobre la mortalidad infantil y preescolar en países latinoamericanos, revelan que la desnutrición es responsable directa o indirecta de más de un tercio de las muertes de niños de 0 a 5 años. (Arrieta y Cravioto 1982).

Se considera que aproximadamente la mitad de la población mundial total ha sobrevivido a un periodo de desnutrición moderada o avanzada durante la infancia, se calcula que de los 1,000 millones de niños menores de 15 años que vivieron en 1980 alrededor de 400 millones no recibieron dietas adecuadas, por operar en sus sociedades factores que interfieren con la adecuada distribución del alimento disponible.

No se conoce con exactitud el número de casos de desnutrición calórico-proteica grave en relación a la población de alto riesgo en un tiempo determinado. Sin embargo las estimaciones hechas en diferentes regiones preindustrializadas, varían de 0.5 al 7 % en los niños menores de 5 años.

Se conoce con el nombre de desnutrición calórico-proteica (DCP) el conjunto de síntomas y signos clínicos y bioquímicos que se observan en niños a consecuencia de una deficiente ingestión y/o utilización de dietas de variados contenidos calóricos y bajo contenido proteico. En última instancia, la deficiencia nutricional se desarrolla cuando las células del organismo no cuentan con las cantidades de nutrientes esenciales para las funciones metabólicas normales (Arrieta y Cravioto, 1982).

El estado de nutrición del niño depende de:

Los alimentos que existan a su alcance

Del consumo que se haga de estos alimentos y

De que los nutrientes ingeridos en los alimentos consumidos sean adecuadamente aprovechados.

Por lo tanto la desnutrición puede ser producida por cualquier causa que interfiera con:

La cantidad o calidad del alimento disponible

La cantidad o calidad del alimento consumido

Porque a pesar de una ingestión cualitativa y cuantitativamente correcta, algunas condiciones fisiopatológicas impiden el aprovechamiento adecuado de uno o más nutrientes.

Al tomar como base la causa, la desnutrición se puede clasificar como primaria, secundaria o mixta. Se conoce como desnutrición primaria cuando el aporte de nutrientes es insuficiente para llenar los requerimientos del niño. Secundaria o condicionada, cuando se debe a alteraciones en la fisiología normal del organismo, y Mixta cuando están presentes los dos componentes.

La desnutrición secundaria o condicionada se origina por:

Dificultad para la ingestión (ej: obstrucción del tubo digestivo, vómitos).

Absorción inadecuada (ej: peristaltismo acelerado, disminución de la superficie intestinal).

Utilización incorrecta (ej: Hipotiroidismo, Diabetes mellitus).

Excreción exagerada (ej: Síndrome nefrótico).

Aumento del catabolismo (ej: infecciones).

En la mayoría de los casos de desnutrición la causa es primaria, esto es, por un aporte insuficiente de nutrientes.

Cualquiera que sea la causa, la nutrición inadecuada conduce a la disminución de las reservas tisulares o autofagia, fundamentalmente de tejido adiposo y muscular.

Distintos órganos y tejidos sufren las consecuencias de la desnutrición a diferentes tiempos y velocidades, al parecer relacionadas con la jerarquía funcional y anatómica que tienen en el organismo (Arrieta y Cravioto, 1982).

Se han considerado en los niños con desnutrición severa signos de muy mal pronóstico :

Inmovilidad,, apatía, poca relación con el medio ambiente y posición fetal.

Rechazo al alimento.

Hipotermia o crisis de hipotermia.

Sequedad de las mucosas orales y respiración boqueante.

Coloración terrosa de la piel acompañada de decaimiento súbito y piel marmórea (shock enmascarado).

Algunos puntos que han sido considerados como fundamentales en el tratamiento son:

No indicar ayuno y sólo en casos indispensables recurrir a ello (ej: Vómito, distensión abdominal e insuficiencia respiratoria severa).

Iniciar la alimentación tan pronto como sea posible, si es necesario con sonda nasogástrica

Controlar las infecciones y considerarlos como pacientes infectados hasta no demostrar lo contrario (las infecciones, aun las graves son silentes en la mayoría de los casos)

Controlar el desequilibrio hidroelectrolítico que constituye un signo agregado de la desnutrición

Estimulación sistematizada como: sala luminosa, no dejarlos mucho tiempo en las cunas, hablarles constantemente, cargarlos, arrullarlos, proporcionarles juguetes y utensilios que constituyan un reto para una habilidad específica y capaz de ser superada.

Por otro lado, a las madres de los niños internados se les debe incorporar para su participación, con los siguientes objetivos fundamentales:

Adiestrarlas en la alimentación

Cambiar actitudes negativas en la crianza de los niños

Tratar de redistribuir el ingreso familiar a manera de que los niños reciban los alimentos de más alto valor biológico.

Los términos "kwashiorkor" y "marasmo" corresponden a las dos expresiones clínicas extremas del síndrome; su presencia está determinada por una serie de factores que incluyen: edad del niño, edad del destete, edad de introducción de alimentación suplementaria, densidad calórica y concentración proteica de los suplementos que ingiere el niño, así como a la frecuencia y gravedad de procesos infecciosos.

La desnutrición se presenta fundamentalmente en niños lactantes y preescolares, principalmente en los lactantes destetados tempranamente, que reciben dietas deficientes en proteínas de origen animal, acompañada de ingestiones variables de alimentos ricos en carbohidratos y sufren infección gastrointestinal intercurrente o de algún padecimiento acompañado de fiebre elevada (Cravioto y Arrieta 1982)(a).

En general el marasmo predomina en las áreas urbanas, en tanto que el kwashiorkor, prevalece en las áreas rurales, con tendencia a ser desplazado por el marasmo a medida que disminuye la alimentación al seno materno y las condiciones ambientales no se modifican (Arrieta y Cravioto, 1982).

En general la desnutrición marasmática se presenta en lactantes menores de un año, con la característica más relevante de disminución en contenido de grasa y músculo. El tipo kwashiorkor es más común en el preescolar con la característica más relevante de presentar edema. Existe una forma mixta en la que hay disminución notable de grasa subcutánea y de las masas musculares con presencia de edema, a esta forma clínica se la ha denominado desnutrición tipo kwashiorkor marasmática.

Los niños con desnutrición severa presentan síntomas denominados signos universales que están siempre presentes.

A continuación se enumeran estos signos definidos por Arrieta y Cravioto en 1977:

1. Alteración del crecimiento y desarrollo.
2. Dilución y alteraciones del metabolismo hidromineral, aumento del contenido de agua de los espacios intra y extracelulares, disminución del potasio intracelular, sodio intracelular elevado, calcio y fosfatos bajos.
3. Desproteïnemia.
4. Alteraciones en el funcionamiento renal.
Disminución de la filtración glomerular y del flujo plasmático renal.
5. Alteraciones endócrinas.
Disminución del metabolismo basal y del consumo de oxígeno.
6. Trastorno del metabolismo de las grasas.
La absorción de grasa se encuentra disminuida.
Concentraciones plasmáticas bajas de lípidos totales.
7. Alteraciones inmunológicas.
Inmunidad celular afectada, la capacidad para producir anticuerpos específicos está disminuida.

También se pueden presentar un gran número de síntomas denominados signos circunstanciales que son a veces tan evidentes que facilitan el diagnóstico:

1. Edema.

2. Lesiones en la piel y faneras:

Piel seca y fría

Piel tipo pelagroides hipercrómica o con descamación de grandes o diminutas colgajas

Lesiones gangrenosas y ascaras

Cabello lacio, escaso, quebradizo, ocasionalmente desprendible

A nivel de comunidad la desnutrición debe considerarse como una enfermedad causada por el hombre, quien al permitir el mantenimiento de un sistema social inadecuado, permite que se produzcan individuos desnutridos, generación tras generación, mediante la interacción de una serie de mecanismos sociales entre los que destacan: un acceso limitado a bienes y servicios, una movilidad social limitada y la restricción de obtener experiencias en etapas cruciales de la vida (Cravioto, 1975).

Lo anterior demuestra claramente que es en los países pobres en donde la desnutrición es un problema dramático, debido a que gran parte de la población pertenece a un sector marginado, lo cual determina una alta prevalencia de desnutrición.

La desnutrición tiene las mismas características clínicas y de patología bioquímica en todos los países. Cravioto en 1970 con datos obtenidos en varias comunidades de México, América Central, Sudamérica y África, realizó un análisis en que determinó que la desnutrición es un resultado ecológico en donde están interactuando diversos factores que dan como resultado una ganancia insuficiente de peso en el lactante menor, que es una de las características más obvias de la desnutrición. En el diagrama de flujo presentado por el autor resaltan como factores determinantes la pobreza, la falta de educación y el cuidado inadecuado del niño de donde se originan los otros factores interactuantes que dan como resultado niños desnutridos. En la Figura 1 se muestra la interrelación entre factores biosociales y baja ganancia de peso. (Cravioto, 1967).

2) Breve revisión histórica.

Sin duda la DCP no es una enfermedad reciente, sin embargo su reconocimiento y caracterización empezó alrededor de los años cincuentas.

El período descriptivo de la desnutrición abarca desde finales del siglo pasado hasta la década de 1940, hay numerosos informes con una gran variedad de nombres. En general se referían a alguna característica específica del padecimiento o simplemente reportan al cuadro clínico según sus propias observaciones (Cravioto y Arrieta, 1982)(b). Frenk en 1978 hizo mención de dos informes del siglo pasado acerca de desnutrición avanzada que son los siguientes: En 1865 Hinojosa describió un padecimiento que se presentaba generalmente en niños en la época del destete, entre el primero o segundo año de vida, considera el primer síntoma la diarrea, describe también el edema y algunas lesiones de la piel y escribe "aunque la diarrea aumenta no hay sed o es muy poca, el apetito es nulo y los niños están muy tristes". Frecuentemente el cuadro conducía a la muerte en dos o tres meses a partir de su inicio. También en 1865 Coindet informó sobre una epidemia de ese padecimiento en el pueblo de la Magdalena y concluye su reporte según Frenk con las siguientes palabras "y sobre todo se debe suprimir la miseria! grave problema social, tratase de una villa o un pueblo, cuya solución erradicaría ciertamente además de la diarrea muchas otras enfermedades. Pero es más fácil en este punto hacerse de esperanzas que proporcionar consejos". No le fue asignado a este cuadro clínico ningún nombre, se le consideró como una enfermedad rara.

Correa en 1908 realizó una descripción clínica prácticamente completa de lo que posteriormente se denominaría desnutrición tipo kwashiorkor. El estudio se realizó en niños preescolares de Yucatán y la llamó Culebrilla (al parecer por la caída de los colgajos pelagroides que se desprenden durante la enfermedad). Los síntomas principales que encontró fueron diarrea que no cedia a los tratamientos de aquella época (atoles, reposo, carbonato y agua), edema principalmente en los miembros inferiores y palidez de la piel. Mencionó que de alguna manera estaba relacionada con la nutrición, aunque también se presentaba la enfermedad en niños de "buena clase social" que aparentemente deberían, tener una buena ingesta de alimentos. La descripción clínica de Correa es reconocida como la primera y la más completa de todas las que se han hecho hasta el momento (Cravioto y Arrieta, 1982) (b).

Ruiz Escalona en 1948, en una comunicación de tipo descriptivo, llamó atrepsia o síndrome atrépsico a la desnutrición grave de los lactantes menores y es la primera descripción integrada de lo que posteriormente se denominaría desnutrición tipo marasmo (Cravioto y Arrieta, 1982)(b). Realizó una correlación anatomoclínica y fisiopatológica, intentó sistematizar factores etiopatogénicos y habló también por primera vez de la regresión del desarrollo funcional, anotando que "en el lactante menor, la disminución de las funciones tiene que equivaler a un retraso del desarrollo de éstas, y en el lactante muy pequeño el retraso o la regresión tienen que ser máximos, puesto que alcanzan una etapa del desarrollo comparable con la del prematuro, muy marcada, incapaz o casi incapaz de vivir fuera del medio extrauterino".

En 1946 apareció el artículo clásico del Dr. Federico Gómez intitulado "Desnutrición", con él la enfermedad adquiere identidad. Se adopta definitivamente el término desnutrición y se elimina la confusión ya que se usaba una amplia variedad de nombres para denominar al mismo padecimiento: Las entidades clínicas llamadas hipotrepsia, hipotrofia, distrofia, atrepsia, atrofia de Parrot, descomposición, consunción, mal nutrición y otras más que son, sencillamente, distintos grados de un mismo padecimiento. Señaló que el padecimiento se debe a la asimilación deficiente de alimentos por el organismo y que es debido a la pérdida anormal de peso desde la más ligera hasta la más grave. Hizo la clasificación sencilla, actualmente vigente, de la desnutrición en tres grados, según el porcentaje de pérdida de peso corporal.

- Desnutrición de primer grado:

Desnutrición moderada o que ha actuado por poco tiempo.

Déficit de peso corporal del 10 al 24% del promedio correspondiente para la edad.

- Desnutrición de segundo grado:

Desnutrición más marcada que la anterior. Déficit de peso del 25 al 39% del promedio correspondiente para la edad, frecuentemente requiere hospitalización.

- Desnutrición de tercer grado

Desnutrición severa equivalente a la DCP. Las reservas del organismo están prácticamente agotadas. Déficit de peso de más del 40% del promedio correspondiente a la edad. Se producen cambios serios a nivel somático y funcional e inclusive psicológicos; requiere hospitalización. La tasa de mortalidad para éstos niños es mucho más elevada que para las dos categorías anteriores. Es difícil determinar exactamente la mortalidad en éstos casos, ya que muchos de ellos mueren sin siquiera llegar a los hospitales.

Se llegó al conocimiento de que cualesquiera que fueran las manifestaciones la desnutrición se origina por el consumo de dietas pobres en proteínas de origen animal con ingestas variables de calorías y que las particularidades las establecen fundamentalmente las variaciones de la ecología local y la edad del niño. Lo anterior es lo que se considera como el primer período en la investigación sobre la nutrición que corresponde a la búsqueda o reconocimiento de una entidad nosológica.

El segundo período corresponde a la investigación de los mecanismos productores de la enfermedad, cuya comprensión fundamentó el tratamiento racional del padecimiento a nivel individual y de esta forma se logró disminuir la mortalidad (Cravioto y Arrieta, 1982)(b).

Las observaciones sistematizadas que se iniciaron, comenzaron a poner en claro algunos aspectos básicos del tratamiento. Desde los primeros reportes de la enfermedad se le daba un gran valor a las transfusiones de pequeños volúmenes diarios de sangre o plasma, así como preparados multivitamínicos. Se determinó que el tratamiento en el episodio agudo era de vital importancia y que la desnutrición propiamente dicha cedía con una dieta normal consumida en régimen de libre demanda. No era necesario usar vitaminas como especialidades farmacéuticas salvo en indicación precisa de una deficiencia específica (Gómez et al 1954). Lo más importante es una dieta normal "rica en calorías y proteínas de alto valor biológico, agradable, de fácil ingestión y digestión" (Gómez et al 1958).

Respecto al niño bien nutrido, se detectó en los niños desnutridos una disminución crónica de potasio intracelular, incremento notable del contenido intracelular de agua y sodio por kilogramo de peso, se observó lo anterior en los dos tipos de desnutrición (Frenk et al 1957).

Se describieron los cambios que ocurren en piel y músculo cuando los niños se agravan y mueren, los delicados mecanismos homeostáticos, la función renal y la forma en que los niños desnutridos reparaban las lesiones bioquímicas (Gómez et al 1957). Aparecieron descripciones preliminares acerca del metabolismo de las proteínas, grasas y carbohidratos, así como del funcionamiento de diversos órganos lo cual permitió, al final de la década de los cincuentas, establecer un tratamiento racional del padecimiento y disminuir diez veces la letalidad de la desnutrición grave. A esto contribuyó también el estudio epidemiológico de la letalidad en la sala de desnutrición, la correlación clinico-patológica de niños que murieron durante su estancia en la sala hospitalaria y las armas adquiridas para combatir las infecciones tales como los antibióticos (Ramos Galván, et al, 1958).

Se llegó a la conclusión de que, si bien la desnutrición propiciaba la muerte, eran las infecciones y el desequilibrio hidroelectrolítico lo que realmente mataba a los niños (Gómez et al, 1958).

Alrededor de 1955 se reconoció como una enfermedad ampliamente distribuida por el mundo con las mismas características básicas en todos los lugares, aunque con variaciones regionales de importancia secundaria. También se determinó su mayor frecuencia en los niños ya que los requerimientos de proteínas por unidad de peso corporal es 5 veces mayor en éstos que en los individuos cuyo crecimiento ha terminado (Waterlow et al, 1960).

Un logro fundamental en este tiempo fue el disminuir la mortalidad de los niños desnutridos que ingresaban al hospital. La muerte se presentaba más frecuentemente durante las primeras 48 horas de hospitalización, en aquel entonces, de 50 a 60 niños de cada 100 desnutridos de tercer grado morían; la mayoría de las veces sin que se supiera cual había sido la causa y también sin que clínicamente pudiera predecirse de una manera más o menos regular la inminencia de la muerte.

También se describió el síndrome de recuperación nutricional que comenzaba a aparecer entre los 15 o 20 días del tratamiento conducido con éxito, se observó en todas las formas clínicas de desnutrición, fue más evidente en niños preescolares con edema y lesiones en la piel (Gómez et al 1951). Los estudios posteriores han demostrado que signos y síntomas del síndrome de recuperación nutricional son transitorios.

Al disminuirse la mortalidad se hizo evidente la importancia del estudio de las posibles secuelas de la desnutrición sobre el desarrollo del individuo, ya que se determinó que muchas características del niño desnutrido eran semejantes a las de niños de mucha menor edad cronológica (Cravioto, 1962). Emergió la evidencia de que esta regresión parecía afectar también el desarrollo mental (Cravioto, 1963) y se comprobó que tiene efectos negativos en el crecimiento físico (Ramos Galván et al., 1960).

Surgió entonces lo que se considera el tercer periodo en la investigación sobre nutrición esto es: la investigación de la etiología a nivel comunal y las alternativas para eliminar los factores productores es decir, la prevención. Se amplió la investigación a factores ambientales que determinen una mayor susceptibilidad a la desnutrición.

A partir de los años cincuentas se han realizado gran cantidad de estudios sobre desnutrición en muy diversos aspectos. Debe resaltarse con orgullo que investigadores mexicanos han trabajado sobre desnutrición dando aportaciones muy importantes, iniciaron sus estudios como pioneros en el Hospital Infantil de México el grupo encabezado por el Dr. Federico Gómez y continúan trabajando en la actualidad en el Instituto para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF) el grupo encabezado por el Dr. Joaquín Cravioto

3) Estudios sobre desnutrición en animales.

Es claro que los estudios en humanos son representativos de los efectos de la desnutrición y tienen importancia prioritaria, sin embargo, para el entendimiento de los efectos en diversos aspectos, es imposible e inaceptable el estudio en seres humanos. Por lo anterior diversos autores han planteado el estudiar el efecto de esta enfermedad en animales que son desnutridos experimentalmente con base en una dieta deficiente en la cantidad de proteínas y/o energía o deficiente en la calidad de éstas.

Además estos estudios tienen la ventaja de poder controlar diversas variables que se presentan acompañando a la desnutrición, el ejemplo más claro de esto son las infecciones y también se puede elegir el tipo de nutriente que se disminuye ó suprime. Se han realizado estudios en diversos animales, principalmente ratón, rata, conejo, cerdo y monos.

Se ha inducido desnutrición en diferentes etapas de la vida, esto es tanto en animales adultos como en las primeras etapas de la vida (lactancia) y aún en la edad prenatal. Se ha considerado la etapa de la lactancia como un período óptimo, para estudiar desnutrición ya que es durante ésta, cuando el crecimiento se encuentra acelerado y correspondería a la etapa de la niñez temprana donde la desnutrición es prevalente.

Es claro que los resultados obtenidos con animales experimentales no son exactamente extrapolables a lo que sucede en humanos, pero tienen la validez de ser lo suficientemente representativos y se logra obtener información básica sobre la enfermedad.

4) Alteraciones causadas por la desnutrición.

4.1 Alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas.

4.1.1. Alteraciones sobre la reproducción, gestación y lactancia de crías.

Javad, en 1978 determinó en un estudio realizado en ratones, que una deficiencia de alimento del 55% durante 60 días, causa un aumento en la duración del ciclo estral, no afecta el porcentaje de ovulación, pero sí altera el porcentaje de implantación y supervivencia de las crías, disminuye por lo tanto el tamaño de la camada y aumenta la reabsorción fetal, encontró también reducción del peso al nacimiento de las crías de madres con desnutrición moderada (dieta 30% deficiente) y severa (dieta 45% deficiente).

Galler y Zartarian en 1981 estudiaron el efecto de la desnutrición a través de varias generaciones sus resultados indicaron que se da un mecanismo de adecuación para obtener un mejor rendimiento reproductivo, al determinar que las ratas desnutridas durante una sola generación tienen menos crías nacidas vivas que las ratas con desnutrición crónica durante varias generaciones o que las ratas bien nutridas; además observaron que en ratas con desnutrición crónica la ganancia de peso durante la gestación es menor, pero sin alterar a la duración de la gestación y el número de crías nacidas vivas. Por lo anterior, propusieron que se trata de una adaptación de estas características en la desnutrición crónica. En ratas desnutridas a través de varias generaciones, a un grupo se les alimentó adecuadamente desde su nacimiento hasta la época de gestación, en ellas el tiempo de gestación aumenta y la ganancia de peso es mayor. Se discutió que la ganancia de peso por sí sola durante la gestación es una medida inadecuada para evaluar el rendimiento reproductivo.

Por otro lado Fernández et al en 1985 encontraron en ratas hembras que una dieta deficiente durante el periodo de gestación, causa retraso en el crecimiento intrauterino, se encontró un punto en el cual ya no hay reservas maternas para el desarrollo o crecimiento normal de los fetos y el peso al nacimiento es significativamente menor en las crías de las madres desnutridas.

En relación al periodo de lactancia, se observó en las crías desnutridas retardo en el crecimiento y desarrollo de sus órganos. De la desnutrición prenatal o durante la lactancia se hizo una observación importante: el hecho de que el cerebro es el órgano menos afectado y por lo tanto el más protegido por el organismo.

En 1985, Young y colaboradores determinaron el efecto de varios grados de deficiencia alimenticia (75%, 50%, ó 40% de la cantidad normal del alimento), sobre la actividad reproductiva, alimentación de las crías y composición corporal de las madres y crías. Observaron que el peso al nacimiento no se altera, pero la ganancia de peso de las madres y el tamaño de la camada fueron proporcionales a la dieta consumida. Discutieron la evidencia de que sin cambios obvios en peso corporal existen cambios importantes en la composición corporal, esto es las crías de los grupos bajos en proteínas tiene un alto contenido de agua y disminución en los valores de contenido en proteínas. También se encontró una disminución en el crecimiento de las crías y en la producción de leche en las madres con dieta deficiente en proteínas.

Glore y Layman, en 1985, estudiaron el efecto de la deficiencia alimenticia en ratas durante el periodo en el cual amamantan a sus crías, y durante la gestación y lactancia en relación a la pérdida de tejidos maternos. Determinaron que la gestación no aumenta la pérdida de peso en las madres con deficiencia de alimento, mientras que la demanda durante el periodo que alimentan a sus crías causa pérdida, o aumento en el catabolismo de cantidades significativas de tejidos maternos (músculo esquelético, corazón, hígado y riñón). Consideraron también que la desnutrición en la madre puede afectar la calidad y cantidad de la leche, fue más claro el efecto sobre la cantidad de leche producida y está aún en discusión el efecto sobre la calidad de ésta.

Jansen y Hunsaker (1986), estudiaron el efecto de la cantidad de proteínas y de energía, en la dieta de ratas madres en el periodo durante el cual amamantan a sus crías, determinaron que la síntesis de proteínas en las glándulas mamarias disminuye en respuesta a una deficiencia de proteínas o energía. La síntesis de proteínas en esta etapa es de importancia para la producción tanto de la propia leche, como de proteínas estructurales y enzimas de las glándulas mamarias. Fundamentaron

que la calidad y cantidad de proteínas, así como un aporte adecuado de energía son importantes para lograr una lactancia óptima. El mecanismo mediante el cual el aumento en proteínas y/o energía en la dieta materna estimula la producción de leche no está completamente claro.

4.1.2. Alteraciones en suero.

Hoffenberg en 1975 con base en las observaciones previas de que en la DCP la concentración de albúmina, en el suero disminuye y se presenta edema si la disminución es severa, demostró que esta disminución en el contenido de albúmina no es resultado de hipermetabolismo, sino que postuló que cuando la dieta en proteínas baja hasta un nivel crítico, la cantidad de aminoácidos que llegan al hígado disminuye y la síntesis de albúmina se reduce, a pesar de ello hay transferencia a los sitios extravasculares, y al persistir esta situación, la cantidad de albúmina sintetizada es menor a la que se metaboliza y por lo tanto se presenta una disminución en la concentración de albúmina.

Holman, et al en 1981, extrajeron lípidos del suero de niños con DCP y encontraron alteraciones en el contenido de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, observaron en general una mayor proporción de ácidos grasos saturados ó monoinsaturados lo que sugirió una alteración en la actividad de saturación y un aumento en el tamaño de las cadenas.

4.1.3. Alteraciones sobre tejido óseo.

El grupo de Kuramitsu en 1985, estudió el efecto de la deficiencia de proteínas y de energía sobre el crecimiento de los huesos largos de ratas, encontraron que la ganancia en peso y longitud del fémur así como la actividad de la fosfatasa alcalina se ven reducidas durante la DCP. Al comparar una deficiencia puramente energética con otra puramente proteica, observaron que la deficiencia en proteínas causa mayores trastornos que la deficiencia en energía. Encontraron por ejemplo, que la placa de crecimiento en las epifisis es aún más delgada en la deficiencia proteica que aquella que se presenta durante la desnutrición calórica. En general, sus datos mostraron

que, en la deficiencia de calorías y proteínas, se tiene un efecto aditivo de ambas que da los resultados más drásticos como son: menor longitud y grosor de los huesos así como la presencia de una placa de crecimiento más delgada. En este estudio no encontraron diferencia en las concentraciones de calcio en los huesos, por lo que se propone que la desnutrición calórico-proteíca puede afectar el crecimiento de los huesos sin alterar la homeostasis de calcio en las ratas.

Lee, et al (1986), determinaron el efecto de una dieta baja en energía sobre el contenido de minerales, principalmente Calcio, Fósforo y Magnesio en hueso de ratas adultas. Consideraron que se requiere una dieta con un adecuado contenido de energía para mantener los valores normales en el contenido de minerales; concluyen que, una dieta deficiente en energía interfiere con la apropiada utilización y puede también causar la pérdida de estos minerales en el hueso.

4.1.4. Alteraciones en el sistema nervioso.

Salas, en 1978, encontró en ratas con deficiencia de alimento en la etapa prenatal, una reducción permanente del peso y del número de células cerebrales, así mismo encontró una disminución en el número de ramificaciones dendríticas y de axones terminales.

En 1981 Morand y colaboradores encontraron modificaciones en la composición de ácidos grasos en neuronas y oligodendrocitos, en ratas desnutridas durante el período prenatal. Señalan que la proporción de ácidos grasos monoinsaturados disminuye en ambos tipos celulares. Este aspecto se consideró de importancia ya que la composición de ácidos grasos en células cerebrales es un criterio para evaluar la maduración cerebral. Las alteraciones encontradas se mantienen hasta la edad adulta.

Sikes, et al en 1981, al estudiar la abundancia de la oligodendroglia en diferentes regiones del cerebro en ratas desnutridas durante la lactancia, encontraron que la densidad y tamaño de la oligodendroglia es normal. Consideraron que el bajo contenido de mielina observado no se debe a disminuciones en la oligodendroglia, sino que debe involucrar alteraciones en la comunicación entre neuronas y oligodendroglia que origina fallas en la capacidad de sintetizar mielina.

4.2 Alteraciones inmunológicas.

En 1980 Chandra definió que en la desnutrición la respuesta inmune celular se encuentra considerablemente dañada. Las cuentas totales de linfocitos están disminuidas, especialmente la proporción y números absolutos de linfocitos T. También se encuentran el sistema de complemento y la función fagocítica frecuentemente disminuidos. La respuesta humoral está menos afectada excepto el caso de la inmunoglobulina A. Consideró también que es muy importante la interacción entre nutrición, inmunidad e infección, esto es, con una nutrición deficiente, se altera la respuesta inmune y esto trae como consecuencia una mayor prevalencia y gravedad de las infecciones.

Sakamoto, et al en 1981(b) midieron la síntesis de novo del sistema del complemento mediante la incorporación de leucina marcada con carbono 14 en ratas desnutridas e infectadas. Observaron que dos o tres días después de infectarlas se obtiene una elevación en el complemento, a lo que llamaron la primera reacción del complemento, posteriormente de 7 a 14 días de la infección ocurre nuevamente una elevación de complemento a la que llamaron segunda reacción del complemento. La primera reacción se observó en ratas desnutridas y control fue más notoria en las primeras, mientras que la segunda respuesta del complemento se observó solamente en el grupo testigo. Los mismos autores, también en 1981(a) determinaron que si bien en las ratas desnutridas hay un aumento en los niveles de complemento, los componentes de éste se encuentran alterados, determinaron una disminución en C1, C2, C3 y C4. Plantearon la importancia del componente C3 el cual es considerado como el factor más relevante en la interacción entre la inmunidad humoral y celular.

Touraine y Gray en 1981, discutieron la importancia de las infecciones en agravar los síntomas de desnutrición, estudiaron algunos efectos de la desnutrición tipo kwashiorkor y marasmo, encontraron en ambos que las reacciones de hipersensibilidad tardía están prácticamente ausentes, también observaron disminución en linfocitos T y aumento en el porcentaje de "células nulas", la respuesta de los linfocitos para antígenos, mitógenos y células halogénicas, está disminuida, al igual que las otras funciones de los linfocitos T estudiados como son secreción de linfocinas, citotoxicidad, actividad supresora y cooperadora así como el quimiotactismo. Consideraron que todas las fracciones del complemento están afectadas excepto C4. Los autores evidenciaron que en el tipo marasmo en general hay

alteraciones más profundas. Comentan que la concentración de inmunoglobulinas puede estar dentro de los valores normales, pero que, la producción de anticuerpos y su afinidad parece estar disminuida.

En un reporte de 1986 Hoffman-Goetz y Chandra evidenciaron que la influencia de los factores nutricionales sobre la función del sistema inmune ha sido ampliamente estudiada en la década pasada, se investigó en DCP y en deficiencia de un solo nutriente. Consideraron como resultados importantes en este aspecto los siguientes:

a) Cambios ultraestructurales (acumulación de ésteres, colesterol y ausencia de vacuolas secretorias citoplásmicas) en las células epiteliales del tino de ratones severamente desnutridos. Observaron además una disminución en la síntesis de Timulina, la cual es una proteína considerada de importancia para la maduración de las células T.

b) Se ha demostrado que la poca respuesta de las células T a los mitógenos en animales desnutridos está relacionada con la disminución de Interleucina I (IL-1) y el aumento en la producción de prostaglandina E. También se encontraron alteraciones en el balance de células T supresoras y cooperadoras lo que puede relacionarse con cambios en las subpoblaciones de monocitos-macrófagos.

c) También se ha determinado que los niños con DCP tienen disminución en el número de células T4+ cooperadoras, alteraciones en la proporción de células T8+ o supresoras con T4+, bajos niveles séricos de Timulina y aumento en los leucocitos circulantes con desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt). Esta última característica sugiere una deficiencia en la diferenciación terminal de las células T debido a la desnutrición, ya que las células Tdt+ se presentan normalmente en las primeras etapas de maduración de ellas.

d) Se ha determinado el efecto de los ácidos grasos que se ingieren en la dieta en relación a la composición de la membrana de los linfocitos y a su funcionalidad. Se ha observado que la relación de ácidos grasos poliinsaturados - saturados (P/S) altera la composición de la membrana de los linfocitos. Con dietas bajas en la relación P/S se muestran cambios dependientes de la edad en las células T supresoras: Se pierde la capacidad T supresora para formación de anticuerpos y aumenta la capacidad supresora para la hipersensibilidad por contacto.

Por último comentaron que el tipo de proteínas de la dieta puede regular la respuesta inmune, por ejemplo la lactoalbúmina aumenta la respuesta inmune humoral significativamente en respuesta a un antígeno T independiente. Se propone que la lactoalbúmina no aumenta la producción de células B en la médula ósea, sino que están relacionados tejidos linfoides secundarios.

4.3. Alteraciones en la conducta, desarrollo mental y aprendizaje.

Al solucionarse el problema de la alta mortalidad en los niños desnutridos surgió como un problema muy importante el analizar las posibles consecuencias que puede traer el haber sufrido al menos un episodio de DCP, en la conducta, el desarrollo mental, el lenguaje y el aprendizaje del niño.

Cravioto y Robles en 1963 y 1965 realizaron los primeros estudios sistemáticos acerca del desarrollo mental validado por medio de la escala de Gesell en los niños desnutridos, observaron que los coeficientes de desarrollo eran bajos sobre todo en niños menores de 6 meses, y que durante la recuperación nutricional no mostraban tendencia a mejorar como sucedía con los niños mayores. Se inició una corriente de profundo interés en la búsqueda de la relación entre factores ambientales y desarrollo del sistema nervioso central. Así Cravioto et al., en 1966, demostraron un alto nivel de asociación entre el riesgo de haber padecido desnutrición en la infancia y el desarrollo intersensorial retardado. Se señaló que el desarrollo de las interrelaciones visual-cinestésica y auditivo-visual son fundamentales como requisito previo para el aprendizaje de la escritura y la lectura.

Cravioto en 1978, demostró que las fallas en el aprendizaje adecuado de la lectura y escritura están primariamente asociados a la desnutrición y a la privación de estímulos en la infancia temprana. En relación a las actividades motoras Cravioto en 1980, encontró que las habilidades motoras en el escolar se encuentran disminuidas en relación con antecedentes de desnutrición.

Uno de los aspectos más importantes estudiados en desnutrición fue la identificación que hizo Cravioto en 1975 de los factores microambientales presentes mucho tiempo antes de la

aparición de desnutrición severa, los cuales son: una deficiente o nula estimulación en el hogar y una inadecuada interacción madre-hijo, estos factores determinan que los niños con desnutrición leve (de primero o segundo grado) se agraven y lleguen a ser desnutridos de tercer grado. El análisis de estos factores permite predecir familias de alto riesgo en las cuales el microambiente familiar es monotónico y la actitud materna en estos casos tiene como características principales: poca sensibilidad a las señales del niño, falta de interés hacia su conducta, retardo para cubrir las necesidades del niño y distorsión de las relaciones emocionales.

Ha sido muy importante el determinar los beneficios de la estimulación sistematizada añadida al tratamiento médico dietético para lograr una recuperación adecuada de la desnutrición y disminuir las secuelas de la misma, así Cravioto y Arrieta en 1979, observaron que en lactantes menores de 6 meses con desnutrición severa, la estimulación sistematizada aunada al tratamiento es capaz de hacer que 7 de cada 10 niños se recuperen del déficit mental mientras que en niños no estimulados con grado similar de intensidad y duración de desnutrición solamente recuperan el déficit 3 de cada 10 niños.

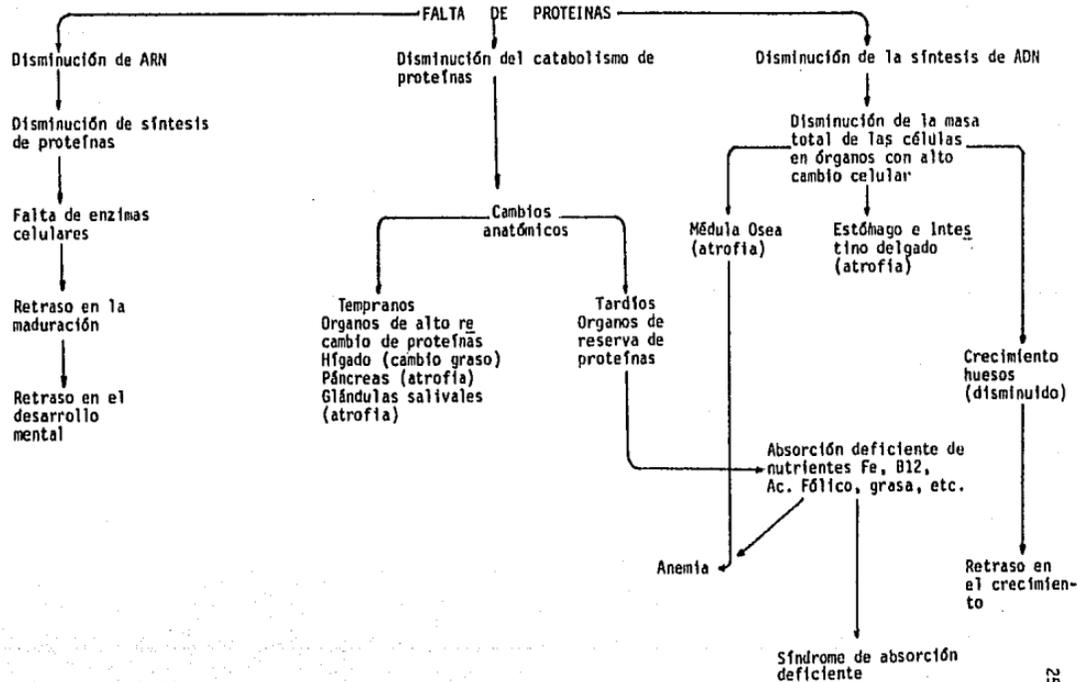
En animales desnutridos experimentalmente, Castilla et al, en 1979, determinaron el contenido de ADN, ARN y proteínas en corteza cerebral, hemisferios cerebrales y cerebelo en ratas desnutridas-aisladas, desnutridas-estimuladas y en desnutridas-control, sus resultados mostraron que la estimulación es capaz de disminuir los efectos causados por la desnutrición y que en el grupo con desnutrición y aislamiento ambiental se producen las alteraciones bioquímicas más graves.

4.4. Alteraciones a nivel celular.

Ramalingaswami y Deo en 1968 al inducir desnutrición únicamente por falta de proteínas, en monos rahesus jóvenes, lograron asemejar la DCP tipo Kwashiorkor, y encontraron gran similitud entre su modelo experimental y la desnutrición en humanos. Definieron las reacciones básicas ante la falta de proteínas a nivel celular (Figura 2). Consideraron que todas las células de todos los órganos están afectadas pero no se afectan en el mismo tiempo ni con la misma severidad, consideran que los órganos con

FIGURA 2

REACCIONES CELULARES POR DEFICIENCIA DE PROTEINA



alto recambio de proteínas son los que se ven principalmente afectados. Definieron que una prolongación en el ciclo celular medido por autorradiografía con timidina tritiada es una característica de deficiencia de proteínas.

Deo et al en 1967 estudiaron la regeneración celular en ratas de la cepa Wistar adultas parcialmente hepatectomizadas en un grupo control (16% caseína) y un grupo con dieta baja en proteínas (1% caseína). Encontraron en el grupo desnutrido un alto índice de marcaje por incorporación de timidina tritiada lo consideraron como una evidencia del alargamiento de la fase de síntesis del ADN, que ocasiona que un mayor número de células se marquen. También observaron un aumento en el índice mitótico lo que fue considerado como evidencia en el alargamiento de la fase de división. Al comparar el índice de marcaje entre el control y los desnutridos entre 24 y 28 horas después de la hepatectomía, se observó que en el grupo deficiente de proteínas no había cambio durante el tiempo, lo cual indica una proliferación celular pobre.

Deo y Ramalingaswami en 1970 hicieron algunas consideraciones acerca del control de la proliferación en mamíferos, donde un gran número de células se producen y mueren cada día. En ellos, el nacimiento, diferenciación y muerte están balanceados para mantener un estado de equilibrio. Hay sistemas de continuo recambio celular como la mucosa del intestino delgado y sistemas donde el recambio celular está condicionado como es el hígado que tiene una baja velocidad de proliferación y un tiempo de vida largo. En ambos sistemas se detectó una disminución en la proliferación. Además consideraron la disminución en la proliferación como una alteración básica en respuesta a la deficiencia de proteínas, el mecanismo no es claro, pero consideran de importancia la disminución del flujo de aminoácidos, contenido de ARN y proteínas como los factores principalmente relacionados con las alteraciones en el ciclo celular.

Winick y Noble estudiaron en 1966 el efecto de la desnutrición sobre el peso total del animal, peso de algunos órganos como: cerebro, timo y bazo, contenido de ADN, ARN y proteínas. Desnutrieron las ratas en tres diferentes etapas:

- a) del nacimiento a los 21 días.
- b) de 21 a 42 días.
- c) de 65 a 86 días.

Determinaron que la desnutrición, del nacimiento a los 21 días, disminuye el peso, contenido de proteínas, de ADN y ARN señalan una reducción en el número de células sin alterarse el tamaño celular. En la desnutrición de 21 a 42 días encontraron disminución proporcional en peso, contenido de proteínas, de ADN y ARN en todos los órganos excepto cerebro y pulmón donde el contenido de ADN no se afecta pero sí el peso y el contenido de proteínas y ARN. En la desnutrición de 65 a 86 días determinaron que se mantienen los valores de ADN en todos los órganos excepto en bazo y timo, mientras que se reducen los valores de peso, proteínas y ARN. Al mantenerse el contenido de ADN y disminuir los demás valores, sugirieron una reducción en el tamaño celular con mantenimiento del mismo número de células.

Por otro lado, los autores determinaron qué sucede después de una recuperación nutricional en los tres periodos de estudio. Después del proceso de desnutrición se dejaron los animales en recuperación hasta los 133 días para ver si retornaban a los valores normales. Observaron que en el grupo con desnutrición del nacimiento a los 21 días no recuperan el crecimiento normal. De la desnutrición de 21 a 42 días sólo se recuperan los dos órganos en los que no se alteró el contenido de ADN (cerebro y pulmón). De la desnutrición de 65 a 86 días se recuperan todos los órganos excepto el timo.

Concluyeron que la recuperación se da sólo cuando se afecta el tamaño de las células y no el número de estas por lo tanto es más grave la desnutrición en las primeras etapas de la vida.

Deo *et al* en 1975 consideraron cuatro procesos básicos en el crecimiento y desarrollo de los tejidos: a) Formación de células, b) Migración, c) Diferenciación y d) Muerte celular. Normalmente se mantiene un balance entre estos procesos. Propusieron que en la DCP se altera la proliferación celular, encontraron la migración también disminuida. En el caso de la diferenciación celular ésta parece no estar afectada y la muerte celular se encuentra disminuida; al parecer esto último representa un mecanismo compensatorio para balancear la disminución en la formación de nuevas células.

Murthy, *et al*, en 1982, determinaron la cinética de proliferación *in vitro* en linfocitos de niños con desnutrición tipo Kwashiorkor, mediante la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas, en sus resultados se observó un menor porcentaje de células que han pasado por dos ciclos y una

disminución en el número de células que han pasado por tres ciclos de duplicación o más en los cultivos de desnutridos. De sus resultados concluyeron que la duración del ciclo en los linfocitos de niños desnutridos es mayor y proponen que puede estar alterada la respuesta al mitógeno (Fitoheماغلوتينina ,PHA) en la desnutrición.

González-Torres et al en 1983, también en linfocitos humanos, observaron que las curvas de distribución de metafases de primero, segundo y tercer ciclo de duplicación son similares en los niños desnutridos y los eutróficos. Una observación interesante en este trabajo es que a 48 horas de cultivo la proporción de metafases en segundo ciclo fue mayor en los niños desnutridos. Para explicar estos resultados, propusieron que los linfocitos podrían venir previamente estimulados en el torrente sanguíneo o que responden con mayor rapidez a la PHA.

Bansal-Rajbanshi y Mathur en 1985 determinaron mediante autorradiografía la duración total del ciclo y de cada una de sus fases en células germinales de espermatogonias y células de soporte o futuras células de Sertoli en ratas desnutridas durante la lactancia. Encontraron un marcado aumento en la duración de la fase S sin alterarse la fase G2 y el tiempo total de ciclo, observaron un acortamiento de la fase G1. Señalaron que en trabajos previos y en este mismo trabajo se ha encontrado consistentemente un aumento en duración de la fase de síntesis de ADN, lo cual puede representar una adaptación para compensar la baja velocidad de síntesis de esta molécula.

4.5. Alteraciones a Nivel Citogenético

Armendares et al, en 1971 encontraron una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de niños desnutridos, Betancourt et al, en 1972 también encontraron un mayor número de aberraciones cromosómicas en niños desnutridos.

Por otro lado Thorburn et al en 1972, Khouri y McLaren en 1973, y Upadhyaya et al en 1975, al estudiar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en niños desnutridos no encontraron diferencia significativa en relación con sus testigos.

Se propuso que la alta frecuencia de aberraciones cromosómicas en los niños se podría deber, a una mayor susceptibilidad a diversos agentes; para probar lo anterior Betancourt et al en 1974, estudiaron el efecto de varias dosis de Rayos X sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de niños desnutridos y niños testigo, encontraron una frecuencia de aberraciones similar entre los niños desnutridos y testigos en todas las dosis de radiación probadas. Sus resultados mostraron que la desnutrición no está necesariamente acompañada por un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y que no se tiene una mayor sensibilidad a la radiación ionizante en los desnutridos, medida por aumento en la frecuencia de aberraciones.

Se han realizado también estudios sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas en animales desnutridos experimentalmente, así en médula ósea de ratas desnutridas durante el periodo prenatal y de lactancia. Sadasivan y Raghuram en 1973 encontraron un porcentaje de aberraciones significativamente mayor al encontrado en ratas testigo, el tipo de aberraciones que encontraron fueron pérdidas y rupturas cromosómicas.

Vijayalaxmi en 1975, encontró en la médula ósea de ratas desnutridas durante ocho semanas a partir de los 21 días, una frecuencia de aberraciones cromosómicas significativamente mayor a la encontrada en ratas alimentadas con una dieta alta en proteínas.

Betancourt et al en 1979, determinaron el porcentaje de aberraciones cromosómicas en ratas desnutridas a partir del destete, un grupo con una dieta de proteínas deficientes en metionina y triptofano a base de maíz, consumida ad libitum y otro grupo al que se le redujo la cantidad de consumo de la dieta a la mitad. Las aberraciones encontradas fueron rompimientos cromatídicos y algunos cromosómicos, no encontraron diferencia significativa entre el porcentaje de aberraciones entre las ratas desnutridas y las ratas control. Con base en sus resultados, los autores concluyeron que las aberraciones cromosómicas no se deben a deficiencias en triptofano y metionina y que tampoco se puede afirmar que la desnutrición severa sea básicamente un factor causal per se del aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

El estudio de la frecuencia de ICH, se ha considerado un método más sensible para detectar daño al material genético.

Se ha estudiado la frecuencia de ICH en linfocitos de niños desnutridos, Mutchinick et al en 1979 no encontraron diferencia entre los desnutridos y testigos.

Por otro lado Murthy et al en 1980 si observaron una frecuencia de ICH significativamente mayor en los linfocitos de los niños desnutridos.

Murthy y Srikantia en 1981, observaron una mayor frecuencia de ICH en ratones desnutridos después del período del destete.

4.6. Alteraciones a nivel molecular.

Avitabile et al en 1981, midieron la síntesis de ARN mediante la incorporación de uridina tritiada en diferentes regiones del cerebro, en ratas de los 5 a los 30 días de edad, las cuales fueron desnutridas experimentalmente desde el décimo día de la gestación y hasta terminar el período de lactancia. Determinaron que en las ratas desnutridas se altera la síntesis de ARN, esta es más evidente del quinto al décimoquinto día y es el cerebelo la región principalmente afectada. Esto último se relaciona con la característica del cerebelo de tener gran actividad de proliferación y diferenciación celular durante la maduración post natal. Se concluyó que existe un período vulnerable en el desarrollo del cerebro, el cual en el caso de las ratas, comprende las primeras tres semanas después del nacimiento. Se reafirmó la idea de que la desnutrición causa un retraso en los eventos moleculares que ocurren durante la proliferación y la diferenciación celular en el desarrollo del cerebro de ratas.

Serra et al en 1982 determinaron el efecto de la desnutrición a partir del décimo día de gestación y durante el período de lactancia sobre dos enzimas importantes en la síntesis de ADN que son las ADN polimerasas y timidina quinasa, encontraron que su actividad está disminuida al quinto día después del nacimiento en 3 regiones: Cerebro, hemisferios cerebrales y cerebelo. Además notaron que en el cerebelo las dos enzimas tienen un aumento a los 9 días en el grupo testigo y se retarda hasta los 13 días en el grupo desnutrido, posteriormente la actividad disminuye en ambos grupos, la disminución es menor en los desnutridos, y se obtienen valores similares de la actividad enzimática en ambos grupos alrededor de los 30 días.

Vanella et al en 1983, estudiaron la actividad de las enzimas involucradas en la vía de salvamento de purinas. Las enzimas determinadas fueron la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRTasa) y la adenina fosforribosiltransferasa (APRTasa), observaron que a los 5 días después del nacimiento ambas actividades enzimáticas estaban disminuidas en todas las regiones del cerebro en las ratas desnutridas. Y a los 30 días encontraron valores similares entre el grupo testigo y el grupo desnutrido, concluyen que la desnutrición durante la gestación y los primeros días de la vida, altera la actividad de estas enzimas.

En relación a los mecanismos de reparación, Murthy y Bhaskaram en 1981, encontraron en linfocitos de niños desnutridos un aumento en la reparación post-duplicación inducida por luz ultravioleta. Observaron al estudiar este mecanismo, que es visualizado como una síntesis de ADN que se lleva a cabo fuera del período S (UDS), un aumento de ella en los linfocitos de niños desnutridos, proponen que esto puede deberse a que son más sensibles al daño o que son más eficientes en este tipo de reparación.

Se han realizado estudios sobre la relación entre la estructura de la cromatina y la dieta ingerida, así Castro et al en 1986 observaron que una dieta rica en carbohidratos, pero sin grasa, aumenta la sensibilidad de la cromatina a la nucleasa micrococcal y disminuye la longitud del nucleosoma, por el contrario una dieta deficiente en proteínas, magnesio o zinc, disminuye la sensibilidad de la cromatina a la nucleasa micrococcal. Los mecanismos por los cuales la dieta afecta la estructura de la cromatina, todavía no son claros.

Castro y Towle en 1986, propusieron que la disminución de la sensibilidad de la cromatina a las nucleasas, se puede relacionar con los cambios en la composición de la histona H1 y también se ha encontrado que una disminución de metionina y cisteína, altera marcadamente la metilación de la guanina. El determinar las alteraciones de la estructura de la cromatina en relación a la deficiencia de nutrientes resulta de gran importancia ya que la expresión, regulación, duplicación y reparación son procesos que requieren cambios estructurales muy precisos en la estructura de la cromatina dentro del núcleo.

B) INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS (ICH)

1) Definición y Detección

Los ICH son eventos que involucran ruptura, intercambio y reparación entre moléculas de ADN en localización coincidente, el intercambio se da entre moléculas de ADN en loci homólogos en cromosomas que se están duplicando.

La primera evidencia directa de que ocurren los ICH fue reportada por Taylor en 1958 quien observó que células de raíz de Vicia faba marcadas con timidina tritiada en la primera de dos divisiones subsecuentes, para evidenciar si la duplicación era semiconservativa y si había una sola cadena de ADN por cromátida, mostraban en la segunda metafase una cromátida marcada y otra sin marcar y que, con cierta frecuencia intercambiaban segmentos de cromátida marcada con segmentos no marcados de la cromátida hermana.

A partir de los años setentas ha sido posible determinar los ICH mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas, la cual se logra por incorporación de la 5 bromo-desoxiuridina (BrdU) que es un análogo de la timina y se incorpora fácilmente a las cadenas de ADN en formación.

Zakharov y Egolina en 1972, observaron que cuando se trataban células de hamster chino con BrdU por dos ciclos de duplicación y posteriormente se tienen los cromosomas con Giemsa, las dos cromátidas hermanas se condensaban diferencialmente. Después de dos ciclos de duplicación una de las cromátidas hermanas está substituida en forma sencilla en donde sólo una cadena polinucleotídica del ADN ha incorporado BrdU y la otra cromátida se encuentra doblemente substituida, ambas cadenas polinucleotídicas han incorporado BrdU. Notaron que la cromátida doblemente substituida es más larga, por lo cual propusieron que la síntesis de proteínas involucradas en la condensación y espiralización de los cromosomas se altera por la substitución de la BrdU en lugar de la timina y probablemente ésta sea la causa de la tinción diferencial. Se observó posteriormente que la cromátida doblemente substituida tiene claro y la monosubstituida tiene oscuro, de esta forma se hace posible la visualización de los ICH.

Latt en 1973; obtuvo una buena tinción diferencial en linfocitos humanos cultivados durante 70 horas en presencia de BrdU y teñidos posteriormente con el colorante fluorescente Hoechst. Determinó que dicho colorante es un indicador de la incorporación de BrdU al ADN, ya que este fluorocromo es mucho menos eficiente en las cromátidas doblemente substituidas, por lo tanto se pueden diferenciar ambas y detectar los ICH.

Perry y Wolff en 1974; Korenberg y Freedlander en el mismo año y Goto et al en 1975; describieron técnicas que usan la tinción con Hoechst y posteriormente Giemsa, estas implican para obtener una buena diferenciación, el tratamiento de las preparaciones antes de la tinción con Giemsa ya sea la incubación a 55° C ó 60° C en solución amortiguadora a pH elevado o bien la exposición a la luz. Estas técnicas de tinción con fluorescencia más Giemsa tienen la ventaja de que se obtienen preparaciones permanentes para su análisis. Chen y Lin en 1985, analizaron las diversas fuentes de luz utilizadas para obtener tinción diferencial, con base en sus resultados propusieron que la luz negra fluorescente y la lámpara incandescente son las más indicadas para una buena tinción diferencial.

Estas metodologías han permitido una buena tinción diferencial de las cromátidas hermanas, se logra una detección inequívoca de los ICH en segmentos tan pequeños como lo permite la resolución del microscopio de luz.

En general el estudio de los ICH se realiza en metafases que han pasado por dos ciclos de duplicación, esto tiene la desventaja de que se miden en realidad los intercambios producidos en el primer ciclo de duplicación más los del segundo ciclo, por lo anterior Schwartzman y Goyanes en 1980 reportaron una técnica que implica la duplicación celular en presencia de diferentes concentraciones de BrdU en tres ciclos consecutivos de duplicación, mediante la cual se pueden determinar los ICH correspondientes al primero, segundo y tercer ciclo.

Se han desarrollado diferentes sistemas para la obtención de tinción diferencial, Latt en 1973, Perry y Evans en 1975, Stetka y Wolff en 1976, realizaron estudios de la frecuencia de ICH in vitro. En los estudios in vivo la incorporación continua de BrdU ha representado un problema, ya que la BrdU es metabolizada. Para resolver esto se han diseñado diversas metodologías: Tice et al en 1976 propusieron infusión intravenosa continua; Allen y Latt en 1976 propusieron inyecciones intraperitoneales

múltiples; Pera y Mattias en 1976 propusieron infusión subcutánea durante 6 horas; Morales-Ramírez en 1980 propuso una sola inyección intraperitoneal de BrdU adsorbida a carbón activado; King et al en 1982 propusieron la implantación subcutánea de tabletas de BrdU cubiertas con agar; y McFee et al en 1983 emplearon tabletas de BrdU cubiertas con parafina.

Después de su detección Latt et al en 1984 definieron que tres áreas de estudio han recibido gran atención:

- 1) El estudio de el o los mecanismos por los cuales las tinciones basadas en la incorporación de BrdU, provoca la tinción diferencial de cromátidas.
- 2) El estudio de la relación de los ICH con mutágenos y carcinógenos.
- 3) El estudio del mecanismo de formación de los ICH

Alrededor de estas tres áreas se ha generado gran cantidad de información, pero en la actualidad quedan en estos tres campos de estudio de los ICH varias interrogantes que requieren estudio para su confirmación.

2) Significado Biológico

El significado biológico de los ICH se encuentra actualmente en discusión, sin embargo son muchos los estudios que se han realizado para determinarlo.

En general se acepta que es durante la duplicación del ADN el momento en el cual se forman los ICH, ya que en éste momento las cadenas de ADN homólogas se encuentran lo suficientemente unidas, para lograr ruptura en ambas cromátidas en localización coincidente en una forma equivalente y simétrica.

Wolff et al en 1974, demostraron que para la formación de ICH se requiere el paso por la fase de síntesis del ADN (S). Kato en 1980, obtuvo evidencias de que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la bifurcación en la síntesis, el momento en el cual se forman los ICH. Contrariamente, Anderson en 1983 propuso que durante la etapa G2 es cuando se forman, esta observación resulta interesante para evaluar el significado y mecanismo de formación de los ICH

Tice et al en 1976 y Kato en 1977 propusieron que los ICH pueden representar más de un fenómeno, esto es, que un tipo de ellos puede estar íntimamente relacionado con la duplicación del ADN y un segundo tipo está relacionado con la reparación del ADN. El primer tipo explicaría el aumento en la frecuencia observado por Tice et al en 1978 e Ishii y Bender en 1980 al añadir inhibidores de la síntesis de ADN a cultivos celulares y el segundo tipo explicaría las observaciones de Schneider y Gilman en 1979 en la disminución de la frecuencia de ICH inducidas por mutágenos en ancianos, en donde el envejecimiento celular ocasiona disminución en la eficiencia de reparación del ADN.

3) Mecanismos propuestos sobre la formación de ICH

Parecen producirse espontáneamente, McClintock en 1938, observó que los cromosomas en anillo de células de maíz, formaban eventualmente anillos dicéntricos del doble del tamaño inicial, esta fue la primera evidencia indirecta de la formación de ICH que se producen espontáneamente sin que sean tratadas las células con algún agente extraño. Al detectar los ICH con el uso de la BrdU se ha discutido que ella por sí misma es capaz de inducirlos y tener por lo tanto inferencia en la frecuencia basal observada. Mazrimas y Stetka en 1978, obtuvieron evidencias directas de que la BrdU que se incorpora al ADN es la causa de algunos de los ICH considerados como espontáneos. Por otro lado Tice et al en 1976 observaron in vivo y Kato en 1974 observó in vitro que la frecuencia basal permanece constante cuando la dosis de BrdU empleada es baja. La frecuencia basal o espontánea ha sido estudiada in vitro e in vivo. Kram et al en 1979, observaron que ésta frecuencia es consistentemente menor en los estudios realizados in vivo. Takehisa en 1982 determinó esta frecuencia alrededor de 3 y 5 ICH/célula en diversos tejidos de rata y de ratón. Morales-Ramírez et al en 1984 (b) encontraron un valor basal de 1.7 ICH/célula en espermatogonias y 3.5 en médula ósea. Estos son los valores basales obtenidos después de dos ciclos de duplicación en presencia de BrdU.

Schwartzman y Goyanes en 1980, mediante la técnica de tinción diferencial en tres tonos, observaron que la frecuencia basal de ICH se incrementa en las tres divisiones sucesivas, a medida que se da mayor incorporación de BrdU al ADN, de sus datos se concluyó que la BrdU incorporada influye en la frecuencia

basal de ICH. Morales-Ramírez et al (1987), y Suzuki y Yoshida en 1983 obtuvieron datos que apoyan la inducción de ellos por la incorporación de BrdU en las cadenas parentales del ADN. Davidson et al en 1980 determinaron que la BrdU que no se incorpora al ADN, puede también tener un papel importante, ya que altera las pozas metabólicas de nucleótidos.

Además de los ICH que se producen espontáneamente y los producidos por la incorporación en presencia de la BrdU, se han determinado una gran variedad de agentes que son capaces de inducirlos, entre ellos se pueden mencionar según Latt en 1981 los siguientes:

1) Agentes alquilantes - Los agentes químicos capaces de alquilar el ADN son los inductores más efectivos y estudiados de ICH, todos estos agentes pueden formar monoadductos es decir huecos en una sola hebra del ADN y entrecruzamientos.

2) Radiación electromagnética - La radiación de alta energía como los Rayos X y Gamma, no son inductores efectivos de ICH, los resultados positivos dependen del protocolo empleado. La radiación UV es un buen inductor, se ha demostrado que los dímeros de pirimidina formados por ella son los responsables de la mayoría de los ICH inducidos.

3) Virus - La integración de virus en el genoma puede alterar las frecuencias de ICH, los cuales se incrementan en estos casos.

4) BrdU - La bromodesoxiuridina es un agente capaz de inducir ICH por más de un mecanismo. La inducción involucra dos fases, una es en relación a la sustitución de BrdU en el ADN y la otra en relación al aumento de BrdU en el medio en niveles de saturación de sustitución.

5) Agentes diversos - Entre los agentes que aumentan ligeramente la frecuencia de ICH se encuentran: ultrasonido, bleomicina, colorantes, cafeína, dietilestilbestrol, nicotinamida y en algunos casos promotores de tumores. Además Ishii y Bender en 1980 determinaron que la inhibición de la síntesis del ADN y enzimas involucradas aumentan la frecuencia de ICH. Oikawa et al en 1980, demostraron un incremento en la frecuencia de ICH al inhibir enzimas involucradas en la reparación y también Perry y Evans en 1975 determinaron que gran variedad de agentes capaces de dañar al ADN inducen la formación de ICH, la dosis necesaria

para detectar efectos significativos es mucho menor a la usada para detectar un aumento en aberraciones cromosómicas, además de ser la detección de ICH más fácil y segura. Schwarts et al en 1982 determinaron que agentes inductores de cáncer no involucrados en la producción de lesiones sobre el ADN, también son capaces de inducirlos. Carrano y Thompson en 1982 observaron que al exponer células de ovario de hamster chino a nueve diferentes agentes químicos y físicos, se obtiene un incremento lineal entre la frecuencia de ICH y una mutación única en un gene, esto último no ha sido observado consistentemente.

Se han propuesto varios modelos para explicar la formación de ICH, entre ellos están los siguientes:

-Kato en 1977, propuso un mecanismo basado en el modelo de recombinación bacteriana de Holliday en el cual se contemplan:

- a) rupturas al mismo nivel generadas por reparación o duplicación
- b) formación de la estructura de Holliday, en la que es posible intercambio de doble banda y
- c) ruptura de las bandas no involucradas con el daño.

-Painter en 1980, propuso un modelo que implica:

- a) daño al ADN que retarda la duplicación
- b) los duplicones terminan la síntesis a diferente tiempo a nivel de los agrupamientos que separan unidades de duplicación subsecuentes y permite
- c) la ruptura en la continuidad de la banda parental a nivel de agrupamientos de duplicones
- d) cuando un duplicón retardado termina de duplicarse se da una asociación aleatoria entre bandas parentales e hijas, con base en estas reasociaciones se produce el intercambio de doble banda.

-Ishii y Bender en 1980, propusieron otro modelo en el cual se contempla:

Para explicar los ICH espontáneos:

- a) ruptura de las bandas parentales a nivel de la bifurcación del ADN durante la síntesis.
- b) reasociación con la banda hija recién sintetizada y de la misma polaridad.

Para explicar los ICH inducidos:

- a) Un daño causa la ruptura de una de las bandas parentales, a nivel de la bifurcación del ADN durante su síntesis.
- b) Esta se reasocia con la banda hija recién sintetizada y de la misma polaridad
- c) Posteriormente puede ocurrir ruptura de la banda parental no dañada cerca del extremo terminal de la banda hija complementaria a la banda parental dañada y continuarse con ella, y se complementa con la banda que tenía el daño.

En este modelo se propone un cambio de vía o "desviación duplicativa" que permite llenar el espacio opuesto al daño, un aspecto muy interesante de este modelo es que se propuso un significado biológico a los ICH, que es el de permitir que se continúe la síntesis de ADN a pesar de la presencia de lesiones.

4) Los ICH como indicadores de daño.

4.1 Por agentes químicos y físicos.

Latt et al en 1981, expusieron las consideraciones hechas por el grupo de estudio sobre ICH del programa GENE-TOX de los Estados Unidos de América.

En relación a las ventajas del uso del análisis de ICH como método de detección de mutágenos se considera que:

- a) Es excelente para detectar agentes que producen aductos en el ADN
- b) Es mucho más sensible para detectar mutágenos químicos (aunque no para todos los agentes) que el análisis de aberraciones cromosómicas.
- c) Es un método relativamente rápido y existen pocos falsos positivos.
- d) Hay métodos tanto in vivo como in vitro para detectar mutágenos directos o indirectos, es decir que requieran o no activación metabólica.
- e) Los sistemas in vivo permiten el análisis en diversos tejidos que incluyen células germinales.
- f) Se puede estudiar en diversos organismos que incluyen plantas y animales, los cuales pueden usarse como indicadores ambientales de agentes genotóxicos.
- g) Se puede estudiar en poblaciones humanas.
- h) El método tiene gran reproducibilidad, de tal forma que en los estudios in vitro basta el análisis de 25 células por dosis y en los sistemas de estudio in vivo se recomienda un mínimo de 3 organismos, 25 células de cada uno de ellos y tres dosis diferentes.

En cuanto a las principales desventajas se encuentran:

- a) Poco sensible para mutágenos que inducen rupturas dobles.
- b) Desconocimiento de su significado biológico.
- c) Desconocimiento de la correlación de ICH con el número de lesiones.
- d) El efecto aditivo o sinérgico que puede tener la BrdU con el mutágeno.

Se ha determinado que los agentes "S" dependientes, esto es, que requieren que la célula pase por la fase de síntesis de ADN para que su efecto se exprese, son los más efectivos para inducir ICH. En cuanto a la inducción de ICH por mutágenos y carcinógenos químicos los resultados son claros como lo mencionó Morimoto en 1984; no así en el caso de agentes físicos, por ejemplo, en relación a la inducción de ICH por radiación ionizante, se han encontrado resultados contradictorios. Littlefield et al en 1979, consideraron que la inducción de ICH por radiaciones, se debe a la sensibilización producida por la incorporación de BrdU al ADN y Morales-Ramírez et al en 1984 (a), obtuvieron datos que apoyan la inducción de ICH debida únicamente a las radiaciones. También se ha observado inducción por una gran variedad de agentes que dañan al ADN, que interfieren con su duplicación y la síntesis de proteínas. En la actualidad continúa el problema de determinar el tipo de daño involucrado en la producción de ICH, pero dada la variedad de agentes capaces de inducirlos, se puede pensar que las lesiones son de diversa índole, también varios agentes pueden tener un mecanismo común.

4.2 En padecimientos genéticos.

Se han estudiado las frecuencias basales y la sensibilidad a la inducción de ICH por diferentes agentes en diversas enfermedades hereditarias en humanos. El caso más interesante es el del Síndrome de Bloom (SB) en relación a él, Changati et al en 1974 observaron un marcado aumento en la frecuencia basal de ICH y consideran que sus valores característicos pueden usarse para el diagnóstico de la enfermedad. En relación al mecanismo por el cual se observa esta alta frecuencia en este síndrome, continúa en discusión: por un lado Tice et al en 1978, reportaron que el cocultivo de fibroblastos normales y fibroblastos de pacientes con SB, produce un aumento en la frecuencia de ICH en las células normales, proponen que estas células segregan algún "factor" inductor. Pero por otro lado Bryant et al en 1979 al fusionar células de individuos normales con células de pacientes con SB, obtuvieron frecuencias normales en los dos tipos celulares, proponen por lo anterior que existe alguna enzima o "factor" que no es sintetizado por las células de los pacientes con SB y esto trae por consecuencia la producción de múltiples ICH.

Otra enfermedad que ha sido estudiada es el Xeroderma pigmentosum, en este caso Wolff et al en 1975 reportaron que las frecuencias basales de ICH son similares a las encontradas en células normales, pero en el caso de las frecuencias inducidas Wolff en 1977, encontró que son más sensibles a la inducción de ICH por mutágenos químicos, lo anterior se explica por su deficiencia en la reparación por escisión.

C) PROLIFERACION CELULAR.

1) Definición del Ciclo Celular.

La capacidad de reproducirse es fundamental para la existencia, propagación y continuación de las células y es considerada como una de las características funcionales principales de las células vivas.

Mitchison en 1971, definió al ciclo celular como el período comprendido entre la formación de la célula por división de su célula madre y el tiempo cuando ella misma se divide y da origen a dos células hijas. El ciclo celular comprende esencialmente dos periodos: la interfase y la división, en general la mayor parte del ciclo corresponde a la interfase. La observación de que las células duplican su ADN durante un cierto intervalo de la interfase, llevó a dividir el ciclo en diferentes etapas, que fueron definidas por Howard y Pelc en 1953 de la siguiente manera: Fase G₁, es el período comprendido entre la mitosis y el inicio de S. Fase S, o de síntesis del ADN y fase G₂, es el período comprendido entre el final de S y el inicio de D. Fase D o de división, que puede ser una mitosis o meiosis. Los estudios posteriores han llevado a la caracterización de otra fase del ciclo celular denominada G₀.

En los organismos multicelulares los diversos tipos de células se dividen a muy diferentes velocidades. La principal diferencia entre las células que se dividen rápidamente y aquellas que lo hacen lentamente está dada por la duración o tiempo que permanecen las células en la fase G₁ del ciclo celular. Algunas células permanecen en G₁ durante días o incluso años. Por otro lado el tiempo del ciclo a partir del inicio de la fase S hasta la mitosis es muy constante independientemente de la velocidad de división de la célula.

2) Características de las fases del ciclo.

Durante la interfase la célula debe duplicar además de su ADN todos los componentes celulares y su masa. A diferencia del ADN, la gran mayoría de los diferentes tipos de proteínas y ARN son sintetizados continuamente durante toda la interfase, así de los más de mil tipos de proteínas detectados sólo unos pocos son sintetizados en un punto específico del ciclo.

La mayoría de las poblaciones celulares están constituidas por dos clases de células, las que se dividen es decir proliferan y las que no se dividen, estas últimas pueden a su vez ser de dos tipos: las que están en G₀ y son capaces de entrar al ciclo nuevamente por medio de un estímulo adecuado y las células diferenciadas terminalmente, que nunca se dividirán.

De acuerdo a Michitson (1971), Prescott (1976), Pardee (1978) y Baserga (1985) se consideran a continuación algunas características de mayor relevancia de las fases del ciclo:

Fase G₀ - El estado G₀ se define como una fase denominada quiescente o durmiente. El tiempo requerido para iniciar S cuando son estimuladas es más largo al requerido por las células que estaban en G₁. La mayoría de las células transformadas, particularmente las transformadas por virus no pueden entrar en esta fase.

A diferencia de las células que se encuentran en G₁, las células que están en G₀ tienen las siguientes características:

Sintetizan algunas variantes de histonas

El complemento de los ribosomas y el contenido de ARN es diferente

La proteína p53 se requiere para la salida de G₀.

Además Sans et al en 1980, observaron que el grado de condensación de la cromatina es mayor en esta etapa y en este caso se propuso también la existencia de un período G₀2.

Se ha concluido que el estado G₀ es fisiológicamente distinto del estado G₁ y que los genes que controlan el paso G₀ - G₁ pueden ser la clave en el control de la proliferación celular.

Fase G₁ - Esta etapa es la de mayor variabilidad en cuanto a duración. Se ha considerado en general que el control de la proliferación celular se encuentra en G₁. Durante ella se inicia el crecimiento de la célula, representado por aumento en tamaño celular, en el tamaño del núcleo, del número de ribosomas y síntesis o acumulación de ARN ribosomal. Además durante este período la síntesis de los diferentes tipos de ARN se incrementa y los niveles de los tres tipos de ARN polimerasas aumentan de manera muy importante. Se ha demostrado también una gran actividad de síntesis de proteínas durante esta fase, es característica la síntesis de no histonas y varias proteínas

específicas recopiladas por Baserga en 1985 entre las cuales se encuentran: clamodulina, proteína inestable (R), actina, ornitina descarboxilasa, proteína p53 y varias proteínas citoplásmicas. También en esta etapa se ha detectado fosforilación de la histona H1, también se observa síntesis de histonas la cual se ve claramente incrementada en la fase S. En relación a las proteínas involucradas en la duplicación del ADN su síntesis se realiza durante la fase G1 tardía. Se han comprobado también en esta etapa cambios en la superficie celular y un aumento en el transporte de iones a través de la membrana.

Fase S - La síntesis del ADN está restringida casi en su totalidad al periodo de la interfase denominado como S. Para la síntesis o duplicación del ADN cada fibra de éste, está dividida en muchas unidades de duplicación denominadas duplicones. Cada duplicón tiene un centro que es el origen a partir del cual la duplicación se da en ambas direcciones. En las primeras etapas del desarrollo embrionario todos los duplicones funcionan simultáneamente y la fase S es muy corta. Pero en las células de un animal adulto la síntesis se inicia en diferentes lugares de los cromosomas a diferentes tiempos, existe un orden temporal establecido que se mantiene siempre. Se propone que los duplicones se encuentran agrupados en familias que son grupos que inician su duplicación simultáneamente respondiendo a una señal común. El mecanismo por el cual se mantiene el orden de iniciación no se ha determinado, se ha propuesto que la metilación está involucrada en el mantenimiento de este orden, pero esto no ha sido claramente confirmado.

Las enzimas requeridas para la síntesis del ADN son diversas Pardee et al en 1978 pusieron énfasis en dos grupos de enzimas las ADN polimerasas y las ligasas, Baserga en 1985 consideró de importancia otras enzimas relacionadas con el metabolismo del ADN como la timidina quinasa y la ribonucleótido reductasa. Reddy y Pardee en 1980 consideraron de importancia para la iniciación de la síntesis del ADN la integración de un complejo formado de varias proteínas que contiene la mayoría de las proteínas que son requeridas para la síntesis del ADN y proteínas asociadas.

Otro aspecto muy importante durante la fase S es la síntesis de proteínas del tipo de las histonas, la síntesis de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) está relacionada con la síntesis del ADN. La fosforilación de la histona H1 continúa en la fase S, este proceso se realiza en dos sitios adicionales a los de G1. Además en la etapa S aparecen otros receptores de superficie para diferentes factores de crecimiento como son para el caso de los linfocitos T : la interleucina -2 y la transferrina.

Fase G₂ - Esta etapa es un periodo de intensa actividad bioquímica. La inhibición de síntesis de proteínas y ARN detiene a las células en G₂, de lo cual se infiere que el paso de S a mitosis no es automático. Se ha determinado en esta fase la síntesis de proteínas específicas necesarias para que la célula entre en división, dentro de ellas se encuentran las requeridas para construcción y operación del aparato mitótico y las necesarias para la condensación de los cromosomas. Rao y Adikha en 1985 describieron la existencia de proteínas involucradas en la condensación de los cromosomas, las denominaron "factores mitóticos" que son del tipo de las no histonas con gran afinidad por la cromatina, que se acumulan durante la fase G₂. Durante la telofase estos factores son inactivados por otros factores denominados "inhibidores de los factores mitóticos" que permanecen activos hasta la fase G₁, por lo anterior se consideran de importancia en la descondensación de los cromosomas.

Otro evento importante durante la etapa G₂ es la realización de un proceso de reparación del ADN conocido como reparación G₂, que ha sido ampliamente estudiado y fue evidenciado entre otros por Kihlman y Hartley en 1968.

Fase D - Durante la fase de división que puede ser una mitosis o una meiosis ocurren grandes cambios en la estructura y función celular. En esta etapa se llevan a cabo dos procesos: La división nuclear o cariocinesis y la división citoplásmica o citoquinesis, ambos están por lo general estrechamente asociados.

En esta fase se hace necesaria la presencia del aparato mitótico que asegura la segregación de los cromosomas y también se requiere de factores solubles que están relacionados con la condensación y descondensación de la cromatina y con la retracción y la reestructuración de la envoltura nuclear. Durante esta fase la síntesis de proteínas y de ARN son prácticamente nulas.

3) Regulación del ciclo.

La división de las células en cultivo puede hacerse más lenta o detenerse, si se limitan en el medio de cultivo los nutrientes esenciales, factores de crecimiento o si se añaden inhibidores de la síntesis de proteínas.

Las células normales responden a las condiciones subóptimas para su crecimiento al entrar en el estado G₀. Pardee, en 1974 definió que las células en estado quiescente deben escoger entre iniciar la fase G₀ o continuar la proliferación, se encuentra un punto de "no regreso", después de que las células han pasado este punto deben completar el resto del ciclo (S, G₂ y M) a una velocidad normal independientemente de las condiciones externas.

Pardee et al en 1978 consideraron que este punto de restricción puede definirse como el punto después del cual, aunque se añadan drogas que inhiben la proliferación, éstas no son efectivas en prevenir la entrada de las células a la fase S. Para el paso de este punto de restricción Rossow et al en 1979 sugirieron que es necesaria la acumulación de proteínas inestables denominadas proteínas "U" que representan el estímulo que induce la duplicación del ADN.

González-Fernández et al en 1974, propusieron con base en sus resultados usando inhibidores de proteínas, la existencia de otro punto de control en la fase G₂ temprana en el cual se requiere la síntesis de proteínas específicas para que la célula entre en mitosis. García-Herdugo et al en 1974, propusieron además la existencia de otro punto de control en la profase temprana ya que si se inhibe la síntesis de proteínas en esta etapa, se altera la progresión de la mitosis y el núcleo puede regresar a su estructura interfásica. Giménez-Martín et al en 1982 con estudios de células multinucleadas producidas por cafeína, comprobaron la existencia de estos dos puntos de control, y propusieron que la inhibición de la síntesis de proteínas en G₂ causa un severo retraso en la entrada de las células en mitosis y la inhibición de la síntesis de proteínas en profase causa un alargamiento de la misma.

Pardee et al en 1978 realizaron una revisión de los cambios y necesidades que se dan cuando las células son estimuladas en estado quiescente para su crecimiento y división, entre ellos están:

Factores de crecimiento - El suero es una mezcla compleja de sustancias que se ha utilizado en los medios de cultivo para proveer a las células de los factores de crecimiento necesarios. Se han realizado estudios para reemplazar el suero por factores de crecimiento purificados. Una gran variedad de hormonas polipeptídicas son mitogénicas en varios sistemas.

Cationes divalentes - Se han propuesto como reguladores del crecimiento, al calcio y el magnesio y también se ha observado

que algunas concentraciones subtóxicas de ciertos iones de metales divalentes como el zinc, cadmio y mercurio, estimulan la síntesis de ADN.

Superficie celular - Se ha determinado que existe relación entre la superficie celular y el crecimiento. Se considera que la superficie celular es importante en la inhibición dependiente de la densidad, se han observado cambios en la síntesis de glucoproteínas de acuerdo al ciclo celular, y hay controversia en relación a si la fluidez de la membrana plasmática es importante en la regulación del crecimiento; además hay evidencias que apoyan que las glucoproteínas de la superficie celular que actúan como receptores, están asociadas con el arreglo submembranal de microtúbulos y microfilamentos, que regulan así la movilidad de los receptores y el paso de las señales de crecimiento de la superficie celular al interior.

Transporte - La velocidad de transporte de moléculas de bajo peso a través de la membrana se ha propuesto como un regulador primario en el inicio de la proliferación. El transporte de pequeñas moléculas permite a las células proveerse de nutrientes lo que permite su crecimiento.

Síntesis y degradación de proteínas - La síntesis de proteínas aumenta cuando las células quiescentes son estimuladas y se ha observado que la degradación de varios tipos de proteínas disminuye.

ARN - Los ARN ribosomal, de transferencia y el mensajero se incrementan cuando se estimulan las células en estado quiescente.

Nucleótidos cíclicos - Se ha definido que el AMP cíclico y el GMP cíclico están involucrados en la regulación del crecimiento. Las evidencias indican que el AMPc detiene el crecimiento celular y el GMPc lo estimula, se considera que tienen efectos opuestos y los niveles de ellos y de las enzimas involucradas en su síntesis y degradación actúan sobre el ciclo celular.

Poliaminas y ornitina descarboxilasa - Un aumento en las poliaminas y en la enzima que principalmente regula su síntesis, la ornitina descarboxilasa, se ha observado que ocurre muy tempranamente cuando se estimula el crecimiento celular y son un requerimiento para la síntesis óptima de ADN.

Cambios nucleares - Se ha observado que en las células que son estimuladas para proliferar, se dan cambios en la estructura y función de la cromatina, estos cambios pueden representar la activación de los genes y/o la preparación para la subsecuente síntesis de ADN. También se ha observado que la síntesis de proteínas cromosómicas no histonas, se incrementa cuando las células son estimuladas y llega a un máximo en la fase G1 tardía.

Pardee en 1986, en relación con la información reciente de los eventos bioquímicos y moleculares que regulan la proliferación celular, hizo las siguientes consideraciones:

Los factores de crecimiento exógenos regulan la proliferación de las células normales. Algunos de estos estimulan a las células para salir del estado de G₀ y entrar en el ciclo.

Otros factores se requieren a través de la fase G1 durante la cual se prepara la célula para la síntesis de ADN. Después de esto no se requieren factores de crecimiento, las células continúan a través de S, G2 y M y llegan a G1, cuando se requiere la adición de factores específicos.

Los factores de crecimiento estimulan bioquímicamente a las células al activar la transcripción general y específica y la síntesis post-transcripcional. Un evento crítico en G1 es el punto de restricción, para el paso de este punto se requiere síntesis general rápida de proteínas para su acumulación neta.

Los procesos en G₀ y G1 que llevan a la síntesis del ADN son los que regulan la proliferación en células normales.

Pardee también consideró importante puntualizar algunos aspectos del control de la proliferación y son los siguientes:

a) Las células quiescentes están en G₀ que es diferente del estado G1 de las células en proliferación, aunque ambas tienen el mismo contenido no duplicado de ADN. Para que las células salgan de G₀ se requiere reactivar su maquinaria para la síntesis de ARN mensajero, lo cual representa un periodo de varias horas. Las células en G1 tienen lista la maquinaria para la síntesis de proteínas y ARN y se preparan rápidamente para la síntesis de ADN.

b) Las células detenidas dentro del ciclo están en un estado dinámico. Después del estímulo necesario para la progresión en el ciclo algunas moléculas son degradadas y otras son sintetizadas en el mismo tiempo lo que produce un balance diferente al original.

c) Se ha hecho la diferenciación muy clara entre los puntos de "compromiso" y los puntos de "ejecución". Por ejemplo el punto de ejecución para la fase S es el inicio de la síntesis del ADN, pero el punto de compromiso se encuentra 2 horas antes.

d) No todos los factores requeridos para el crecimiento celular son reguladores fisiológicos, esto es, muchos componentes son necesarios para el crecimiento, pero no todos lo regulan, por ejemplo quitar iones de fosfato o potasio detiene el crecimiento pero no son cruciales en determinar si la célula crece o no.

Por otro lado los niveles de factores tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y somatomedina C, son críticos para determinar si las células normales crecen o no.

Pardee et al en 1986 consideraron que los componentes generales de la proliferación celular que actualmente se encuentran en estudio dada su importancia son los siguientes:

- | | |
|-----------------------------|-------------------|
| 1 - Factores de crecimiento | 5 - ARN mensajero |
| 2 - Receptores de membrana | 6 - Proteínas |
| 3 - Segundos mensajeros | 7 - Enzimas |
| 4 - Activación de genes | |

La proliferación celular depende en última instancia de los genes y productos de ellos a los cuales responde la célula. Baserga et al en 1982 definieron que en relación a los genes involucrados en la proliferación celular, se deben distinguir dos aspectos: a) La identificación de esos genes y b) Los mecanismos por los cuales esos genes son activados o reprimidos. Este último aspecto resulta ser el más importante ya que los genes están presentes tanto en las células que proliferan como en las que no lo hacen, pero la proliferación depende de que estos genes se expresen.

Se han identificado algunos aspectos importantes como son: Existen evidencias de que la transcripción de un gene de copia única es necesaria para el paso de células quiescentes a la proliferación, ya que al inhibir la ARN polimerasa II, que transcribe genes de copia única, se inhibe la entrada de las células a S. También se identificó que dentro de un gene hay regiones que codifican para el crecimiento en tamaño, y para la duplicación del ADN, esto es, los requerimientos para la duplicación del ADN parecen ser diferentes a los del crecimiento en tamaño. Dentro de los mecanismos por los cuales los genes pueden ser activados o reprimidos se mencionó de importancia, la metilación en sitios específicos, considerando que esta tiene

diferentes efectos en distintos genes y de acuerdo a los sitios que estén metilados, también se consideró que la expresión puede ser regulada por algunas modificaciones, especialmente de la molécula del ADN en las secuencias del extremo 5'. Al continuar el estudio de este tipo de genes, Baserga en 1986, identificó dentro de los genes que regulan la proliferación celular a cuatro oncogenes que están involucrados en la transición de G₀ a G₁.

Se han realizado diversos estudios para aislar los genes involucrados en la progresión del ciclo celular, se han empleado "mutantes" los más usados son los sensibles a temperatura que generalmente contienen una sola proteína alterada, que funciona solamente a bajas temperaturas, la mayoría de los mutantes son afectados en su crecimiento en un tiempo corto después de disminuirles la temperatura, pero algunos son afectados sólo cuando alcanzan un sitio específico del ciclo como: el inicio de la síntesis de ADN, división nuclear o citoquinesis. Estos mutantes han sido ampliamente estudiados en levaduras. Pringle y Hartwell en 1981 informaron que se han aislado más de 35 genes diferentes involucrados en la progresión del ciclo celular denominados cdc genes.

4) Estudios sobre proliferación celular.

El ADN es una de las moléculas que ha dado mayor información acerca de los cambios que ocurren durante el ciclo de vida de las células, ha sido muy útil para determinar la cinética de proliferación celular y el tiempo del ciclo celular, también llamado tiempo de generación. En 1953 Watson y Crick postularon un modelo preciso de la estructura del ADN, en 1957, Meselson y Stahl, demostraron el mecanismo de duplicación semiconservativa en procariontes y Taylor et al en 1957 también demostraron la duplicación semiconservativa del ADN en células eucariontes.

Para el estudio acerca del paso de las células a través del ciclo celular o dinámica celular se han empleado diferentes metodologías dentro de ellas se encuentran:

a) La utilización de precursores radiactivos - Han sido ampliamente usadas las técnicas basadas en la incorporación de precursores radiactivos en el ADN, seguidas de autorradiografía y análisis de los patrones de marcaje en función del tiempo. El precursor más comúnmente usado es la timidina tritlada y se administra generalmente en pulsos cortos de aproximadamente 30 minutos, en estos estudios se puede determinar:

- Índice de marcado - Se determina por radioautografía la fracción de células que tienen su núcleo marcado con granos de plata, este índice está relacionado con las células que pasaron por la fase S y se obtiene la fracción de crecimiento. Schoenfield y Kallman en 1980 propusieron un procedimiento, cuantitativo para una determinación más clara del índice de marcaje, que consiste en contar la distribución de granos.

- Fracción de mitosis marcadas - Propuesto por Quastler y Sherman en 1959, este método consiste en determinar el número de mitosis, que se encuentran marcadas después de un pulso, es el método más ampliamente usado y proporciona información acerca de la duración de las fases del ciclo celular.

Los métodos autorradiográficos tienen varias desventajas técnicas, Schneider et al en 1978 hicieron una recopilación de estas y consideran que son:

- 1) Se requiere de mucho tiempo y esfuerzo técnico.
- 2) Se pueden dar alteraciones en la proliferación celular por la incorporación y/o eliminación del precursor radiactivo.
- 3) Se presentan problemas técnicos como la resolución y dilución de la marca.
- 4) La insensibilidad de la técnica en células con periodo intermitótico largo.

Recientemente Gratzner y Leif en 1981 y Oku en el mismo año, desarrollaron un método basado en dar un pulso de marcaje con otro precursor del ADN, la bromodesoxiuridina (BrdU); posteriormente hidrolizan para producir un ADN de cadena sencilla que es el que ha incorporado BrdU y tienen con un anticuerpo fluorescente contra BrdU. La fracción de células marcadas con BrdU pueden determinarse con un microscopio de fluorescencia o por medio de citofluorometría. Para una mayor eficiencia de este procedimiento Gratzner en 1982 desarrolló un anticuerpo monoclonal contra BrdU y Raza et al en 1984 también emplearon anticuerpos monoclonales contra BrdU para detectar síntesis de ADN.

b) Analisis de la distribución del ADN -

Este tipo de análisis ha tenido gran impulso por el desarrollo de la citofluorometría que permite determinaciones rápidas y seguras. Además no requiere incorporación de precursores como la timidina tritiada o la bromodesoxiuridina que son potencialmente tóxicos o mutagénicos. Se colectan las células, se dispersan para tener suspensiones de una sola célula y se tiñen con un colorante fluorescente específico para ADN. (Melamed, 1972). Gray *et al* en 1983 consideraron algunas desventajas a la técnica entre las que se encuentran:

- 1) La población celular debe reducirse a suspensiones de una sola célula.
- 2) Las células no pueden relacionarse con su localización dentro del tejido.
- 3) El equipo requerido es muy caro y complejo.
- 4) No se obtiene información acerca de la duración de cada una de las fases.

Para complementar la información se ha propuesto analizar el ciclo celular por medio de diferentes parámetros. Darzynkiewicz y Andreeff en 1981 comentaron que se han desarrollado técnicas citofluorométricas para medir además del contenido de ADN el contenido de ARN en mediciones simultáneas. También han detectado incorporación de BrdU, se han analizado la estructura de la cromatina nuclear con base en su estabilidad *in situ* al calor ó al tratamiento con ácidos. Los autores propusieron con base en sus resultados que se pueden hacer nuevas subdivisiones al ciclo celular, determinando que se pueden considerar 13 compartimientos funcionalmente distintos.

Gray *et al* en 1986 realizaron una revisión acerca de la utilidad de la citofluorometría en el estudio de la proliferación celular. Analizaron la utilidad de la técnica de medidas simultáneas del contenido de ADN y cantidad de BrdU incorporada, al utilizar dos colorantes fluorescentes de diferente longitud de onda (ejemplo rojo y verde), uno se une al ADN total y el otro sólo al que ha incorporado BrdU. Las aplicaciones de la metodología BrdU/ADN son las siguientes:

- 1) Determinación de la fracción de células en G₁, en S y en G₂ + M.

- 2) Determinación de la duración de las fases G₁, S y G₂ + M, definir la dispersión celular en las diferentes fases del ciclo y cuantificar la fracción de células en crecimiento.
- 3) Análisis de la proliferación celular en respuesta a agentes específicos.

Un hallazgo muy importante en la década de los 70 fue el lograr tinción diferencial de cromátidas hermanas por métodos no autoradiográficos, esto se logró mediante la incorporación de la 5-bromo-desoxiuridina (BrdU) que es un análogo de la timidina que se incorpora fácilmente a las cadenas de ADN en formación. Las células que sólo han pasado un ciclo de duplicación en presencia de la BrdU muestran en la mitosis todos sus cromosomas oscuros, ya que ambas cromátidas son iguales químicamente, se encuentran monosustituidas. En aquellas metafases que han pasado por dos ciclos de duplicación en presencia de BrdU sus cromosomas presentan una cromátida oscura que está monosustituida con BrdU y una cromátida clara que está doblemente sustituida con el análogo en estas mitosis el cincuenta por ciento de las cromátidas son claras y el otro cincuenta por ciento son oscuras. En las metafases que han pasado por tres ciclos de duplicación en presencia de BrdU se pueden observar cromosomas con ambas cromátidas claras, esto es doblemente sustituidas con BrdU y cromosomas con una cromátida clara y una oscura, en estas mitosis se observa el setenta y cinco por ciento de cromátidas claras y el veinticinco por ciento restante oscuras.

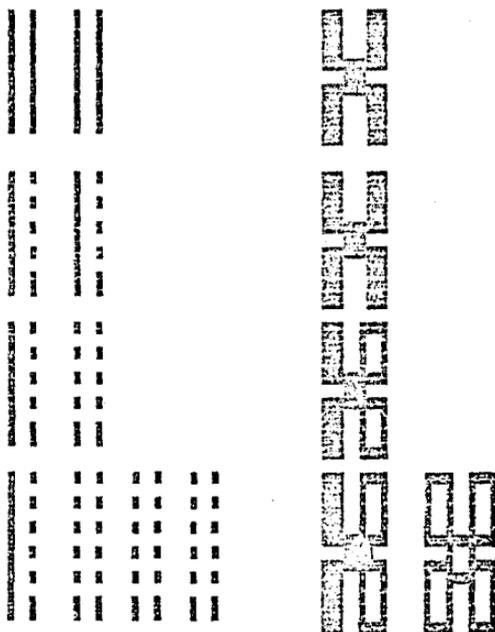
Tice et al en 1975 presentaron un modelo que explica el mecanismo de tinción diferencial en los cromosomas metafásicos que han incorporado BrdU (Figura 3).

El esquema está basado en tres premisas fundamentales que son:

- a) La duplicación semiconservativa del ADN.
- b) Una cromátida, está constituida por una sola doble hélice
- c) Los cromosomas se segregan al azar en la división celular.

Figura 3.

Mecanismo para la Tinción Diferencial
entre Cromátidas Hermanas por la
incorporación de BrdU.



Las líneas en sólido representan cadenas de ADN no substituidas,
en tanto las líneas punteadas representan cadenas de ADN substituidas.

5) Estudios sobre proliferación celular mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas.

El poder identificar claramente la historia de duplicación de las células con base en la tinción diferencial de cromátidas hermanas por incorporación de BrdU, constituyó un método alternativo para el estudio de la proliferación celular. Se puede determinar si las células han pasado por uno, dos o tres ciclos de duplicación.

Diversos autores han realizado estudios para determinar la proliferación celular tanto in vitro como in vivo, por medio de la técnica de tinción diferencial.

En los años de 1975-1976 aparecieron los primeros estudios al respecto, entre ellos se encuentran: Bianchi y Lezana que en 1976 estudiaron la cinética de la proliferación celular en cultivo de linfocitos. Determinaron que el método de estudio es muy útil y se puede identificar claramente el porcentaje de linfocitos que han pasado por uno, dos o tres ciclos de duplicación. Además, sus datos mostraron que la dosis mínima de BrdU para obtener buena diferenciación es de 5 ug/ml. Tice et al en 1976 estudiaron la proliferación celular en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina, al emplear diferentes dosis de BrdU, sus resultados mostraron que una dosis alta inhibe la proliferación celular, pero al usar una cantidad menor de 35 micromolar no se observa inhibición. Crossen y Morgan en 1977 y en 1981, estudiaron la proliferación de los linfocitos en respuesta a diferentes mitógenos como la fitohemaglutinina y un derivado proteico purificado de la tuberculina. Sus resultados mostraron que en los cultivos de linfocitos se presentan diferentes poblaciones con diferente duración de ciclo. Wagner et al en 1983 emplearon esta metodología para el análisis de las aberraciones cromosómicas inducidas por rayos X en el primer ciclo de duplicación. Frías y Carnevale en 1983 con este método determinaron las alteraciones en el ciclo celular en pacientes con diferentes síndromes. Así mismo, Morimoto et al en 1983, por el uso simultáneo de esta técnica y autorradiografía, con una combinación de ellas para determinar cuando se sintetiza ADN y cuántas veces o cuántos ciclos de duplicación pasan los linfocitos, indicaron que sin importar si los linfocitos empiezan a ciclar temprano o tarde después de la estimulación con fitohemaglutinina, tienen el mismo tiempo de generación. En relación al estudio de la proliferación celular en sistemas in vivo, Schneider et al en 1977 analizaron la proliferación celular en médula ósea de rata y determinaron además que una

concentración baja de BrdU no inhibe la cinética de proliferación, aspecto que debe ser tomado en cuenta al estudiar la proliferación celular pues a dosis altas la BrdU es capaz de inhibir la proliferación celular.

Se han propuesto diferentes métodos para el análisis de los resultados sobre la proliferación celular obtenidos al utilizar BrdU. La principal diferencia es el determinar la proliferación celular con el empleo para el estudio de un solo punto de análisis y el empleo de varios puntos para el análisis y la determinación del tiempo del ciclo celular. El primero de los métodos diseñado por Dutrillaux y Fosse en 1976 y Tice et al en 1979, es el análisis de la distribución de metafases en primero, segundo y tercer ciclo a diferentes tiempos y tomar como duración de ciclo el intervalo de tiempo entre el 50% de mitosis en primero y 50% de mitosis en segundo o entre el 50% de metafases de segundo ciclo y el 50% de metafases en tercer ciclo. Becher y Schmidth en 1982 propusieron un método para calcular el tiempo de ciclo que consiste en: considerar el tiempo de cultivo en presencia de BrdU menos la mitad del tiempo con colcemida dividido entre el número de ciclos celulares observados.

Ivett y Tice también en 1982 propusieron otro método para calcular el tiempo promedio de generación consistente en: considerar el tiempo de cultivo en presencia de BrdU y dividirlo entre el porcentaje de células en primer ciclo multiplicado por uno, más el porcentaje de células en segundo ciclo multiplicado por dos, más el porcentaje de células en tercer ciclo multiplicado por tres entre 100. Trent et al en 1986 efectuaron una comparación de los diferentes métodos utilizados para la determinación del tiempo total del ciclo, comentaron que en los casos cuando se usa un solo punto de análisis la duración obtenida de ciclo puede ser variable, depende de la hora de la cosecha y afirman que la forma más segura de determinación es tomar diferentes puntos y analizar la distribución de las metafases en los diferentes ciclos celulares según la forma propuesta por Dutrillaux y Fosse, 1976 y Tice et al en 1979.

D) MEDULA OSEA

1.- Características Generales.

La médula ósea es un tejido de gran importancia biológica, ya que representa el sitio principal de la hematopoyesis.

Golub en 1982 comentó que la médula ósea de los mamíferos es una fuente de células que puede reconstruir por completo el sistema hematopoyético de un animal letalmente irradiado. Además comentó que todos los tipos de células sanguíneas son derivadas de una célula común, la célula basal hematopoyética. Esta célula de proliferación lenta, multipotente y no comprometida da origen a células con proliferación activa que están comprometidas a distintos caminos de diferenciación. El microambiente presente en la médula, representa el lugar donde ocurre la inducción o compromiso, son los eritrocitos, granulocitos, monocitos, plaquetas y linfocitos las formas finales de la diferenciación. También propuso las condiciones requeridas para el estudio de la hematopoyesis in vitro.

Fliendner y Calvo en 1984 definieron que la médula ósea es un órgano formado por dos sistemas de diferente origen: El primero se encuentra conformado por las células basales hematopoyéticas y sus descendientes, el segundo sistema está constituido por los elementos del estroma en el cual las células basales proliferan y se diferencian.

Baserga en 1981 definió que de acuerdo a su proliferación la médula ósea está constituida por tres diferentes poblaciones celulares. La primera comprende células que se dividen continuamente, esto es llegan de una mitosis a la próxima en corto tiempo, es un grupo de alta proliferación. La segunda población contiene células que abandonan o dejan el ciclo después de un cierto número de divisiones y se convierten en células diferenciadas. Las células de la tercera población dejan temporalmente el ciclo y permanecen en estado quiescente hasta que las condiciones del medio estimulan su reentrada en el ciclo. Algunas de las células basales pertenecen a este grupo.

2.- Estudios Citogenéticos en Médula Ósea.

Gran cantidad de estudios citogenéticos se han llevado a cabo con la médula ósea de diversos organismos como sistema de estudio entre ellos se encuentran: Schneider et al en 1977 estudiaron la duplicación de las células de la médula ósea de rata, in vivo a diferentes tiempos empleando BrdU. Ivett y Tice en 1981 estudiaron las aberraciones cromosómicas y la frecuencia de ICH inducidos en médula ósea de murinos. Harker et al en 1983 determinaron la homogeneidad en el ciclo celular en médula ósea de diferentes huesos en ovejas. Becher y Sandberg en 1984 estudiaron la frecuencia de ICH y duración del ciclo en médula

ósea de humanos. DuFrain et al en 1984 estudiaron la frecuencia de ICH por medio de tres diferentes análogos de la timina en células de la médula ósea de ratón y conejo. Morales-Ramirez et al en 1984(a) realizaron estudios sobre la frecuencia de ICH producidos por rayos gamma en médula ósea de ratón. Ogawa et al en 1985 determinaron el efecto de la desnutrición sobre el número de diferentes tipos celulares en médula ósea de rata. Tice e Ivett en 1985 definieron que en la década pasada se ha incrementado el conocimiento acerca de la sensibilidad de la médula ósea a los estímulos externos e internos, particularmente a los agentes citotóxicos (daño que causa la muerte celular) y/o genotóxicos (daño al ADN que puede causar muerte celular, mutaciones, cáncer etc.). Además consideraron que la gran velocidad de recambio de la médula ósea, hace que sea un tejido sensible a diversos agentes y que es por su alta velocidad mitótica y su facilidad de manejo técnico un sistema experimental muy útil en Genética Toxicológica.

Fliedner et al en 1986 en un artículo de revisión comentaron el efecto de las radiaciones sobre la médula ósea. Definieron que el daño sobre las células del parenquima ocasiona que las células tallo pierdan la capacidad de formar un número suficiente de células altamente diferenciadas en la sangre, esto se manifiesta clínicamente como leucemia o anemia aplásica. Las células del estroma son también sensibles a las radiaciones y el daño ocasiona que pierdan la capacidad de mantener la duplicación de las células tallo por largo tiempo y se altera el microambiente requerido para mantener el estado de equilibrio entre la producción de células y la muerte celular. Crossen et al en 1986 determinaron mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas por incorporación de BrdU, el tiempo de generación de las células de la médula ósea de humanos.

E) PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

La DCP es una enfermedad grave que representa un serio problema de Salud Pública y se encuentra ampliamente distribuida por el mundo, esto ha originado que varios grupos de investigación se interesen en el estudio de este padecimiento. Actualmente en varios países se realizan trabajos acerca de los efectos de la desnutrición en diversos campos como son: el inmunológico, fisiológico, bioquímico, celular, molecular, de desarrollo y conductual.

Los resultados obtenidos en los diferentes campos podrán complementarse para comprender mejor las manifestaciones de la enfermedad y lograr un tratamiento más adecuado de los niños desnutridos, tanto en el nivel individual como en el de la comunidad. También es de gran importancia el análisis de las posibles secuelas del padecimiento y la capacidad biológica de recuperarse de algunas de las lesiones causadas por la desnutrición. Por último sería de gran importancia el detectar si algunos organismos poseen una mayor sensibilidad a padecer desnutrición grave.

Dada la gran importancia que representa la desnutrición en nuestro país y dado que los efectos o daños causados por ella se dan en primera instancia a nivel celular, en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud se tiene el programa de estudio "Efectos a nivel celular de la desnutrición". Dentro de ese proyecto se llevó a cabo el presente trabajo en el cual se plantearon los siguientes objetivos:

II OBJETIVOS

Determinar el efecto de la desnutrición sobre las células de la médula ósea de ratas desnutridas durante la lactancia, al evaluar la Proliferación Celular y la Frecuencia de Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH) tanto in vivo, en un estudio transversal a 18 y 21 horas como in vitro, en un estudio longitudinal de 20 a 40 horas, mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas por incorporación de BrdU.

Evaluar la recuperación in vivo de las células de la médula ósea en ratas desnutridas durante la lactancia y posteriormente permitirles un periodo de recuperación de la desnutrición en duración igual al de la lactancia (21 días). Determinar la Proliferación Celular, Frecuencia de ICH y como parámetros de apoyo Cuantificación de proteínas séricas y peso corporal.

III MATERIALES Y METODOS

En el diseño experimental (Figura 4) se reúne la secuencia de estudios para producir la DCP, evaluarla y realizar:

- Estudios in vivo con ratas de 21 días de edad.
- Estudios in vivo con ratas de 42 días de edad en recuperación de la desnutrición.
- Y como parámetros de apoyo a los estudios citogenéticos se evaluaron el peso corporal y la concentración de proteínas séricas en ratas desnutridas de 21 días y en ratas en recuperación de la desnutrición de 42 días.
- Estudios in vitro con ratas de 21 días de edad.

1) Animales

Se usaron ratas de la cepa Wistar reproducidas en el bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura, luz y circulación de aire.

2) Desnutrición Experimental

Se efectuó la desnutrición por competencia de alimento durante el periodo de lactancia. Al día siguiente a su nacimiento se formaron dos lotes, el lote testigo integrado por nodrizas con 6 crías cada una y el lote experimental integrado por nodrizas con 15 crías cada una. Se determinó el peso de las crías cada 2 días para evaluar el crecimiento.

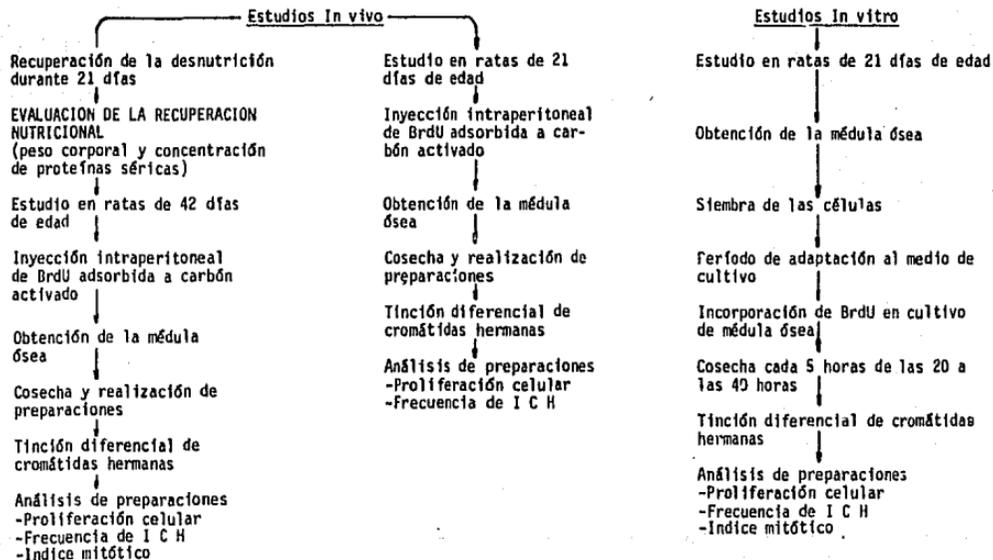
Se consideraron como ratas desnutridas aquellas que presentaron a los 21 días una diferencia en peso mayor al 40% con respecto a aquellas ratas alimentadas en forma adecuada durante el mismo periodo de tiempo.

FIGURA 4

DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

DESNUTRICIÓN DURANTE LA LACTANCIA

EVALUACION DE LA DESNUTRICION
(Peso corporal y concentración de protefnas séricas)



3) Recuperación de la desnutrición

A los veintidós días las ratas fueron destetadas y se colocaron cinco de ellas por caja, se alimentaron con comprimidos Purina ad libitum durante los siguientes 21 días tanto las ratas que se desnutrieron durante la lactancia como las ratas bien nutridas desde su nacimiento.

4) Incorporación de 5-Bromodesoxiuridina (BrdU).

a) Para los estudios in vivo, se siguió el método desarrollado por Morales-Ramirez (1980); Morales-Ramirez et al (1984 b), propuesto por Russev y Tsanev (1973). Se inyectó intraperitonealmente una suspensión acuosa de BrdU (Sigma Chem.) adsorbida a carbón activado (Merck) en una dosis de 1 mg/gr de peso corporal.

La adsorción de la BrdU al carbón activado se llevó a cabo mediante la agitación de una solución acuosa de BrdU (20mg/ml) en agua bidestilada, a la cual se agregaron 100 mg de carbón activado por mililitro de solución y se mantuvo en agitación magnética durante 2 horas en oscuridad. El carbón activado fue previamente lavado varias veces con hidróxido de sodio (NaOH) 1N, y posteriormente lavado varias veces con ácido clorhídrico (HCl) 1N, entre cada lavado se esperó 10 min, se desechó el sobrenadante. Después se lavó en agua desionizada hasta obtener el pH del agua (aproximadamente 6). Se secó en el horno a 150 °C y antes de pesarse se secó a la flama.

b) Para los estudios in vitro, se preparó en la oscuridad una solución de 4 mg de BrdU en 10ml de agua destilada, se esterilizó por filtración y de esta solución se agregaron 0.3 ml por caja de cultivo. Se tuvo una concentración final de BrdU de 2.5×10^{-6} a la menos 5 Molar.

5) Extracción de la médula ósea

Para los estudios in vivo, transcurridas 17 y 20 horas de la inyección de la BrdU adsorbida a carbón activado, se inyectó intraperitonealmente colchicina 0.1% en una dosis de 1 ml por cada 100 gramos de peso corporal. Una hora después las ratas fueron anestesiadas con cloroformo y descerebradas. Se obtuvo 31

fémur de una de las patas traseras, se cortaron las epifisis y para extraer la médula ósea se inyectaron al interior del hueso 2.5 ml de medio de cultivo Mc Coy 5a modificado por uno de los extremos, la médula se depositó en tubos de centrifuga.

En el caso de los estudios in vitro las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se sumergieron en alcohol, se retiró la piel de las patas traseras, se cortaron éstas y se colocaron en cajas de Petri estériles que contenían 5 ml de solución salina. Posteriormente se trabajó en un cuarto de cultivo estéril en una campana de flujo laminar, se retiró el músculo y se obtuvieron ambos fémures, se cortaron las epifisis y se extrajo la médula ósea por inyección al interior del hueso de 5 ml de medio Mc Coy 5A modificado (Microlab), suplementado al 20% con suero de ternera (Microlab), Glutamina (Microlab) al 2% y 0.1% de antibiótico (Microlab). Se colectó la médula en otra caja de Petri y se resuspendió suavemente varias veces con pipeta Pasteur. Se contaron las células en un hemocitómetro y se determinó viabilidad por medio de la prueba por exclusión con azul tripano. Se colocaron las cajas de cultivo en una incubadora a 37 °C con Bióxido de Carbono al 20% en aire humidificado. Con una densidad celular de 4 millones de células por mililitro de medio de cultivo. Se dejaron las células en adaptación a las condiciones del medio durante 12 horas. Posteriormente se agregó BrdU en una concentración final de 2.5 por 10 a la menos 5 M, se protegieron de la luz cubriendo las cajas con papel aluminio y se prosiguió el cultivo en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se dejaron los cultivos hasta el tiempo de cosecha entre 20 a 40 horas, 12 horas después de la adición de la BrdU se agregaron 2.5 ml de medio fresco más la parte proporcional de BrdU. Una hora antes del tiempo de cosecha se añadieron 0.2 ml de colcemida (Microlab 10 ug/ml).

6) Cosecha de células

Para los estudios in vivo se realizaron las cosechas a las 18 y 21 horas en las ratas de 21 días y a las 21 horas en las ratas de 42 días de la manera siguiente:

El material se colectó directamente en un tubo de centrifuga. La médula ósea fue resuspendida vigorosamente y centrifugada a 1,500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante, se dejó solamente 1 ml; se agregaron 4 ml de solución hipotónica (KCl 0.057 M) a 37 °C con agitación continua,

se incubaron en esa solución durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron 10 min a 1,500 rpm, se desechó el sobrenadante hasta 1 ml y se añadieron 4 ml de fijador frío (metanol - ácido acético 3:1) en agitación constante. Se centrifugaron nuevamente. Se lavaron dos veces con fijador. Se dejó el paquete celular obtenido con un mililitro de fijador. Durante la cosecha se protegieron las células de la luz.

En el caso de los estudios in vitro las cosechas se realizaron cada cinco horas desde las 20 hasta las 40 horas de incorporación de BrdU, las células fueron resuspendidas suavemente con pipetas Pasteur y se pasaron a tubos de centrifuga y se cosecharon de la misma forma a la descrita en el párrafo anterior.

7) Realización de Preparaciones

Los paquetes celulares obtenidos se resuspendieron y se dejaron caer tres gotas de esta suspensión sobre un portaobjetos limpio y frío, se sopló para dispersión del material y se secaron a la flama. De cada paquete celular obtenido se hicieron dos preparaciones.

8) Tinción diferencial de cromátidas hermanas

Se usó la técnica basada en el método propuesto por Wolff y Perry en 1974, modificada. Las preparaciones fueron sumergidas durante 30 minutos en una solución de Hoechst (bibenzamida 33258), en una concentración de 9 $\mu\text{g/ml}$, preparada en agua destilada. Después de este tiempo se enjuagaron en agua corriente, se secaron al aire y se montaron en solución amortiguadora Sørensen a pH 6.8 (fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio). Posteriormente se colocaron en una caja negra a 2 cm de distancia de una lámpara de 20 watts de luz negra (General Electric), durante tres horas y media. Después fueron lavadas con agua corriente, secadas al aire y teñidas durante cuatro minutos con Giemsa (Merck), al 5% preparado con Sørensen y finalmente se montaron con resina sintética (Sigma).

9) Análisis de las preparaciones

a) Proliferación celular.-

Para el estudio de la proliferación celular se revisaron las preparaciones al microscopio, se clasificaron 100 mitosis consecutivas en primero, segundo o tercer ciclo de duplicación, de acuerdo a su tinción diferencial. Cuando se tenía duda en alguna mitosis ésta no fue tomada en cuenta. En el caso de los estudios in vivo con ratas de 21 días, se analizaron tres preparaciones por rata, se registraron en cada una 100 mitosis consecutivas, en los demás casos se analizó una preparación por rata.

Con los datos obtenidos se determinaron los porcentajes de células que han pasado por uno, dos o tres ciclos de duplicación (Figura 3) y se calculó el Tiempo Promedio de Generación (TPG), siguiendo la ecuación propuesta por Ivett y Tice en 1982:

$$TPG = \frac{\text{tiempo de incorporación de BrdU}}{(1 \times \% 1c.) + (2 \times \% 2c.) + (3 \times \% 3c.)} / 100$$

b) Índice mitótico (IM)

En todos los casos se determinó el IM por conteo de mil células, se anotó el número de mitosis que se encontraban, se consideraron en división mitótica únicamente aquellas células que se observaron en metafase.

c) Frecuencia de Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH)

Los ICH se analizaron en células de segundo ciclo de duplicación, se determinó el número de ICH por mitosis en 25 metafases por rata, aunque en algunos casos no fue posible llegar a este número, principalmente en el caso de las células de ratas desnutridas en los estudios in vitro. Se cuantificaron las ICH en metafases que tuvieron sus cromátidas hermanas claramente diferenciadas y con el número cromosómico completo (42 cromosomas).

10) Cuantificación de proteínas séricas

Se emplearon ratas de 21 días desnutridas por competencia de alimento durante la lactancia por el método descrito anteriormente y ratas en recuperación de la desnutrición de 42 días.

La obtención de suero para la determinación de proteínas totales se realizó de la siguiente manera: Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se colectó la sangre en tubos de centrifuga, se procuró que se deslizara por las paredes del tubo para evitar la hemólisis. La sangre se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente para la separación del suero, el cual, posteriormente, fue centrifugado durante 10 minutos a 2,500 rpm para eliminar impurezas y se guardó en congelación (a menos 40 °C), hasta su cuantificación. Se cuantificó el contenido protéico de los sueros mediante la técnica de Lowry et al (1951), de la siguiente manera: se tomaron 2.5 μ l de suero y se le adicionaron 1 ml de agua destilada y 5 ml de solución de (NaHCO₃ + NaOH + tartrato de sodio + CuSO₄ + H₂O), y se agregaron 0.5 ml de reactivo de Fenol-Cicalteau (1N) diluido 1:1 con agua destilada y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos, se leyeron a 660 nm en un espectrofotómetro (Zeiss M20) diluidos previamente 1:5.

11) Estadística

Los datos obtenidos se expresaron, en general, como promedios más menos la desviación estándar. Para los análisis de significancia estadística, se emplearon la prueba de "t de Student" para comparar las frecuencias de ICH, la concentración de proteínas séricas y los tiempos promedio de generación. La prueba de Chi cuadrada (X²) para proporciones se utilizó para comparar los porcentajes de células observados en cada uno de los ciclos de duplicación y para la comparación de la distribución de los ICH (Siegel, 1986 ; Snedecor y Cochran, 1981).

IV RESULTADOS

A) ESTUDIO IN VIVO EN RATAS DESNUTRIDAS DE 21 DIAS DE EDAD.1) EVALUACION DE LA DESNUTRICIONa) PESO CORPORAL

Los datos promedio de peso corporal del día siguiente al nacimiento a los 21 días de edad de 20 ratas en el grupo testigo y 30 en el grupo experimental se muestran en el Cuadro 1 de resultados, con ellos se elaboró una curva de incremento en peso (Gráfica 1). Los datos muestran que no existía diferencia en los pesos de las ratas que se colocaron en dos lotes al día siguiente a su nacimiento, el promedio de peso es de 7.0 gr en ambos grupos, con el tiempo se observó que el incremento en el peso de las ratas del lote experimental fue menor al observado en el lote de las ratas testigo, se observa diferencia de peso significativa ya a los 5 días de edad. A los 21 días se observa una diferencia altamente significativa entre ambos lotes, el promedio de peso fue de 48.3 ± 3.2 gr para las ratas del lote testigo y 22.8 ± 4.1 gr para las ratas del lote experimental. Se observa en este último grupo una disminución de peso alrededor del 50%, lo que implica una desnutrición calórico-proteica severa. Ratas obtenidas de estos lotes fueron utilizadas en los estudios de desnutrición a los 21 días de edad. Se consideraron como ratas desnutridas aquéllas que mostraron una diferencia de peso mayor al 40% en relación a ratas de su misma edad alimentadas adecuadamente.

b) PROTEINAS SERICAS

La concentración de proteínas séricas totales se determinó en 20 ratas de cada uno de los lotes, los resultados se muestran en el Cuadro 2. En las ratas bien nutridas de 21 días de edad se obtuvo un promedio de 67.5 ± 7.8 $\mu\text{g/ml}$, con una amplitud de valores desde 55.7 hasta 84.4 $\mu\text{g/ml}$; en el caso de las ratas desnutridas de la misma edad, se obtuvo un promedio de 53.0 ± 7.6 $\mu\text{g/ml}$ y los valores oscilaron desde 41.0 y 65.7 $\mu\text{g/ml}$. La prueba estadística de "t de Student" mostró una diferencia significativa entre ambos grupos de animales a favor de las ratas testigo o bien nutridas ($t = 5.96$, gl 38, $p < 0.001$).

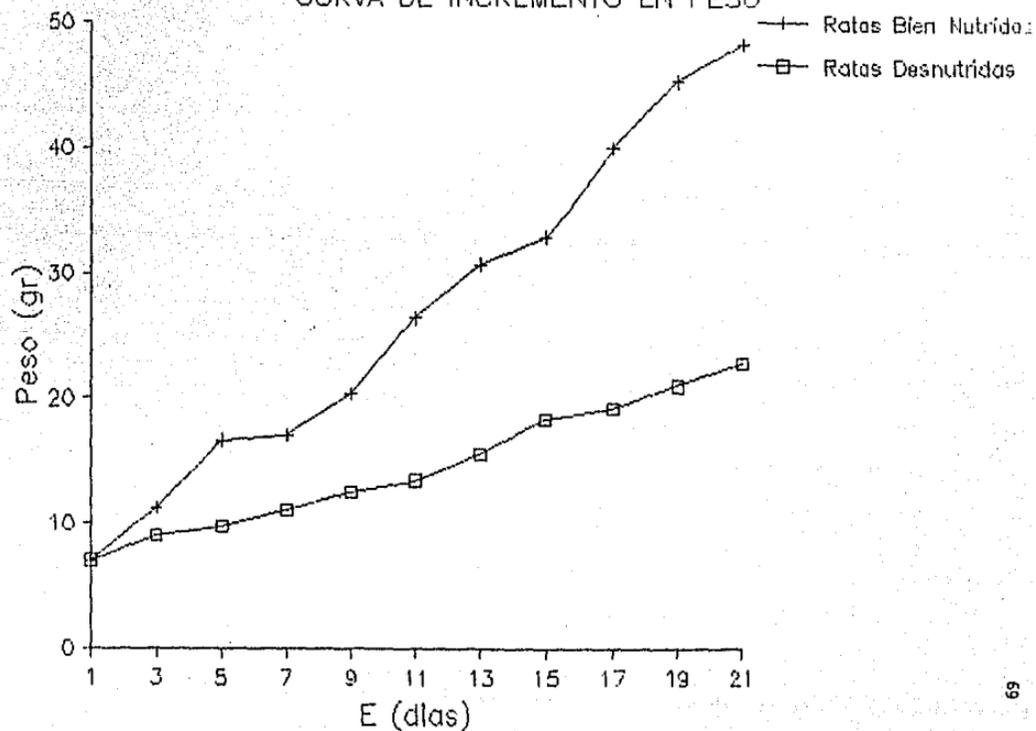
CUADRO 1

PESO CORPORAL (\bar{x}) DE RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS DESDE EL DIA SIGUIENTE A SU NACIMIENTO HASTA EL CESTETE (21 DIAS DE EDAD).

DIA	<u>TESTIGOS</u>		<u>DESNUTRIDAS</u>		PERDIDA DE PESO %
	PESO	D.E.	PESO	D.E.	
1	7.0	0.6	7.0	0.4	—
3	11.2	0.8	8.0	0.5	28.6
5	16.6	2.2	9.7	1.6	41.6
7	17.0	0.6	11.0	0.9	35.3
9	20.3	2.0	12.5	1.1	38.4
11	26.4	3.0	13.4	1.9	49.2
13	30.7	1.8	15.5	1.9	49.5
15	32.9	2.9	18.3	1.8	44.4
17	40.0	1.7	19.2	2.6	52.0
19	45.3	2.2	21.0	3.4	53.6
21	48.3	3.2	22.8	4.1	52.8

EL PROMEDIO REPRESENTA EL PESO DE 30 RATAS DEL LOTE EXPERIMENTAL Y 20 EN EL GRUPO TESTIGO.

Gráfica 1. DESNUTRICION DURANTE LA LACTANCIA
CURVA DE INCREMENTO EN PESO



CUADRO 2.

CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS ($\mu\text{g}/\text{ml}$ de suero) EN RATAS DESNUTRIDAS Y TESTIGO DE 21 DÍAS DE EDAD.

<u>TESTIGOS</u>	<u>DESNUTRIDAS</u>
84.40	65.73
78.40	64.40
76.40	61.73
75.07	60.40
74.40	59.07
73.73	59.40
70.40	56.40
69.07	56.40
68.40	55.73
68.40	53.73
65.73	52.40
65.63	52.40
64.40	50.40
63.07	49.73
59.73	46.40
59.73	45.73
59.73	45.07
59.07	42.40
58.40	41.73
55.73	41.06

$\bar{x} \pm \text{D.E.}$ 67.50 \pm 7.8	53.0 \pm 7.6
---	----------------

$$t = 5.96 \quad \text{gl} = 38 \quad p < 0.001$$

2) PROLIFERACION CELULAR (Ortiz y Betancourt, 1984)

Para el estudio in vivo en ratas de 21 días de edad, se analizó el porcentaje de células en primero, segundo y tercer ciclo de duplicación de acuerdo con la tinción diferencial en 9 ratas bien nutridas y en 7 ratas desnutridas, los datos se muestran en el Cuadro 3. En ellos se observa que el porcentaje de células que han pasado por dos ciclos de duplicación después de 18 horas de incorporación de BrdU es muy diferente en las desnutridas (14%) al observado en las bien nutridas (55%), consecuentemente el porcentaje de mitosis que han pasado sólo por un ciclo de duplicación es mayor en las desnutridas (86%) al de las bien nutridas (45%). En ambos casos el porcentaje de células en tercer ciclo fue prácticamente nulo. Se calculó el Tiempo Promedio de Generación (Cuadro 4) en ambos casos, este fue de 11.6 ± 0.9 hrs para las bien nutridas y 15.9 ± 1.0 hrs para las desnutridas. Se comparó el Tiempo Promedio de Generación obtenido en las células de las ratas desnutridas con el obtenido en las células de las ratas testigo mediante la prueba de "t de Student", y se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos ($t = 9.2$, gl 14, $p < 0.001$). Además se compararon los porcentajes de los ciclos de duplicación obtenidos en cada uno de los lotes mediante la prueba de Chi cuadrada, se obtuvo una diferencia altamente significativa ($X = 38.5$, gl 2, $p < 0.001$)

3) INDICE MITOTICO

También se determinó el índice mitótico en ambos grupos de ratas (Cuadro 5) se obtuvo un promedio de 1.39 ± 0.08 para las bien nutridas y 1.77 ± 0.01 para las desnutridas. Se compararon ambos promedios mediante la prueba de "t de Student" y se obtuvo una diferencia significativa entre ambos grupos, siendo mayor el índice en el caso de las ratas desnutridas ($t = 3.09$, gl 14, $p < 0.01$)

4) FRECUENCIA DE ICH (Betancourt et al 1986)

En los estudios in vivo en ratas de 21 días de edad, se determinó la frecuencia de ICH por mitosis en 25 metafases de segundo ciclo de duplicación, en 12 ratas desnutridas y 12 ratas bien nutridas, en ambos casos el tiempo de incorporación de BrdU fue de 21 horas. Los resultados se muestran en el Cuadro 6. En

CUADRO 3.

PORCENTAJE DE MITOSIS EN PRIMERO, SEGUNDO Y TERCER CICLO DE
 DUPLICACION *in vivo* EN RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS
 (18 HRS. DE INCORPORACION DE BrdU)

<u>Ciclo de Duplicación</u>					
<u>Ratas Testigo</u>			<u>Ratas Desnutridas</u>		
1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.
64	36	---	95	5	--
58	42	---	93	7	--
46	54	--	88	12	t
46	52	2	87	13	--
43	57	--	84	16	--
42	57	1	84	16	--
36	62	2	73	26	--
34	66	--	*	*	*
32	67	1	*	*	*
X 44.6 ±10.7	54.8 ±11.2	0.7 ±0.9	86.3 ±11.2	13.6 ±6.9	0.1 ±0.4

$$\chi^2 = 38.55 \quad g \ 12 \quad p < 0.001$$

n = 9 ratas testigo, n = 7 ratas desnutridas
 Número mitosis analizadas: 2,700 y 2,100 respectivamente

CUADRO 4.

TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION (TPG), *In vivo* EN
RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS DE 21 DIAS DE EDAD

	TESTIGO	DESNUTRIDAS
	13.2	17.1
	12.7	16.8
	11.7	16.1
	11.5	15.9
	11.5	15.5
	11.3	15.5
	10.8	14.1
	10.8	—
	10.7	—
$\bar{X} \pm D.E.$	11.6 ± 0.9	15.9 ± 1.0
n	9	7
	$t = 9.24, \text{ gl } 14, p < 0.001$	

CUADRO 5.

INDICE MITOTICO EN RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS DE
21 DIAS DE EDAD, INYECTADAS CON *BrdU* 18 HORAS
ANTES DEL SACRIFICIO.

	TESTIGO	DESNUTRIDAS
	1.8	2.2
	1.6	2.0
	1.5	1.9
	1.5	1.6
	1.4	1.6
	1.3	1.6
	1.2	1.5
	1.2	*
	1.0	*
$\bar{X} \pm D.E.$	1.39 \pm 0.08	1.77 \pm 0.098
n	9	7

$t = 3.09$, gl 14, $p < 0.01$

CUADRO 6.

FRECUENCIA DE ICH *in vivo* EN RATAS
TESTIGO Y DESNUTRIDAS DE 21 DÍAS DE EDAD.

<u>TESTIGOS</u>		<u>DESNUTRIDAS</u>	
$\bar{X} \pm D.E.$		$\bar{X} \pm D.E.$	
3.28	2.30	4.04	3.41
3.20	2.38	4.00	1.83
3.08	1.99	3.80	3.47
3.00	2.92	3.72	3.42
2.88	2.80	3.72	2.17
2.84	2.17	3.72	2.17
2.60	2.69	3.40	2.98
2.24	1.54	3.36	2.30
2.08	1.57	3.20	2.17
1.68	1.40	2.76	1.56
1.60	1.68	2.64	2.23
1.56	1.50	2.44	2.35 *

$\bar{X} \pm D.E.$ 2.50 \pm 0.64

3.40 \pm 0.54

$$t = 3.69, \text{ g l } 22 \quad p < 0.005$$

EL PROMEDIO REPRESENTA EL NÚMERO DE ICH/ MITOSIS/rata DEL
ANÁLISIS DE 25 METAFASES EN SEGUNDO CICLO.

* En esta rata sólo se analizaron 20 mitosis

las ratas bien nutridas el número de ICH por mitosis fue en promedio de 2.5 ± 0.64 con valores desde 1.56 hasta 3.28. En el caso de las ratas desnutridas se obtuvo un valor promedio de 3.4 ± 0.54 , con valores desde 2.44 hasta 4.04. Se compararon ambos valores mediante la prueba de "t de Student" la diferencia fue estadísticamente significativa a favor de las ratas desnutridas ($t = 3.69$, gl 22, $p < 0.005$). También se analizó la distribución de ICH por célula, los datos se muestran en el Cuadro 7 y Gráfica 2. Se observó que el porcentaje de mitosis en las que se observaron cero o un ICH/mitosis fue significativamente mayor en las ratas bien nutridas (39%) al observado en las desnutridas (23%). El porcentaje de mitosis con 2 y 3 ICH/mitosis fue similar en ambos grupos y el porcentaje de mitosis con 4 ó más ICH/mitosis fue mayor en las células de las ratas desnutridas (39%) al observado en las células de las ratas del lote testigo (24%). Se compararon estos porcentajes mediante la prueba de Chi cuadrada, obteniéndose un valor ($X^2 = 26.2$, gl 5, $p < 0.001$) siendo la diferencia estadísticamente significativa.

B) ESTUDIO DE LA RECUPERACION NUTRICIONAL IN VIVO EN RATAS DE 42 DIAS DE EDAD

5) EVALUACION DE LA RECUPERACION NUTRICIONAL

a) PESO CORPORAL

Para los estudios de recuperación nutricional, otro grupo de ratas fueron destetadas a los 21 días y se alimentaron adecuadamente hasta los 41 días de edad.

El promedio en peso de las ratas a los 21 días fue en este caso para las bien nutridas de 40.0 ± 4.9 gr y para las desnutridas 19.2 ± 3.4 gr. Después de 21 días de alimentación adecuada correspondientes al periodo de recuperación, se observó que el peso fue de 190.5 ± 8.8 gr para las bien nutridas y 79.0 ± 5.8 gr para las ratas recuperadas de la desnutrición. Los datos obtenidos de incremento en el peso corporal se muestran en el Cuadro 8 y Gráfica 3. En ellos puede observarse que las ratas

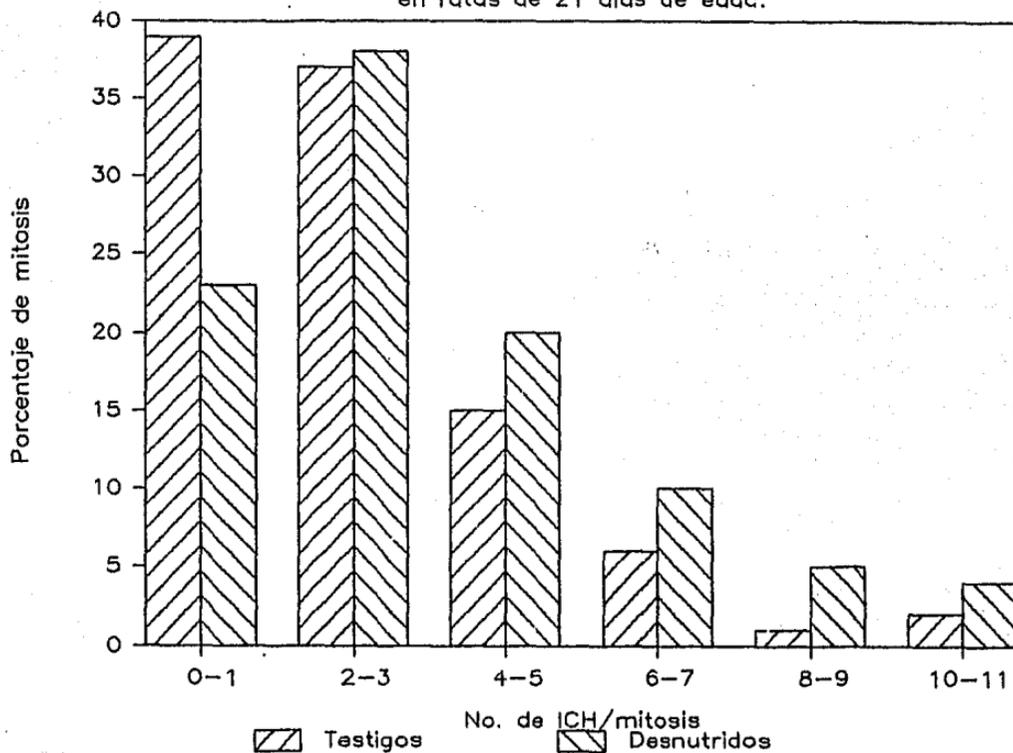
CUADRO 7.

DISTRIBUCION DEL NUMERO DE ICH POR MITOSIS *In vivo*
 EN RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS DE 21 DIAS DE EDAD

I.C.H./MITOSIS	TESTIGOS		DESNUTRIDAS	
	NUM.	%	NUM.	%
0 - 1	118	39	68	23
2 - 3	109	37	112	38
4 - 5	44	15	59	20
6 - 7	18	6	29	10
8 - 9	4	1	16	5
10 -11	7	2	11	4
TOTAL	300	100	295	100

$$\chi^2 = 26.20; p < 0.001$$

Gráfica 2. Distribución de ICH in vivo
 en ratas de 21 días de edad.



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

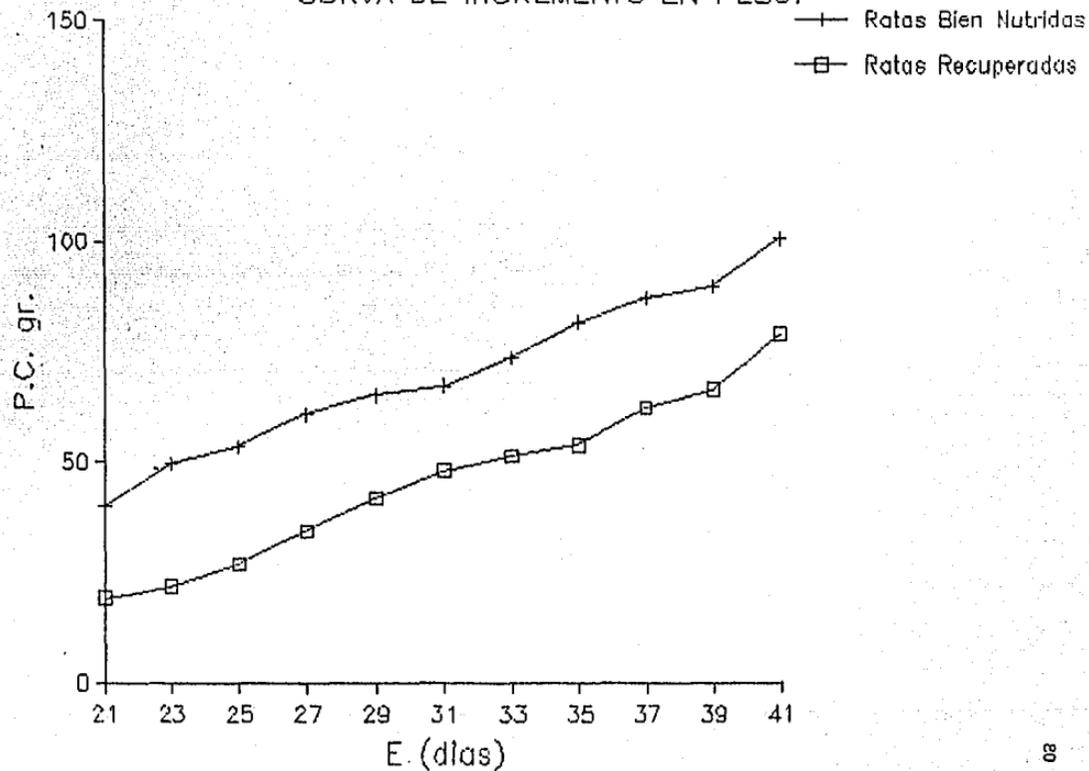
CUADRO 8.

PESO CORPORAL (\bar{x}) DE RATAS TESTIGO Y EN RECUPERACION NUTRICIONAL DESDE EL DESTETE HASTA LOS 41 DIAS DE EDAD.

DIA	<u>TESTIGO</u>		<u>RECUPERADAS</u>		DIFERENCIA EN PESO %.
	PESO \pm	D.E.	PESO \pm	D.E.	
21	40.0	4.9	19.2	3.4	52.0
23	49.6	4.8	21.9	3.0	56.0
25	53.7	5.7	27.0	4.5	48.8
27	60.8	7.2	37.5	5.7	38.8
29	65.2	8.1	41.8	6.2	35.8
31	67.3	7.9	48.1	3.7	28.5
33	73.7	7.7	51.3	6.7	30.4
35	81.7	6.7	54.2	4.6	33.6
37	87.1	7.9	62.3	8.2	28.4
39	92.4	6.8	66.4	8.4	28.1
41	100.5	8.8	79.0	5.8	21.4

EL PROMEDIO REPRESENTA EL PESO DE 30 RATAS EN EL GRUPO EN RECUPERACION NUTRICIONAL Y 20 EN EL TESTIGO.

Gráfica 3. RECUPERACION DE LA DESNUTRICION.
CURVA DE INCREMENTO EN PESO.



en recuperación de la desnutrición aumentan su peso a la misma velocidad que las ratas testigo, pero no logran alcanzar el peso de las ratas bien nutridas de la misma edad debido a la diferencia en peso que mostraban a los 21 días, sin embargo el déficit de peso disminuyó en relación al tiempo, fue de 52% a los 21 días y de 21% a los 41 días de edad.

b) PROTEINAS SERICAS

Así mismo después del periodo de recuperación se realizó la cuantificación de proteínas séricas en 20 ratas de 42 días de edad bien nutridas desde su nacimiento y en 20 ratas desnutridas durante la lactancia y con 21 días de alimentación adecuada es decir en recuperación nutricional. Los resultados observados se muestran en el Cuadro 9. En las ratas testigo el promedio fue de 61.1 ± 7.5 $\mu\text{g/ml}$ con valores desde 50.4 a 77.7 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas y para las ratas en recuperación el promedio fue de 73.5 ± 9.1 con una amplitud de valores desde 57 hasta 89.7 $\mu\text{g/ml}$. Se compararon estos valores mediante la prueba de "t de Student" ($t = 4.7$, gl 38, $p < 0.001$) y se encontró diferencia significativa entre ambos grupos de animales a favor de las ratas en recuperación nutricional.

En resumen puede observarse (Cuadro 2) que en las ratas de 21 días la concentración promedio de proteínas séricas fue significativamente mayor en las ratas bien nutridas (67.5 $\mu\text{g/ml}$) que el valor promedio obtenido en las ratas desnutridas (52.4 $\mu\text{g/ml}$). En el estudio a los 42 días (Cuadro 9) el promedio de las proteínas en las ratas en recuperación nutricional (73.5 $\mu\text{g/ml}$) es significativamente mayor al obtenido en las ratas bien nutridas (61.1 $\mu\text{g/ml}$), evidenciando con esto, recuperación nutricional.

6) PROLIFERACION CELULAR

Para los estudios en ratas en recuperación de la desnutrición, se analizó la proliferación celular en 10 ratas testigo y 10 en recuperación nutricional, los datos se muestran en el Cuadro 10. Se obtuvieron en las ratas bien nutridas de 42

CUADRO 9.

CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS ($\mu\text{g/ml}$ de suero) DE RATAS
TESTIGO Y RECUPERADAS DE LA DESNUTRICION DE 42 DIAS DE EDAD.

RECUPERADAS	TESTIGO
89.73	77.73
89.73	75.07
88.40	70.40
85.07	66.40
83.73	66.40
75.73	65.06
75.06	62.40
71.06	62.40
71.06	61.73
70.40	60.40
70.40	59.07
70.40	59.06
70.40	59.06
69.63	57.73
69.07	57.07
68.40	57.07
67.07	55.07
64.40	52.40
63.73	52.40
57.07	51.73
	50.40

$X \pm D.E.$ 73.5 \pm 9.10 61.10 \pm 7.50

$t = 4.7, \quad g l = 38, \quad p < 0.001$

CUADRO 10

PORCENTAJE DE MITOSIS EN PRIMERO, SEGUNDO Y TERCER
CICLO DE DUPLICACION EN RATAS BIEN NUTRIDAS Y EN
RECUPERACION DE LA DESNUTRICION DE 42 DIAS DE EDAD.

No. de Rata	<u>Ratas Testigo</u>			<u>Ratas en recuperaci3n de la desnutrici3n</u>		
	<u>Ciclo de Duplicaci3n</u>					
	<u>1^o</u>	<u>2^o</u>	<u>3^o</u>	<u>1^o</u>	<u>2^o</u>	<u>3^o</u>
1	46	54	-	46	51	3
2	45	53	2	40	60	-
3	40	60	-	34	66	-
4	32	68	-	28	65	7
5	27	68	5	24	75	1
6	27	73	-	13	87	-
7	24	76	-	10	88	2
8	18	82	-	8	90	2
9	16	82	2	6	86	8
10	14	86	-	4	91	5
\bar{X}	29	70	1	21	76	3

$$\chi^2 = 23.4, \text{ g l } 2, \text{ p} < 0.001$$

días, 29% de mitosis en primer ciclo, 70% en segundo ciclo y 1% en tercer ciclo, su TPG fue de 12.2 hrs. En el caso de las ratas desnutridas en recuperación nutricional de 42 días de edad se obtuvieron 21% de mitosis en primero, 76% en segundo y 3% en tercer ciclo, su TPG fue de 11.5 hrs. Estos porcentajes se compararon mediante la prueba de Chi cuadrada para proporciones que dio un valor de 23.4, gl 2, $p < 0.001$, que muestra diferencia significativa a favor de las ratas en recuperación nutricional.

7) INDICE MITOTICO

También se determinó el índice mitótico en 8 ratas de cada uno de los grupos, Cuadro 11. Se obtuvo un promedio de 3.2 ± 1 para las ratas testigo y de 3.4 ± 1.3 para las ratas en recuperación nutricional. Se compararon los promedios mediante la prueba de "t de Student", se demostró que no existe diferencia entre ellas ($t = 0.33$, gl 14, $p > 0.05$).

8) FRECUENCIA DE ICH

En el caso de los estudios en ratas en recuperación de la desnutrición se determinó la frecuencia de ICH en 10 ratas bien nutridas desde su nacimiento y en 10 ratas desnutridas durante la lactancia y posteriormente alimentadas adecuadamente durante 21 días. Los resultados se muestran en el Cuadro 12, en donde se observa que no hubo diferencia significativa en relación a la frecuencia de ICH/mitosis entre ambos grupos. El promedio fue de 2.24 ± 0.73 para las ratas testigo y 2.28 ± 0.56 para las ratas en recuperación nutricional. ($t = 0.2$, gl 18, $p > 0.05$). La distribución de ICH se muestra en el Cuadro 13 y en la Gráfica 4. y se observa que tampoco existe diferencia significativa en cuanto a la distribución de ICH entre ambos grupos. El porcentaje de mitosis que mostraron cero o un ICH/mitosis fue de 40% en el grupo testigo y de 38% en el grupo en recuperación nutricional, por otro lado el porcentaje de mitosis con 4 ó más ICH/mitosis fue en el caso de las ratas bien nutridas desde su nacimiento de 22% y en el grupo de recuperación nutricional fue de 20% ($X = 2.46$, gl 4, $p > 0.05$).

CUADRO 11.

INDICE MITOTICO EN RATAS BIEN NUTRIDAS DESDE SU NACIMIENTO Y EN RATAS DESNUTRIDAS EN RECUPERACION NUTRICIONAL DE 42 DIAS DE EDAD. (IM/1000 Celulas).

No. de Rata	<u>Ratas Bien Nutridas</u>	<u>Ratas en Recuperación Nutricional</u>
	<u>Indice Mitótico</u>	
1	4.5	5.2
2	4.1	4.4
3	4.1	3.9
4	3.3	3.8
5	3.2	3.7
6	2.3	3.4
7	2.3	1.5
8	1.7	1.2
Promedio ± D.E.	3.2 1.0	3.4 1.3

$t = 0.33$, $g l 14$, $p > 0.05$

CUADRO 12.

FRECUENCIA DE ICH EN RATAS CON 21 DIAS DE RECUPERACION NUTRICIONAL (42 DIAS DE EDAD) Y EN RATAS BIEN NUTRIDAS DE LA MISMA EDAD COMO TESTIGO

No. de Rata	<u>Ratas bien nutridas</u>	<u>Ratas en recuperación de la desnutrición</u>
	<u>Promedio de ICH</u>	
1	1.28	1.32
2	1.28	1.52
3	1.48	2.16
4	1.88	2.20
5	2.28	2.28
6	2.36	2.28
7	2.64	2.44
8	2.96	2.64
9	3.00	2.64
10	3.20	3.28
Promedio	2.24	2.28
± D.E.	0.73	0.56

$$t = 0.2, \text{ gl } 9, p > 0.05$$

EL PROMEDIO REPRESENTA EL NUMERO DE ICH/MITOSIS DEL ANALISIS DE 25 METAFASES EN SEGUNDO CICLO.

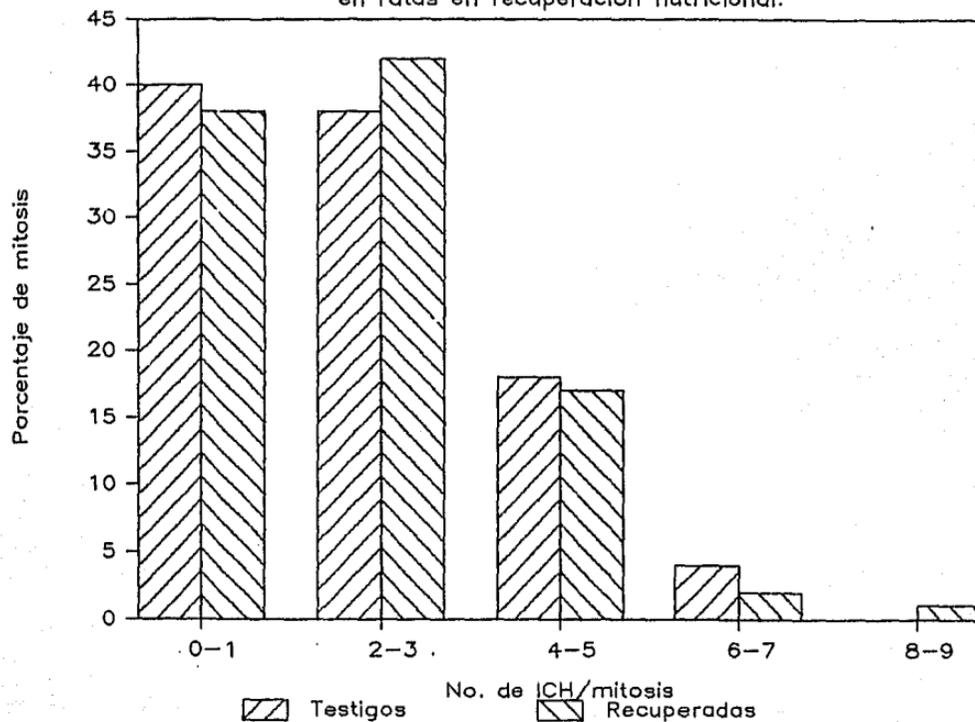
CUADRO 13.

DISTRIBUCION DE ICH /MITOSIS EN RATAS BIEN NUTRIDAS
DESDE SU NACIMIENTO Y EN RATAS EN RECUPERACION
NUTRICIONAL DE 42 DIAS DE EDAD.

Número de ICH/mitosis.	<u>Ratas Bien Nutridas</u>		<u>Ratas en Recuperacion Nutricional</u>	
	No. mitosis	%	No. mitosis	%
0 - 1	99	40	94	38
2 - 3	96	38	104	42
4 - 5	44	18	43	17
6 - 7	10	4	6	2
8 - 9	1	—	3	1
Total	250	100	250	100

$$\chi^2 = 2.46, \text{ gl } 4, p > 0.05$$

Gráfica 4. Distribución de ICH in vivo
 en ratas en recuperación nutricional.



C) ESTUDIO IN VITRO EN RATAS DESNUTRIDAS DE 21 DIAS DE EDAD

9) PROLIFERACION CELULAR

Se determinó en condiciones de cultivo el porcentaje de mitosis en primero, segundo o tercer ciclo de duplicación en células de la médula ósea de ratas desnutridas y bien nutridas, se dejaron las células 20, 25, 30, 35 y 40 horas en presencia de BrdU. Antes de la adición de la BrdU se dejaron las células en un periodo de adaptación a las condiciones de cultivo el cual se determinó que es aproximadamente de 12 horas. Se inició el análisis de los ciclos de duplicación a partir de las 20 horas de incorporación de BrdU ya que antes de este tiempo, a las 10 y 15 horas, el 100% de las mitosis corresponden al primer ciclo.

Los resultados obtenidos a las 20 horas de incorporación de BrdU en ambos grupos de ratas se muestran en el Cuadro 14. El porcentaje de mitosis en primer ciclo fue de 61.7 ± 14.2 para las ratas testigo y de 97.2 ± 1.8 para las ratas desnutridas. En el caso de las mitosis que han pasado por dos ciclos de duplicación el porcentaje promedio fue de 18.3 ± 14.2 para las ratas bien nutridas y de 2.8 ± 1.8 para las ratas desnutridas. No se observaron en ninguno de los dos lotes metafases de tercer ciclo. Los porcentajes se compararon mediante la prueba de Chi Cuadrada para proporciones ($X^2 = 12.84$, gl 2, $p < 0.005$) lo que evidenció diferencia significativa entre los porcentajes obtenidos para cada uno de los lotes. El TPG fue de 17.1 ± 2.1 hrs para las ratas testigo y de 19.4 ± 0.4 hrs para las ratas desnutridas.

A las 25 horas de incorporación de BrdU (Cuadro 15), el porcentaje de mitosis en primer ciclo fue de 29.7 ± 9.4 para las ratas testigo y de 62.6 ± 18.2 para las ratas desnutridas, en el caso de las mitosis de segundo ciclo el porcentaje promedio fue de 70 ± 9.2 y de 37.4 ± 18.2 respectivamente, solamente se observaron dos metafases de tercer ciclo en las ratas bien nutridas. Estos porcentajes fueron comparados mediante la prueba mencionada anteriormente ($X^2 = 21.82$, gl 2, $p < 0.001$) que mostró diferencia significativa entre ambos grupos. También se determinó el TPG para los dos grupos, el cual fue de 14.8 ± 0.8 hrs para las células de las ratas del grupo testigo y de 18.5 ± 2.5 hrs para las ratas desnutridas.

CUADRO 14.

PORCENTAJE DE MITOSIS EN PRIMERO, SEGUNDO Y TERCER CICLO DE
 DUPLICACION *in vitro* DE RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS
 CON 20 HORAS DE INCORPORACION DE BrdU

<u>Ciclo de Duplicación</u>					
<u>Ratas Bien Nutridas</u>			<u>Ratas Desnutridas</u>		
1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.
97	3	-	99	1	--
96	4	-	99	1	--
94	6	-	97	3	--
83	17	-	96	4	--
69	31	--	95	5	--
67	33	-			
66	34	-			
81.7 ± 14.2	18.3 ± 14.2		97.2 ± 1.8	2.8 ± 1.8	

$$\chi^2 = 12.84, \text{ g l } 2, p < 0.005$$

n = 7 ratas (testigos)

n = 5 ratas (desnutridas)

número de mitosis analizadas = 700 y 500 respectivamente.

CUADRO 15.

PORCENTAJE DE MITOSIS EN PRIMERO, SEGUNDO Y TERCER CICLO
in vitro EN RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS CON
 25 HORAS DE INCORPORACION DE *BrdU*

Ciclo de Duplicación

<u>Ratas Bien Nutridas</u>			<u>Ratas Desnutridas</u>		
1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.
43	57	—	88	12	—
34	66	—	81	19	—
34	66	—	78	22	—
27	73	—	74	26	—
24	74	2	59	41	—
16	84	—	55	45	—
			48	52	—
			42	58	—
			38	62	—
29.7 ± 9.4	70.0 ± 9.2	0.2 ± 0.4	62.6 ± 18.2	37.4 ± 18.2	—

$$\bar{X} = 21.82, \text{ g l } 2, \text{ p} < 0.001$$

n = 6 ratas testigo, n = 9 ratas desnutridas
 mitosis analizadas = 600 y 877 respectivamente.

Después de 30 horas de cultivo en presencia de BrdU (Cuadro 16), el porcentaje de mitosis que han pasado por un solo ciclo de duplicación fue para las ratas bien nutridas de 26.8 ± 13 y de 40.8 ± 18.2 para las ratas desnutridas. De las metafases de segundo ciclo se obtuvo un promedio de 73.2 ± 13 para las ratas testigo y de 60.5 ± 19.0 para las células de las ratas desnutridas. En ambos lotes no se observaron figuras metafásicas correspondientes al tercer ciclo de duplicación. Al comparar estadísticamente ambos promedios se obtuvo un valor de $X^2 = 4.11$, gl 2, $p > 0.05$, que refleja que en este tiempo de estudio no existió diferencia significativa entre los porcentajes obtenidos para ambos lotes. El TPG en el caso de las células de las ratas bien nutridas fue de 17.4 ± 1.3 hrs, en tanto que para las ratas desnutridas fue de 19 ± 2.7 hrs.

La proliferación celular a las 35 horas de incubación (Cuadro 17), mostró un porcentaje promedio para el primer ciclo de duplicación de 21.16 ± 3.65 para las ratas testigo y 27.6 ± 8.6 para las células de las ratas desnutridas. El porcentaje promedio de metafases en segundo ciclo fue de 72 ± 3.63 para las ratas testigo y de 72.3 ± 8.6 para las desnutridas. Las metafases en tercer ciclo de duplicación empezaron a observarse en un número significativo en las células de los organismos bien nutridos, con un promedio de 6.83 ± 3.54 . En las ratas desnutridas se observó una sola figura metafásica correspondiente a tercer ciclo de duplicación. La comparación estadística de los porcentajes de mitosis obtenidas en cada uno de los ciclos dio un valor de $X^2 = 7.38$, gl 2, $p < 0.025$, mostrando diferencia entre ambos lotes de animales. Se determinó el TPG en estos dos grupos obteniéndose un valor de 18.8 ± 0.6 hrs para las ratas testigo y de 20.3 ± 1.0 hrs para las ratas desnutridas.

En el estudio a 40 horas (Cuadro 18), el porcentaje de mitosis en primer ciclo de duplicación fue de 20.8 ± 7.7 en las células de las ratas testigo y en el caso de las ratas desnutridas se observó un marcado aumento en el porcentaje de mitosis que sólo han pasado por un ciclo de duplicación, se obtuvo un porcentaje promedio de 53.3 ± 18.2 . Para las mitosis que han pasado por dos ciclos, el porcentaje promedio fue de 49.7 ± 14.7 para las ratas bien nutridas y de 46.7 ± 18.2 para las

CUADRO 16.

PORCENTAJE DE MITOSIS EN PRIMERO, SEGUNDO Y TERCER CICLO
in vitro EN RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS
 CON 30 HORAS DE INCORPORACION DE BrdU

<u>Ciclo de Duplicación</u>					
<u>Ratas Testigo</u>			<u>Ratas Desnutridas</u>		
1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.
43	57	--	80	20	--
39	61	--	52	48	--
28	72	--	43	57	--
26	74	--	34	66	--
16	84	--	32	68	--
9	91	--	25	75	--
			25	75	--
			25	75	--
26.8 ±13.0	73.2 ±13.0	--	40.8 ±18.2	60.5 ±19.0	--

$$\chi^2 = 4.11, \text{ gl } 2, p > 0.05$$

n = 6 ratas testigo y 8 ratas desnutridas
 mitosis analizadas = 600 y 656 respectivamente.

CUADRO 17.

PORCENTAJE DE MITOSIS EN PRIMERO, SEGUNDO Y TERCER CICLO
In vitro EN RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS
 CON 35 HORAS DE INCORPORACION DE BrdU

<u>Ciclo de Duplicación</u>					
<u>Ratas Testigo</u>			<u>Ratas Desnutridas</u>		
1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.
26	72	2	40	60	→
24	66	10	37	63	--
22	75	3	36	64	--
21	70	9	34	65	1
17	76	7	27	73	
17	73	10	25	75	--
			22	78	--
			20	80	--
			19	81	--
			16	84	--
21.16 ± 3.65	72.0 ± 3.63	6.83 ± 3.54	27.6 ± 8.6	72.3 ± 8.6	0.1 ± 0.3

$$\bar{X} = 7.38, \text{ g l } 2, p < 0.025$$

n = 6 ratas testigo y 10 ratas desnutridas
 Mitosis analizadas = 600 y 860 respectivamente

CUADRO 18.

PORCENTAJE DE MITOSIS EN PRIMERO, SEGUNDO Y TERCER CICLO
In vitro EN RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS
 CON 40 HORAS DE INCORPORACION DE BrdU

<u>Ciclo de Duplicación</u>					
<u>Ratas Testigo</u>			<u>Ratas Desnutridas</u>		
<u>1o.</u>	<u>2o.</u>	<u>3o.</u>	<u>1o.</u>	<u>2o.</u>	<u>3o.</u>
32	64	4	82	18	—
27	59	14	67	33	—
25	43	32	60	40	—
25	37	38	55	45	—
14	56	30	41	59	—
13	23	64	38	62	—
10	66	24	30	70	—
20.8 ± 7.7	49.7 ±14.7	29.4 ±17.7	53.3 ±18.2	46.7 ±18.2	

$$\chi^2 = 43.75, \text{ g l } 2, \text{ p } < 0.001$$

n = 7 en cada grupo

Mitosis analizadas = 700 en las ratas testigo y 608 en las desnutridas.

ratas desnutridas. En el caso de las metafases que han pasado tres ciclos de duplicación el porcentaje promedio fue de 29.4 ± 17.7 para las células de las ratas testigo y en las ratas desnutridas no se observaron mitosis de este ciclo. Se compararon estos porcentajes y se obtuvo un valor de $X^2 = 43.75$, gl 2, $p < 0.001$, que refleja diferencia altamente significativa entre los porcentajes obtenidos en los dos grupos de organismos. Al determinar el TPG, se obtuvieron los siguientes valores 19.4 ± 2.1 hrs para las células de los organismos bien nutridos y 27.7 ± 3.6 hrs para el grupo desnutrido.

Con los TPG de cada uno de los tiempos analizados se obtuvo un promedio general para los dos grupos (Cuadro 19). Se tiene un promedio de 17.5 ± 1.6 hrs para las células de las ratas del grupo testigo y 21.0 ± 3.4 hrs en el caso de las células de las ratas desnutridas, al compararlos se obtuvo una $t = 2.08$, gl 8, $p = 0.05$ que muestra que la diferencia parece ser significativa. Sin embargo al comparar todos los valores individuales de TPG se obtuvo un valor de $t = 4.13$, gl 70, $p < 0.001$ que implica que existe diferencia significativa entre ambos grupos de ratas.

En general se observa que en la proliferación in vitro el porcentaje de mitosis que sólo han pasado por un ciclo de duplicación es en todos los tiempos, mayor en las células de las ratas desnutridas. Y en relación con lo anterior el TPG es mayor en los organismos desnutridos. Otra consideración que resulta necesario hacer, es que el número de ratas y mitosis analizadas por tiempo fue diferentes en los dos grupos de animales esto se debe a que por razones metodológicas como son las fallas en los cultivos o en la tinción diferencial se obtuvieron muestras analizables de diferente número.

En el Cuadro 20 se muestra un resumen de promedio de mitosis en los diferentes ciclos observado en cada uno de los tiempos y también se muestra el número de ratas y mitosis que se analizaron en cada uno de ellos. En la Gráfica 5 se muestra la distribución de los porcentajes de mitosis en cada uno de los tiempos.

CUADRO 19.

TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION (TPG) In vitro EN
RATAS BIEN NUTRIDAS Y DESNUTRIDAS.

Tiempo con BrdU (hrs)	Ratas Bien Nutridas		Ratas Desnutridas	
	TPG (hrs)	± D.E.	TPG (hrs)	± D.E.
20	17.1	± 2.1	19.4	± 0.4
25	14.8	± 0.8	18.5	± 2.5
30	17.4	± 1.3	19.0	± 2.7
35	18.8	± 0.65	20.3	± 1.0
40	19.4	± 2.1	27.7	± 3.6
Promedio	17.5	± 1.6	21.0	± 3.4

$$t = 2.08, \text{ gl } 8, \quad p = 0.05$$

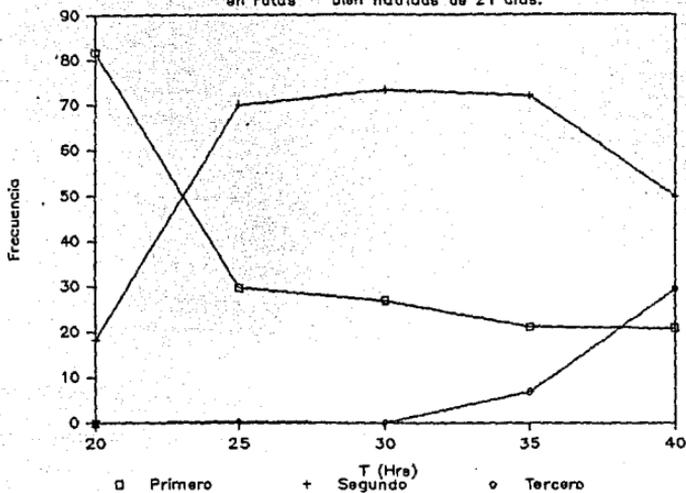
CUADRO 20.

PROLIFERACION *In vitro* DESDE LAS 20 HASTA LAS 40 HORAS
EN RATAS DESNUTRIDAS Y BIEN NUTRIDAS DE 21 DIAS DE EDAD

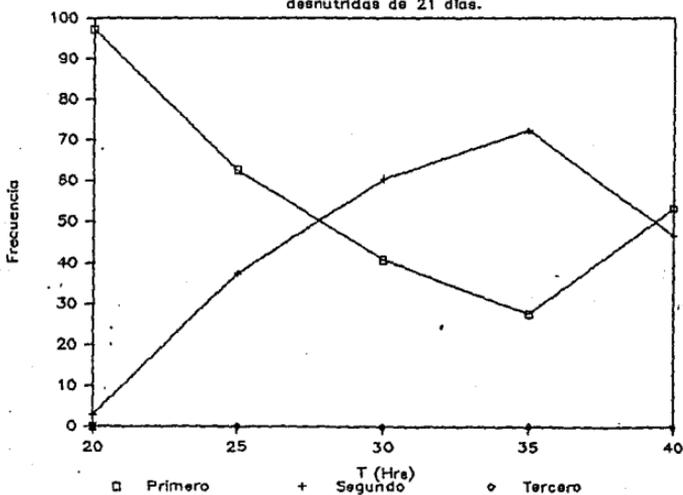
Tiempo (hrs)	N	RATAS BIEN NUTRIDAS			
		No. de mitosis analizadas	Porcentaje de Primero	Porcentaje de Segundo	Porcentaje de Tercero
20	7	700	81.7±14.2	18.3±14.2	0.0
25	6	600	29.7± 9.4	70.0± 9.2	0.2± 0.4
30	6	600	26.8±13.0	73.2±13.0	0.0
35	6	600	21.1± 3.6	72.0± 3.6	6.8± 3.5
40	7	700	20.8± 7.7	49.7±14.7	29.4±17.7

RATAS DESNUTRIDAS					
20	5	500	97.2±1.8	2.8±1.8	0.0
25	9	877	62.6±18.2	37.4±18.2	0.0
30	8	656	40.8±18.2	60.5±19.0	0.0
35	10	860	27.6±8.6	72.3±8.6	0.1±0.3
40	7	608	53.3±18.2	46.7±18.2	0.0

Gráfica 5. Proliferación in vitro
en ratas bien nutridas de 21 días.



Proliferación in vitro en ratas
desnutridas de 21 días.



10) Índice Mitótico (IM)

Se determinó el IM en cinco ratas de cada uno de los lotes por tiempo, los promedios obtenidos se muestran en el Cuadro 21. Se observó que este IM es significativamente mayor en las ratas testigo ($t = 2.5$, gl 8, $p = 0.05$). Lo que refleja una mayor respuesta de las células de este grupo a las condiciones de cultivo.

11) Frecuencia de ICH

En relación a la frecuencia de ICH in vitro (Cuadro 22) en ratas desnutridas y bien nutridas de 21 días de edad, no se observó diferencia entre ambos grupos. El número promedio de ICH/mitosis fue de 4.85 para las ratas del grupo testigo y 4.98 para las ratas desnutridas ($t = 0.22$, gl 8, $p > 0.05$). Estos valores tuvieron una amplitud desde 4.4 hasta 5.4 en el caso de los organismos bien nutridos, y desde 4.3 a 5.1 en los desnutridos. En este caso el número de ratas analizadas por tiempo fue variable, se tuvo un número mínimo de 3 ratas en el caso de las desnutridas con 40 horas de incorporación de BrdU. Así mismo se trataron de analizar 25 metafases de segundo ciclo en cada animal, pero en varias ocasiones, principalmente en las ratas desnutridas, esto no fue posible y es por esta razón que el número de mitosis analizadas fue también variable. El total de mitosis analizadas en los 4 tiempos (25, 30, 35 y 40 horas de incorporación de BrdU) fue en el caso de las ratas bien nutridas de 589 y en las ratas desnutridas de 399. Se observó que en relación al tiempo no existe diferencia significativa en los valores de ICH obtenidos. La distribución de ICH que se muestra en el Cuadro 23 y la Gráfica 6, refleja que tampoco hubo diferencia en cuanto a la distribución entre ambos lotes. Se tiene un porcentaje de metafases con cero o un ICH/mitosis de 4.4 para las ratas testigo y 1.5 para las ratas desnutridas, el porcentaje de células con más de 10 ICH/mitosis fue de 5.9 y 3.5 respectivamente. ($X = 13.4$, gl 9, $p > 0.05$)

CUADRO 21.

INDICE MITOTICO *in vitro* DE LAS 20 A LAS 40 HORAS
EN RATAS DESNUTRIDAS Y BIEN NUTRIDAS

Tiempo (hrs)	Ratas bien nutridas $\bar{x} \pm D.E$	Ratas desnutridas
20	0.88±0.13	0.40±0.2
25	1.18±0.43	0.34±0.11
30	0.82±0.22	0.18±0.08
40	0.34±0.09	0.25±0.17
	$\bar{x}=0.712$	$\bar{x}=0.286$

$$t = 2.53, \quad g l \ 8, \quad p = 0.05$$

CUADRO 22.

FRECUENCIA DE ICH *In vitro* EN RATAS BIEN NUTRIDAS
Y DESNUTRIDAS DE 21 DÍAS DE EDAD.

Tiempo (hrs)	<u>RATAS BIEN NUTRIDAS</u>			<u>RATAS DESNUTRIDAS</u>		
	No.de ratas.	No.de mitosis analizadas	Promedio de ICH/cel. ± D.E.	No.de ratas	No.de mitosis analizadas	Promedio ICH/cel. ±D.E
25	6	150	4.6 ± 1.2	4	85	5.0±0.9
30	5	125	5.4 ± 0.9	4	96	5.5±1.8
35	5	118	4.4 ± 1.4	6	148	4.3±0.4
40	8	196	5.0 ± 1.1	3	70	5.1±0.4
Totales	589			399		
Promedio	4.85 ± 1.1			4.98±0.5		

$$t = 0.22, \quad g! 8, \quad p > 0.05$$

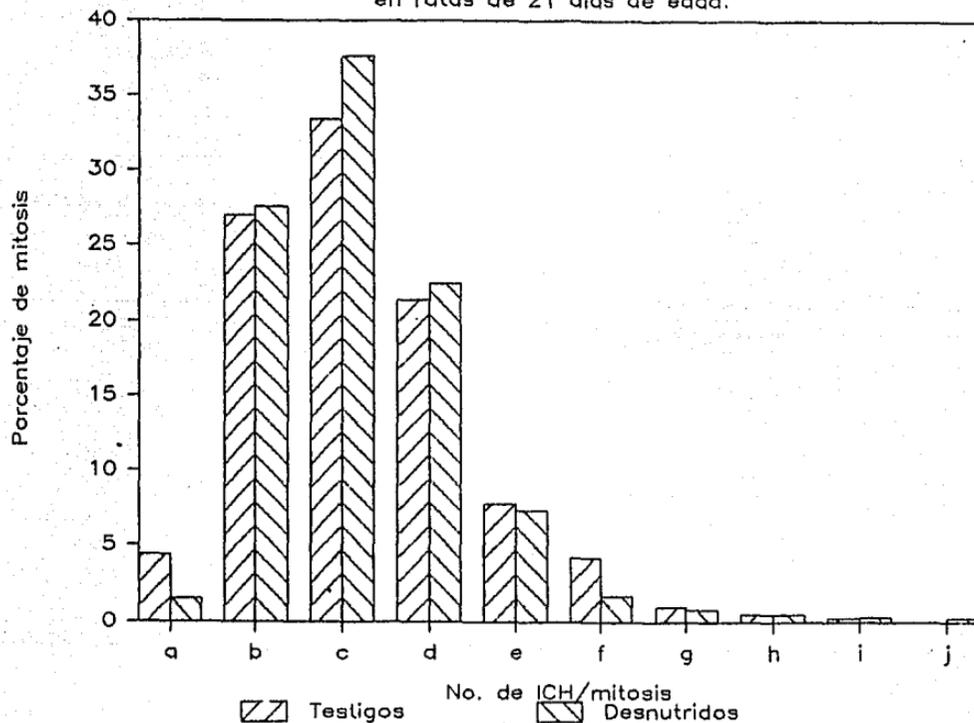
CUADRO 23.

DISTRIBUCION DE ICH/ MITOSIS *In vitro* EN RATAS
TESTIGO Y DESNUTRIDAS DE 21 DIAS DE EDAD.

Num. de ICH/mt.	<u>Ratas Testigo</u>		<u>Ratas Desnutridas</u>	
	Número	%	Número	%
0-1	26	4.4	6	1.5
2-3	159	27.0	110	27.6
4-5	197	33.4	150	37.6
6-7	126	21.4	90	22.5
8-9	46	7.8	29	7.3
10-11	25	4.2	7	1.7
12-13	6	1.0	3	0.8
14-15	3	0.5	2	0.5
16-17	1	0.2	1	0.3
18-19			1	0.2

$$\chi^2 = 13.94, g l 9, p > 0.05$$

Gráfica 6. Distribución de ICH in vitro
 en ratas de 21 días de edad.



V D I S C U S I O N

A) DESNUTRICION

El estudiar los efectos de la desnutrición en animales experimentalmente expuestos a ella, da la ventaja de poder controlar algunas de las variables que acompañan a la desnutrición en humanos como son las infecciones que incluso en algunos casos no se manifiestan y el evitar la ingestión de medicamentos, ambos factores se considera que pueden alterar los resultados y en este caso el controlarlos nos acerca a los efectos causados en sí por la desnutrición.

B) ESTUDIO IN VIVO A LOS 21 DIAS DE EDADPeso corporal.-

Los datos en relación al aumento en peso corporal de las ratas desde su nacimiento hasta los 21 días de edad, muestran que al día siguiente a su nacimiento, no hay diferencia entre las ratas del grupo testigo y las del lote experimental. Las ratas sometidas a la desnutrición experimental por deficiente cantidad de alimento muestran rápidamente un retraso del incremento en el peso corporal, se observa que ya a los 5 días tienen una diferencia de aproximadamente del 40 %, esta diferencia llega a ser de alrededor del 50 % en las ratas a los 21 días. Lo anterior indica desnutrición severa, ya que se ha establecido que una diferencia mayor del 40 % en peso es el indicador más claro de que estos animales presentan DCP. Los datos obtenidos de los pesos corporales implican que el método empleado para producir desnutrición experimental propuesto primeramente por Widdowson y McCance en 1960, es efectivo, se logra obtener DCP en una de las etapas más importantes de los organismos, en la cual presentan un crecimiento y desarrollo más rápidos por lo que son más susceptibles a las agresiones del medio externo. Con relación a otros métodos empleados para inducir desnutrición en etapas tempranas como son: el separar a las crías de la madre que las amamanta durante varias horas cada día tal como es la propuesta de Slob *et al* en 1973, o inutilizar algunas glándulas mamarias de la madre como lo propusieron Galler y Turkewitz en 1977, y Codo y Carlini en 1979, el método de incrementar el número de crías por camada se considera que resulta menos drástico y causa menores

alteraciones emocionales a crías y madres, aunque esto no puede ser descartado del todo, ya que se pueden presentar alteraciones en otros aspectos como el cuidado materno. Fleischer y Turkewitz en 1980 propusieron que se debe analizar el comportamiento de las madres de crías desnutridas, ya que éste puede interactuar con los efectos producidos por la privación nutricional en sí misma.

Concentración de proteínas séricas

Además del peso corporal, otro indicador de desnutrición son los valores bajos de proteínas presentes en el suero de organismos con DCP, esto fue ya demostrado desde hace tiempo según lo reportaron Waterlow et al en 1960. Los resultados en cuanto a la concentración de proteínas séricas en las ratas desnutridas de 21 días de edad confirman lo anterior y son un parámetro de apoyo para considerarlas como organismos severamente desnutridos, dado que la concentración es significativamente menor en las ratas con DCP, la albúmina es la proteína que fundamentalmente da esta diferencia. También han sido observadas por otros autores alteraciones en los niveles de inmunoglobulinas séricas, como son los trabajos de Chandra en 1975 que observó niveles bajos de IgG, lo que puede estar relacionado con las infecciones bacterianas frecuentes en los desnutridos, Reddy et al en 1976 determinaron que la concentración de IgA se encuentra disminuida, lo que facilita la gran incidencia y severidad de infecciones en niños con DCP, McMurray et al en 1981 definieron cambios en la concentración de IgG e IgM en relación al estado nutricional y Rose et al en 1983 observaron alteraciones en la síntesis de IgE.

Proliferación celular.-

Los datos obtenidos in vivo, en ratas desnutridas de 21 días muestran claramente un retraso en la proliferación en células de médula ósea de las ratas desnutridas. Esto se hace muy evidente al observar el porcentaje de células que han pasado por dos ciclos de duplicación en un lapso de 18 horas, el cual fue de 55% en las ratas testigo y de 14% en las ratas desnutridas. Los porcentajes obtenidos en las ratas bien nutridas se asemejan a los de Schneider et al (1977) quienes al estudiar la proliferación de las células de la médula ósea de rata in vivo mediante infusión continua de BrdU, reportaron que después de

incorporarla durante 18 horas se obtuvieron más del 50% de metafases en el segundo ciclo de duplicación. En este caso los autores determinaron la duración del ciclo en promedio alrededor de 9 horas. Otra consideración importante que se comentó en este estudio es que a pesar de la naturaleza heterogénea de las células de la médula ósea, dos aspectos sugieren una homogeneidad relativa en cuanto a sus tiempos de duplicación, estos aspectos son: la alta frecuencia de metafases en segundo ciclo de duplicación con 18 horas de incorporación de BrdU y la ausencia relativa de células en primer ciclo en este tiempo. No se puede descartar la presencia de poblaciones celulares que se duplican muy lentamente, pero se consideró que estas células representan un bajo porcentaje y/o tienen un ciclo de duplicación extremadamente largo.

El bajo porcentaje de metafases en segundo ciclo observado en el presente estudio en células de las ratas desnutridas, dió un TPC mayor en ellas demostrando con esto que en este tejido la desnutrición produce alteraciones en la velocidad de proliferación celular por alargar la duración general del ciclo.

Estos resultados en relación con el alargamiento del ciclo celular en los organismos desnutridos, están de acuerdo con los obtenidos previamente por otros autores como Deo et al en 1970 quienes mediante la incorporación de precursores radiactivos determinaron un alargamiento en la duración del ciclo celular en diversos tejidos de ratas desnutridas.

En relación con las fases del ciclo que se encuentran alteradas, se ha propuesto, mediante estudios con timidina tritiada, que la fase S es la que se encuentra afectada principalmente ya que, en esta etapa, los requerimientos de energía y proteínas son muy altos. Bansal-Rajbanshi y Mathur en 1985 encontraron, en células germinales, que ni la duración total del ciclo ni la de la fase G2 se alteran, es más corta la fase G1 y se observa un marcado aumento en la fase de síntesis del ADN. En este caso los autores propusieron que la duración total del ciclo o de otras fases del mismo pueden aparecer sin alterarse pero que en todos los casos, la duración de la fase S se encuentra afectada proponen además, que esto puede representar una adaptación para compensar la disminución en la velocidad de síntesis de ADN, la cual debe concluir antes de iniciarse la división celular.

Con la metodología de tinción diferencial de cromátidas hermanas por incorporación de BrdU para el análisis de la proliferación celular en organismos con desnutrición severa,

Murthy et al en 1982 determinaron un aumento en el ciclo celular en linfocitos de niños con DCP. sus datos mostraron que en las células de los niños con desnutrición, el pico de metafases en segundo ciclo fue bajo y el número de metafases en tercer ciclo fue aún menor en estos cultivos. También en este trabajo se comenta que no existió gran variación entre los cultivos de diferentes niños desnutridos en relación a la distribución de metafases en primero, segundo o tercer ciclo de duplicación, por lo cual se propuso que el aumento en la duración del ciclo celular es un fenómeno presente no solo en algunos pacientes sino es una característica observada en todos los desnutridos estudiados.

Los resultados del presente estudio apoyan la idea de que el retraso en la proliferación celular es una característica general en los organismos con DCP, en este estudio en las siete ratas desnutridas estudiadas in vivo, en todas se observó retraso en la proliferación. En el caso de los linfocitos este alargamiento en el ciclo de duplicación puede estar relacionado con la reducida respuesta que tienen estos durante la desnutrición. Gorodezky et al en 1985 determinaron la síntesis de ADN y ARN mediante la incorporación de precursores radiactivos en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina y observaron que en el caso de las células de los desnutridos la respuesta al mitógeno fue pobre, se observaron índices de transformación significativamente menores.

También se ha observado una disminución en el número de linfocitos T del tipo de las células T ayudadoras en DCP, según lo reportó Chandra en 1983. Por otra parte, Ogawa et al en 1985, definieron que los efectos más graves se dan sobre la médula ósea en donde el número de células nucleadas disminuye significativamente en ratas con DCP, lo cual refleja una inhibición de la hematopoyesis.

Otro punto interesante es que, al comparar el índice mitótico (IM) promedio de ambos lotes, este es más alto en las ratas desnutridas; una posible explicación para lo anterior es que la fase de división (mitosis) dure más tiempo en las células desnutridas y al poner una hora de colchicina se encuentran más mitosis en estas ratas. Lo anterior ya fue sugerido por Deo et al en 1975 quienes al estudiar la regeneración celular en ratas desnutridas parcialmente hepatectomizadas obtuvieron un valor de IM mayor al observado en las ratas testigo y propusieron que los hepatocitos en la desnutrición permanecen en mitosis por un tiempo más largo.

Intercambios entre Cromátidas Hermanas

La frecuencia de ICH in vivo observada en las ratas desnutridas de 21 días de edad, es mayor a la observada en las ratas testigo. Esta diferencia se hace más evidente al analizar la distribución de ICH en donde el número de mitosis con valores mayores de ICH corresponde a las desnutridas, en el único caso en donde no existe diferencia entre ambos lotes es en el porcentaje de mitosis con 2 y 3 ICH/mitosis.

Acerca de la frecuencia de ICH en organismos desnutridos existen en la literatura varios artículos: Mutchnick et al en 1979 reportaron que no existe diferencia en la frecuencia de ICH/mitosis en los linfocitos de niños con DCP, obtuvieron valores de 7.6 en los testigos y 6.7 en los desnutridos. Por otro lado Murthy et al en 1980 reportaron en linfocitos de niños con DCP una mayor frecuencia de ICH por célula, con valores de 5.9 ICH/mitosis en los testigos y 9.0 en los desnutridos. En ellos se discutió la posibilidad de que algunos factores ambientales como las infecciones pudieran contribuir a la mayor frecuencia de ICH observada en los niños con DCP.

En relación a los estudios efectuados con animales experimentales, en los cuales las condiciones ambientales en las que se produce la DCP pueden ser mejor controladas, se encuentran los reportes de Murthy y Srikantia en 1981 quienes reportaron que los ratones sometidos a desnutrición después del periodo de lactancia, mediante una dieta baja en proteínas durante 10 semanas, tenían una frecuencia mayor de ICH por célula a la de ratones alimentados con una dieta adecuada. En este caso el estudio se realizó en células de la médula ósea y se obtuvo en los testigos un valor de 3.3 ICH con dieta de 22% de proteína, y en los desnutridos con una dieta de 6% de proteína, obtuvieron un valor de 4.88 ICH/mitosis. En este trabajo al usar diferentes dietas también se determinó que la deficiencia en proteínas está relacionada con un mayor incremento en la frecuencia de ICH. Chen y Lin en 1986 reportaron la frecuencia de ICH en células de la médula ósea de ratas sometidas a dietas deficientes principalmente en los aminoácidos lisina y triptofano, observaron que la frecuencia de ICH/mitosis es mayor en las células de las ratas con dieta deficiente que la observada en los testigos, obtuvieron valores de 10.27 y 4.78 respectivamente. En el mismo trabajo también se determinó la frecuencia de ICH en ambos grupos de ratas cuando se administraba ciclofosfamida que es un agente alquilante que induce ICH (De Ratt, 1977), sus datos mostraron que las células de las ratas con dieta deficiente son más

susceptibles a la inducción de ICH por este agente, por lo que propusieron que en estas ratas la capacidad de reparar lesiones cromosómicas es menos eficiente que en los organismos con dieta adecuada.

Los resultados del presente estudio en cuanto a una mayor frecuencia de ICH en organismos desnutridos concuerdan con los obtenidos en tres de los cuatro trabajos mencionados, tienen discrepancia con el trabajo de Mutchinick et al quienes no observaron diferencia en los niños desnutridos. Los resultados del estudio de la frecuencia de ICH in vivo son comparables y concuerdan con los de Murthy y Srikantia quienes en 1981 observaron, en otra especie (ratón) sometida a desnutrición en etapa adulta un aumento en la frecuencia de ICH, en este caso su valor basal (3.31 ± 0.25) es más alto al observado por nosotros (2.5 ± 0.64), en relación a la desnutrición en ambos casos se obtiene un aumento promedio de un ICH/mitosis. Desafortunadamente Murthy y Srikantia no muestran la distribución de los ICH en los diferentes grupos, observación que también resultaría interesante comparar.

El mecanismo por el cual en la DCP se observa una mayor frecuencia de ICH es desconocido y a este respecto se pueden hacer varias consideraciones:

En la DCP la síntesis de ADN se encuentra disminuida, esto puede relacionarse con alteraciones en la duplicación del mismo, por lo que consideramos que la mayor frecuencia de ICH observada en el presente estudio puede estar relacionada con alguna alteración en la duplicación de ADN más que con una deficiencia en la reparación de este. Esto está fundamentado en parte por los resultados de Murthy y Bhaskaram en 1981, quienes demostraron que los linfocitos de niños con DCP son eficientes en el mecanismo de reparación por escisión postduplicación representado por la síntesis del ADN fuera del período S. Aunque la mayor inducción de ICH por agentes alquilantes observado por Chen y Lin en 1986 en ratas sometidas a desnutrición, apoya la idea de alteraciones en la reparación del ADN. Se hacen necesarios más estudios para determinar si realmente las células de los organismos desnutridos son eficientes en los mecanismos de reparación. Estudios que posiblemente darían más información en este aspecto pueden llevarse a cabo utilizando cafeína, que es un agente que inhibe la reparación post-duplicación.

Esta frecuencia alta de ICH puede estar relacionada con el alargamiento en el ciclo celular. Algunos autores como Craig-Holmes y Shaw en 1976, y Miura et al en 1983, se han inclinado a

pensar que un alargamiento en el ciclo celular es la causa fundamental de una mayor frecuencia de ICH. Morimoto en 1984 determinó que existe una relación entre el incremento en la frecuencia de ICH y el alargamiento del ciclo celular, observó que las células más dañadas tienen un ciclo celular más largo. En cambio Giulotto et al en 1980 propusieron que la frecuencia de ICH es independiente de las propiedades de proliferación de los linfocitos, como son la duración del ciclo celular, la respuesta rápida o tardía al mitógeno y el número de divisiones celulares. También Chen et al en 1981 al estudiar la inducción de ICH y el retraso en la proliferación celular producida por pesticidas, determinaron que no hay necesariamente una correlación entre el alargamiento del ciclo celular y la mayor inducción de ICH.

Podría suponerse que una mayor incorporación de BrdU en las células de las ratas desnutridas, es la causa del incremento en la frecuencia de ICH en ellas ya que, como ha sido sugerido por varios autores entre ellos Suzuki y Yosida, en 1983, el contenido de BrdU incorporado está relacionado con la frecuencia de ICH. Esta posibilidad fue descartada al utilizar la dosis mínima de BrdU para obtener una buena tinción diferencial de cromátidas hermanas. Esto es, si usamos una dosis menor de un mg/g de peso corporal no se obtiene tinción diferencial. Los estudios que dan un resultado preciso acerca de la cantidad de BrdU que se ha incorporado, pueden llevarse a cabo utilizando anticuerpos en contra de BrdU incorporada en el ADN de la forma propuesta por Gratzer en 1982 y Dean et al en 1984, además Bodell y Rasmussen en 1984 propusieron otro método para determinar los niveles de BrdU incorporado al ADN, basado en marcaje posterior a la incorporación del análogo con fósforo 32 y separación de los nucleótidos por cromatografía líquida de alta afinidad. También debe tomarse en cuenta que Davidson et al en 1980, han sugerido que la BrdU que no se incorpora al ADN puede influir en la frecuencia de ICH ya que las pozas metabólicas de nucleótidos se alteran. El hecho de que la BrdU en sí sea capaz de inducir ICH ha sido claramente definida por varios autores.

La mejor forma para tratar de disminuir el problema de los efectos de la BrdU ya sea que se encuentre incorporada al ADN o que se encuentre en el medio, es emplear la dosis mínima de BrdU para obtener tinción diferencial.

La mayor frecuencia de ICH representa, de alguna manera, un daño al ADN en las células de la médula ósea de las ratas desnutridas. Este daño puede estar relacionado según se ha propuesto con dos formas diferentes de inducción de ICH, una

relacionada con la duplicación y otra relacionada con la reparación del ADN. El mecanismo por el cual se producen estos ICH y el significado biológico de ellos es un aspecto que falta por determinar. Además está por determinarse la relación precisa que existe entre el alargamiento del ciclo y el aumento en la frecuencia de ICH. En el caso de los desnutridos puede suponerse que un mayor tiempo en duplicar el ADN los hace más susceptibles a formar ICH. Pero por otro lado también puede suponerse que el tiempo requerido para reparación de algún, daño provoque que la fase de síntesis dure más tiempo y la deficiencia en proteínas pueda también de alguna forma provocar una reparación deficiente.

Tice et al en 1984 al resumir las conclusiones del Simposio Internacional sobre ICH consideraron que:

- a) En la actualidad los ICH son considerados como un sistema adecuado para evaluar daño sobre el ADN.
- b) La inducción de ICH es una manifestación de daño al ADN y pueden ser usados para identificar agentes genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos.
- c) Los ICH pueden estar correlacionados con mutaciones, transformación celular y cáncer, pero la relación no es constante y depende del tipo de lesiones inducidas por un agente específico.

En los informes previos acerca de las aberraciones cromosómicas en organismos con DCP, algunos autores encuentran mayor frecuencia de aberraciones (Betancourt et al, 1974) y otros no obtienen incremento en la frecuencia de ellas (Thorburn et al, 1972). Rabello-Gay et al en 1985, determinaron en ratas desnutridas de 7 y 12 semanas de edad, una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por ciclofosfamida. Aportan una evidencia más a favor de que en la DCP se incrementan las aberraciones cromosómicas. Ya que, con algunos agentes sucede lo anterior pero no se incrementa la frecuencia de ICH, se ha propuesto que aunque el análisis de ICH es un método más sensible se deben efectuar otros estudios para evaluar daño citogenético, así: Ostrosky-Wegman et al en 1986 enfatizaron la necesidad de evaluar aberraciones cromosómicas y frecuencia de ICH en estudios de efecto de genotóxicos.

C) RECUPERACION NUTRICIONAL

ESTUDIO IN VIVO A LOS 42 DIAS DE EDAD

Varios trabajos que se han realizado acerca de los efectos de la DCP se han dirigido a tratar de contestar la pregunta de si la desnutrición tiene efectos reversibles cuando los organismos se recuperan de dicha enfermedad.

Peso Corporal

En relación al incremento en el peso corporal observado en las ratas de los 21 a los 41 días de edad, se observó que las ratas en recuperación de la desnutrición tienen un aumento en peso semejante al de las ratas bien nutridas, sin embargo, por la diferencia en peso (alrededor del 50% menos), que presentan al día del destete, no alcanzan el peso esperado para su edad. En relación a lo anterior, la diferencia en peso va disminuyendo desde un 52% a los 21 días hasta un 21% a los 41 días de edad, esto refleja recuperación nutricional. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Winick y Noble (1966), quienes observaron que los animales desnutridos durante la lactancia no recuperan el peso normal después de un tratamiento de recuperación aún a los 133 días de edad. En humanos esto también se ha observado. Lechtig en 1985 fundamentó que los niños desnutridos tienen altas probabilidades de retraso en el crecimiento físico a largo plazo, desarrollo mental subóptimo y muerte temprana. Cravioto y Arrieta en 1986 puntualizaron que los niños que han sufrido DCP en edades tempranas y se recuperan de ella, no llegan a alcanzar máximos de potencialidad genética del crecimiento y desarrollo como son la talla, peso y aptitudes psicomotoras o bien, según mostró Cravioto en 1978 las alcanzan mucho después de lo esperado para su edad.

Proteínas Séricas

Los datos obtenidos después de 21 días de recuperación nutricional muestran que las ratas desnutridas alcanzan los niveles de proteínas séricas que presentan las ratas bien nutridas e, incluso, los rebasan con diferencia significativa a su favor, lo que indica que se da una recuperación de la DCP.

Estos datos concuerdan con los de otros autores como Watson et al en 1985, quienes han demostrado que los niveles bajos de proteínas séricas se elevan hasta la normalidad o "casi" en niños recuperados de desnutrición, en este caso ellos evaluaron los niveles de inmunoglobulinas séricas, principalmente Ig A.

Proliferación Celular

La proliferación celular en las ratas de 42 días de edad que fueron desnutridas durante la lactancia y posteriormente se alimentaron adecuadamente durante un tiempo igual en duración al de la lactancia, comparadas con ratas de la misma edad alimentadas adecuadamente desde su nacimiento, mostró una cinética de proliferación semejante entre sí. En los resultados del análisis de la proliferación celular se observó que los TFG son similares en ambos lotes de animales. En la comparación de los porcentajes se muestra, incluso, una diferencia a favor de las ratas en recuperación nutricional. Estos datos indican que, a nivel de la proliferación in vivo, las células de la médula ósea son capaces de recuperar su velocidad de proliferación. Esto debe estar relacionado con la alta velocidad de recambio en la médula ósea, que permite que las células sean renovadas constantemente y por esto la velocidad de proliferación puede reestablecerse adecuadamente.

Frecuencia de ICH

En cuanto a la frecuencia de ICH se determinó que en las ratas en recuperación nutricional la frecuencia de ICH regresa al valor basal semejante al observado en el grupo testigo.

Murthy et al en 1982, determinaron que la recuperación nutricional se relaciona con una disminución en el número de ICH en linfocitos de niños desnutridos, pero no regresan a los niveles observados en los testigos.

En relación con la recuperación nutricional se han realizado algunos estudios con ratas a las que se les indujo desnutrición durante la lactancia, momento crítico en el desarrollo de los organismos, y un periodo de recuperación nutricional entre una y siete semanas de duración. Así, Perreta et al en 1981 reportaron que se restablece tanto la síntesis de ARN como los procesos de transcripción. Rossi et al 1983 observaron que las enzimas

páncreaticas se recuperan, pero el peso del páncreas y el peso corporal no lo hacen. Majumdar en 1986 determinó el crecimiento de los tejidos gastrointestinales y el contenido de pepsinógeno; estos se restablecen, aunque la actividad de la lactasa permanece baja. Maes *et al* en 1984 también demostraron que los niveles de somatomedina-C, el cual es un factor de crecimiento importante en la regulación del ciclo, revierten a valores normales después de un período de recuperación.

Diversos estudios han mostrado que en órganos de alto recambio celular como la médula ósea, y el intestino o glándulas como el hígado y el páncreas, se puede lograr un alto grado de recuperación nutricional en organismos que han padecido DCP. Lo anterior refleja que en estos tejidos los efectos causados por esta enfermedad pueden ser revertidos parcial o totalmente.

Recientemente se ha demostrado que la médula ósea es un tejido muy sensible a agentes externos e internos, en particular al daño citotóxico y/o genotóxico. Además tiene gran importancia biológica y una alta velocidad de recambio celular. Su alta velocidad mitótica y su facilidad de manejo técnico hacen de la médula ósea un buen sistema para estudios citogenéticos in vivo como lo señalaron Tice e Ivett en 1985.

D) ESTUDIO IN VITRO A LOS 21 DIAS DE EDAD

Proliferación Celular in vitro

El estudio in vitro da la ventaja de poder analizar con las células de una misma rata al menos dos tiempos diferentes de proliferación y además la cantidad de BrdU requerida para obtener tinción diferencial es mucho menor. Además se tiene control del ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, oxígeno y dióxido de carbono) (Freshney, 1983). Aunque se debe tomar en cuenta que el suero utilizado para suplementar el medio es altamente variable debido a que contiene elementos no definidos tales como hormonas y otras sustancias reguladoras, y además se debe considerar que las condiciones de cultivo son diferentes a las condiciones in vivo y por ello el comportamiento celular puede ser diferente.

Los resultados relacionados con la proliferación in vitro de células de ratas desnutridas de 21 días de edad, mostraron que existe diferencia en la proliferación de las células de las ratas testigo.

En este caso, el análisis cada 5 horas mostró que, después de 20 horas de incorporación de BrdU, el porcentaje de células que han pasado solamente por un ciclo de duplicación es mayor en las ratas desnutridas y que, con el tiempo, el porcentaje disminuye más lentamente en relación con lo observado en el grupo testigo y relacionado con esto, el porcentaje de células que han pasado dos ciclos de duplicación aumenta en menor proporción. Una observación importante es que, en el caso de las células de las ratas desnutridas, no aparecen metafases de tercer ciclo ni a las 40 horas de incorporación de BrdU mientras que, en las células de las ratas del grupo testigo, éstas empiezan a aparecer a las 35 horas. Además, es interesante que, en el caso de las ratas desnutridas, a las 40 horas el porcentaje de mitosis en primer ciclo se incrementa notablemente; esto puede representar que aparece otra población celular en el cultivo. Crossen et al en 1986 observaron, en células de la médula ósea de humanos, que a partir de 60 y hasta las 72 horas las células en primer ciclo muestran un ligero aunque significativo aumento. Asimismo, los autores apuntaron que el significado biológico de esta característica es indeterminado, pero se puede proponer que estas metafases de primer ciclo representan una población con un ciclo de generación muy largo o bien que tienen un retraso en su entrada al ciclo, esto último también fue observado por Crossen y Morgan en 1977 para linfocitos.

En relación con otros estudios de proliferación in vitro en células de médula ósea con la metodología de tinción diferencial de cromátidas hermanas en cultivo líquido, en el cual se estimulan las series mieloides y eritroides, se han reportado tiempos de generación de 16 a 24.5 horas en los trabajos de Abe y Kakati en 1979 y Becher y Schmidt en 1982. Crossen et al en 1986, en cultivos específicos para la proliferación de la serie mieloides, obtuvieron tiempos de generación de 32 a 43 horas. Minden et al en 1983 determinaron, mediante el empleo de timidina tritiada, un TPG de 9 a 11 horas en la serie mieloides.

Los resultados del presente estudio son comparables con los obtenidos en cultivo líquido con un TPG de 17.5 horas, cercano al reportado por los autores mencionados anteriormente. Las discrepancias en relación con el estudio de Crossen et al, que obtuvieron un tiempo de generación más largo pero en el que se estimula sólo la serie mieloides, parece indicar que en el cultivo líquido, se estimula principalmente la serie eritroide. Para comprobar lo anterior, son necesarios estudios en los que se estimule, específicamente, un tipo celular, con el fin de determinar la tasa de proliferación de cada uno.

Para determinar el TPG mediante la incorporación de BrdU, se han propuesto diversas metodologías. En este estudio se calculó de acuerdo con lo propuesto por Ivett y Tice en 1982.

Trent et al en 1986 discutieron que una medida segura del TPG es el intervalo entre la aparición de metafases de segunda y tercera división a nivel del 50%. En este estudio, para el caso de las ratas testigo, se puede hacer esto utilizando análisis de regresión de la curva, para extrapolar el número de metafases al 50% ya que no alcanzaron a llegar a este punto, de esta manera, el TPG determinado es aproximadamente de 18.5 horas, el cuál se asemeja al obtenido empleando la forma propuesta por Ivett y Tice que fue la utilizada en el presente estudio. Lo anterior apoya que mediante el empleo de cualquiera de estos métodos se obtiene un TPG similar. En el caso de las células de las ratas desnutridas no se pueden comparar ambos métodos, ya que no aparecen metafases de tercer ciclo aún a las 40 horas de cultivo.

El retraso en la proliferación expresado como un TPG más largo en las células de las ratas desnutridas no fue tan severo in vitro como el observado in vivo, la diferencia entre ambos lotes in vivo fue de 4.3 hrs e in vitro fue de 3.5 horas, con desviaciones estandar mayores en este último sistema. Esto puede deberse a que las condiciones del cultivo posiblemente alteran el comportamiento de las células, que se han colocado en un medio diferente al que tienen en el organismo, con un aporte de nutrientes diferente y un ambiente distinto.

Ahora si se compara el TPG obtenido entre las ratas bien nutridas en ambos sistemas, se observa que éste es diferente (in vivo 11.6 e in vitro 17.5 horas), esto puede representar que en condiciones de cultivo, la proliferación celular de la médula ósea se altera de tal manera que se obtiene una proliferación más lenta.

En el caso de estudios in vitro generalmente son a muy corto plazo lo que ha llevado a algunos autores como Krishna et al en 1986 a proponer que esta condición debe considerarse en una relación in vivo/in vitro, como es en este estudio donde se pretende detectar el comportamiento de las células de ratas desnutridas en condiciones de cultivo cuando la desnutrición se produjo in vivo. Al parecer la condición in vitro logra disminuir el efecto que la desnutrición causa en las células de la médula ósea in vivo.

Frecuencia de ICH in vitro

La frecuencia de ICH fue similar en las ratas desnutridas y bien nutridas, por lo que puede proponerse que algunos factores de las condiciones de cultivo influyen en ella y de esta forma se pierde la diferencia en la frecuencia de ICH observada in vivo.

Existen reportes que indican que el daño causado que implica una mayor frecuencia de ICH en células de la médula ósea por diversos agentes es capaz de eliminarse o bien se considera como una lesión no persistente. Kram et al en 1981 concluyeron que el daño causado por la mitomicina C en médula ósea de ratón, se elimina en un ciclo de duplicación subsecuente. Charles et al en 1983 determinaron que el daño causado por la ciclofosfamida en el mismo tipo celular, se elimina también después de un ciclo de duplicación.

Resultaría interesante determinar la frecuencia espontánea de ICH en condiciones de cultivo, así como el número de ICH formados en cada uno de los ciclos de duplicación, para lo anterior se podría emplear la metodología de tinción diferencial de cromátidas en tres tonos de la forma propuesta por Morales-Ramírez et al en 1987.

Con base en lo anterior podemos proponer que el daño causado por la desnutrición es capaz de revertirse cuando implican lesión no persistente y/o las condiciones de cultivo de alguna manera enmascaran la posible diferencia entre las células de las ratas desnutridas y bien nutridas.

La frecuencia basal del número ICH por mitosis para las ratas testigo, observada en cultivo fue significativamente mayor (4.85) a la observada en las células de las ratas bien nutridas en los estudios in vivo, la cual fue de 2.5 para las ratas de 21 días y de 2.2 para las ratas de 42 días de edad. En general se ha observado que las frecuencias basales de ICH in vitro son mayores a las observadas in vivo (Kram et al 1979). Otro aspecto que resulta de interés al analizar las frecuencias de ICH in vitro es que las condiciones del medio pueden inducir la formación de éstos y modificar su frecuencia. Así Kato y Sandberg en 1977 encontraron modificaciones de acuerdo con el lote de suero usado y Morgan y Crossen en 1981 determinaron modificaciones en relación al tipo de medio empleado.

V I C O N S I D E R A C I O N E S F I N A L E S

En el estudio *in vivo* se observó que la desnutrición durante la lactancia afecta severamente la proliferación celular al ocasionar un alargamiento en la duración total del ciclo de duplicación celular. Esto puede producir alteraciones en el funcionamiento adecuado de los organismos, por ser la médula ósea el sitio principal de la hematopoyesis. Así mismo el estudio *in vitro* también mostró que la proliferación celular es más lenta en las células de la médula ósea de las ratas desnutridas durante la lactancia aun en condiciones óptimas de cultivo

En las ratas desnutridas durante la lactancia, la frecuencia de ICH *in vivo* fue significativamente mayor a la observada en las ratas bien nutridas. Esto parece reflejar que en los organismos desnutridos la duplicación y/o reparación del ADN se encuentran alteradas. Determinar el significado biológico así como el mecanismo por el cual se forman los ICH es de gran interés para interpretar este incremento en la frecuencia de ICH observado en las ratas desnutridas. Por otro lado la frecuencia de ICH observada *in vitro* fue similar en las ratas con DCP y en las bien nutridas, esto puede deberse a que las condiciones de cultivo enmascararon la diferencia observada *in vivo*, o bien en las condiciones óptimas de cultivo se eliminan las posibles fallas en los mecanismos de duplicación y/o reparación del ADN.

El método empleado para inducir desnutrición experimental fue efectivo, el peso corporal es un indicador muy claro de DCP. Durante la recuperación nutricional se disminuye la diferencia de peso, sin embargo las ratas desnutridas durante la lactancia no alcanzaron el peso esperado para su edad, aun después de 21 días de alimentación adecuada.

La concentración de proteínas séricas se encontró disminuida en las ratas desnutridas y se restableció después del periodo de recuperación. Por lo que son consideradas como un buen indicador del estado nutricional.

Después de un periodo de recuperación nutricional la velocidad de proliferación en las células de la médula ósea se restableció, y parece estar incluso ligeramente aumentada. La frecuencia de ICH también logró restablecerse. Ambos estudios apoyan que en los tejidos de alto recambio celular los daños causados por la DCP pueden eliminarse o al menos ser disminuidos.

B I B L I O G R A F I A

Abe, S., Kakati, S. y Sandberg, A. A. (1979) Growth rate and sister chromatid exchange (SCE) incidence of bone marrow cells in acute myeloblastic leukemia (AML), Cancer Genet. Cytogenet.. 1. 115-130

Allen, J.W. y Latt, S.A. (1976) Analysis of sister chromatid exchange formation *in vivo* in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. Nature.. 260, 449-451.

Anderson, H.C. (1983) Hydroxyurea induces sister chromatid exchanges in G2: implications for the formation of chromosomes aberrations. Hereditas.. 98. 61-64.

Armendares, S., Salamanca, F. y Frenk, S. (1971) Chromosomal abnormalities in protein calorie malnutrition. Nature.. 232,271-273.

Arrieta, R. y Cravioto, J. (1977) Desnutrición proteico-calórica en el niño. En: Nueva guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente pediátrico. (Romeo S. Rodriguez). 14. 149-182.

Arrieta, R. y Cravioto, J. (1982) Clínica de la desnutrición proteico-calórica de la infancia. (En Prensa)

Avitabile, M., Serra, I., Mathias, A.P. y Giuffrida, A.M. (1981) Effect of undernutrition on RNA synthesis in various regions of developing rat brain. Bull. Molec.Biol. Med.. 6, 31-43.

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

Baserga, R. (1981) The cell cycle. New Engl. J. Med., 304, 453-459.

Baserga, R., Waechter, D.E. Soprano, K.J. y Galanti, N., (1982) Molecular biology of cell division. Ann. New York. Acad. Sci., 397, 110-120.

Baserga, R. (1985) The biology of cell reproduction, Harvard University Press, Cambridge, 251 pp.

Baserga, R. (1986) Molecular biology of the cell cycle. Int. J. Radiat. Biol., 49, 219-226.

Becher, R. y Schmidt, C.G. (1982) Sister chromatid differentiation and cell-cycle patterns in chronic myelocytic leukemia and normal bone marrow. *Int.J.Cancer.*, 29, 617-620

Becher, R. y Sandberg, A.A. (1984) Sister chromatid exchange levels and cell cycle time in human bone marrow cells and lymphocytes. *Cancer. Genet. Cytogen.*, 11, 19-23.

Betancourt, M., De La Roca, J.M., Sáenz, M.E., Díaz, R. y Cravioto, J. (1972) Aberraciones cromosómicas en desnutrición proteico-calórica avanzada. *Bol. Méd. Hosp. Inf. (Mex.)* 29, 517-524.

Betancourt, M., De La Roca, J. M., y Cravioto, J. (1974) Ionising radiation and chromosomal aberrations in malnutrition. *Lancet.*, 2, 1322-1333.

Betancourt, M., Hernández, G. y Cravioto, J. (1979) Deficiencia de aminoácidos esenciales y producción de aberraciones cromosómicas. *Rev. Invest. Clín. (Méx.)*, 31, 45-52.

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

Bianchi, N.O. y Lezana, A. (1976) Kinetics of lymphocyte division in blood cultures studied with the BrdU-Giemsa technique. *Experientia.*, 32, 1257-1258.

Bodell, W.J. y J. Rasmussen. (1984) A 32 P postlabeling assay for determining the incorporation of bromodeoxyuridine into cellular DNA. *Anal. Biochem.*, 142, 525-528.

Bryant, E.M., Holger, H. y Martin, G.M. (1979) Normalisation of sister chromatid exchanges frequencies in Bloom's syndrome by euploid cell hybridisation. *Nature.*, 279, 795-796.

Carrano, A.V. y Thompson, L.H. (1982) Sister chromatid exchange and gene mutation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 33, 57-61.

Castilla, L., Cravioto, A. y Cravioto, J. (1979) Efectos a corto plazo de la interacción estimulación-desnutrición proteico calórica sobre el desarrollo bioquímico del sistema nervioso central. *Gac. Méd. Méx.*, 115, 225-233.

Castro, C.E., J. Armstrong-Major., y E. Ramirez. (1986) Diet mediated alteration of chromatin structure. *Fed. Proc.*, 45, 2394-2398.

Castro, C.E. y H.C. Towle. (1986) Nutrient-genome interaction. Fed. Proc., 45, 2392-2393.

Chaganti, R.S.K., Schonberg, S. y German, J. (1974) A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Blom's syndrome lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., 71, 4508-4512.

Chandra, R.K. (1975) Fetal malnutrition and postnatal immunocompetence. Am. J. Dis. Child., 129, 450-454.

Chandra, R.K. (1980) Inmunología de los trastornos Nutricionales. El Manual Moderno. Mexico, 120 pp.

Chandra, R. K. (1983) Numerical and functional deficiency in T helper cells in protein energy malnutrition. Clin.exp.Immunol., 51, 126-132.

Charles, J.L., Jacobson-Kram, D., Borzelleca, J.F. y Carchman, A. (1983) The kinetics *in vivo* sister chromatid exchange induction in mouse bone marrow cells by alkylating agents: Cyclophosphamide. Environ Mutagen., 5, 825-834.

Chen, H.H., Hsueh, J.L., Siriani, S.R. y Huang, C.C. (1981) Induction of sister chromatid-exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. Mutat.Res., 88, 307-317.

Chen, J.F. y Lin, Y.J. (1985) Improved light sources for induction of sister chromatid differentiation. Cytobios., 44, 73-87.

Chen, J.F. y Lin, Y.J. (1986) Effects of cyclophosphamide and diets on sister chromatid exchange frequency of rats. Cytologia., 51, 671-678.

Codo, W. y Carlini, E.A. (1979) Postnatal undernutrition in rats: Attempts to develop alternative methods to food deprive pups without maternal behavioral alteration. Dev.Psychobiol., 12: 475-484.

Correa, P.G. (1908) Rev.Med.Yucatán, 3. Citado por Cravioto, J. y Arrieta, R. (1982b)

Craig-Holmes, A.P. y Shaw, M.W. (1976) Effects of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. Mutat.Res., 46, 375-384.

Cravioto, J. (1962) Appraisal of the effect of malnutrition on Biochemical maturation. Am. J.Clin. Nutr. 11., 484-492.

- Cravioto, J. (1963) Application of newer knowledge of nutrition on physical and mental growth and development. Am. J. Phys. Hlth., 53, 1803-1809.
- Cravioto, J. y Robles, B. (1963) The influence of protein-calorie malnutrition on psychological test behavior. Proc. Swedish Nutrition Foundation. A Simposium on Mild-moderat Forms of Protein-calorie Malnutrition., Bastad and Gothenburgh., 115-126.
- Cravioto, J. y Robles, R. (1965) Evolution of adaptive and motor behavior during rehabilitation from Kwashiorkor. Am. J. Orthopsychiat., 35, 449-464.
- Cravioto, J., De Licardie, E.R. y Birch, H.G. (1966) Nutrition Growth and Neurointegrative Development. Suppl. Pediatrics., 38, Part 2, 319-372.
- Cravioto, J. (1967) Nutritional problems in rural areas. En: IV Health, Food and Nutrition Development in Tropical Latin American. (Turk, K.V. and L.Crowder, eds). N.Y. New York State College of Agriculture. pp : 155-176.
- Cravioto, J. (1970) Complexity of factors involved in protein calorie malnutrition. En: malnutrition is a problem of ecology, Bibl. Nutr. Diet No. 14, (Karger, Basel) pp. 7-22. New York, U.S.A.
- Cravioto, J. (1975) Malnutrition in early childhood and some of its consequences for the individual and the community. J. Can. Diet Assoc., 26, 254-277.
- Cravioto, J. y De Licarde, E.R. (1975) Ecology af malnutrition environmental variables associated with severe clinical malnutrition. En: Modern Problems in Pediat. (S.Karger ed), Basel, 14, 157-166.
- Cravioto, J., (1978) Intersensory development as function of age, stimulation and antecedents of severe malnutrition, Proceedings of Malnutrition Society of India., 22, 1 -24.
- Cravioto, J. y Arrieta, R. (1979) Stimulation and mental development of malnourished infants. Lancet., 899.
- Cravioto, J. (1980) Severe malnutrition and development of motor skills in childrens . Abstracts. Nutrition and Brain Development. Annales Nestlé., 44, 22-41.

Cravioto, J. y Arrieta, R. (1982a) Algunos problemas en la interpretación de la asociación entre desnutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje. En: Nutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje. (DIF Y UNICEF), pp 7-33

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

Cravioto, J. (1983) Mínimos de bienestar, desarrollo mental, conducta y aprendizaje. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx., 40, supl 2, 11-13.

Cravioto, J. y R. Arrieta. (1986) Nutrition, Mental Development and Learning, en Human Growth. Vol. III. (Falkner, Fl., Tanner, J.M. eds). Plenum Press. New York. pp: 501-536.

Crossen, P.E. y Morgan, W.F. (1977a) Proliferation of PHA-stimulated lymphocytes measured by combined autoradiography and sister chromatid differential staining. Exp. Cell Res., 118, 423-426.

Crossen, P.E. y Morgan, W.F. (1977b) Proliferation of PHA and PW stimulated lymphocytes measured by sister chromatid differential staining. Cell Immunol., 32, 432-436.

Crossen, P.E. y Morgan, W.F. (1981) Proliferation of PPD-stimulated lymphocytes measured by sister chromatid differential staining. Clin. Exp. Immunol., 45, 642-645.

Crossen, P.E., Durie, B.G.M. y Trent, J.M. (1986) Generation time (GT) of human bone marrow cells cultured in the CFC-gm assay. Cell. Tissue. Kinet., 19, 533-538.

Darzynkiewicz, Z. y Andreeff, M. (1981) Multiparameter flow cytometry. Part I: Application in Analysis of the cell cycle. Clin. Bull., 11, 47-57.

Davidson, R.L., Kaufman, E.R., Dougherty, G.P., Ovellete, A.M., Difioca, C.M. y S. Latt. (1980) Induction of sister chromatid exchanges by BudR is largely independent of the BudR content of DNA. Nature., 284, 74-76.

Dean, F.N., Dolbeare, F., Gratzner, H., Rice, Glenn.C. y Gray, J.W. (1984) Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdU. Cell. Tissue. Kinet., 17, 427-436.

- Deo, M.G., Mathur, J. y Ramalingaswami, V. (1967) Cell regeneration in protein deficiency, *Nature.*, 216, 499-500.
- Deo, M.G. y Ramalingaswami, V. (1970) Regulatory mechanisms of cellular proliferation in a protein-deficient organism. En: *Control Processes in multicellular organisms* (Wolstenholme, G.E.W. and Knight, J.L) pp 321-337.
- Deo, M.G., Bijlani, V. y Ramalingaswami, V. (1975) Nutrition and cellular growth and differentiation, En: *Growth and Development of the Brain* (Brazier, M.A.B ed.) . Raven Press. N.Y. pp 1-15.
- DeRatt, W.K.(1977) The induction of sister chromatid exchange by cyclophosphamide in the presence of differently induced microsomal fractions of rat liver. *Chem.Biol.Interact.*, 19, 125-131.
- DuFrain, R.J., McFee, A.F., Linkous, S. Jennings, C.J. y Lowe, K.W. (1984) *In vivo* SCE analysis using bromodeoxyuridine, iododeoxyuridine, and chlorodeoxyuridine. *Mutat. Res.*, 139, 57-60.
- Dutrillaux, B. y Fosse, A. (1976) Utilisation du BrdU dans l'étude du cycle cellulaire de sujets normaux et anormaux. *Ann.Genet.*, 19, 95-102.
- Fernández, F. S., Fernández, M. M., Marin, F.B. y Menendez, P. A. (1985) Malnutrition in utero and during lactation in the rat: Relationship of dam's weight gain and development of suckling. *Nutr.Res.*, 5, 413-421.
- Fleischer, S. y Turkewitz, G. (1980) Alterations of maternal behaviors of female rats caring for malnourished pups. *Dev. Psychobiol.*, 14, 4: 383:388.
- Fliedner, T.M. y Calvo, W. (1984) Replication and differentiation of the stem cells in relation to the microenvironment of the bone marrow. En: *Pathology of the bone marrow.* (Lenhert, K. and Klubner, K. Ed.) Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. pp. 54-73.
- Fliedner, T.M, Nothdurft, W. y Calvo, W. (1986) The development of radiation late effects to the bone marrow after single and chronic exposure. *Int.J.Radiat.Biol.*, 49, 35-46.
- Frank, S., Metcoff, J., Gómez, F., Ramos Galván, R., Cravioto, J. y Antonowicz, I. (1957) Intracellular composition and homeostatic mechanism in chronic infantile malnutrition.II. *Tissue Composition, Pediatrics.*, 20, 105-120.

Frenk,S. (1978) Dos informes tempranos acerca de la desnutrición avanzada con edemas, lesiones cutáneas y diarrea. Gaceta Med. Mex., 114, 513.

Freshney, R.I.(1983) Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R.Liss. New York. 295 pp.

Frias, S y Carnevale, C. (1983) Cell cycle in normal individuals and patients with Down, Cri-du-chat and Turner syndromes. Ann.Genet., 26, 60-62.

Galler, J.R. y Turkewitz, G. (1977) Use of partial mamectomy to produce malnutrition in the rat. Biol.Neonate., 31, 260-265.

Galler, J.R. y Zartarian, G. (1981) Reproductive performance in rats with different histories of malnutrition, Br. J. Nutr., 45, 251-255.

García-Herdugo, G., Fernández-Gómez, M.E., Hidalgo, G. y López-Saenz, J.F. (1974) Effects of protein synthesis inhibition during plant mitosis. Exptl. Cell. Res. 89, 336-332

Giménez-Martín, G., González-Fernández, A. Del campo, A. y De la Torre, C. (1982) The role of protein synthesis in cell progression through G2 and mitosis in plant multinucleate cells. Biol. Cell., 46, 161-174.

Giulotto, E., Mottura, A., Giorgi, R., de Carli, L. y Nuzzo, F. (1980) Frequencies of sister chromatid exchanges in the relation to cell kinetics in lymphocyte culture. Mutat. Res., 70, 343-350.

Glore, R. S., y Layman, K. D. (1985) Loss of tissue in female rats subjected to food restriction during lactation or during both gestation and lactation. J. Nutr., 115, 233-242.

Golub, E. (1982) In vitro approach to hemopoiesis. Cell., 28, 687-688.

Gómez, F. (1946) Desnutrición. Bol. Med. Hosp. Inf. (Mex). 3. 543.

Gómez, F., Ramos-Galván, R., y Cravioto, J. (1951) Estudios sobre el niño desnutrido. VIII. " El síndrome de recuperación nutricional ". Bol. Med. Hosp. Infantil (Mex), 5, 593-608.

Gómez, F., Cravioto, J. y Frenk, S. (1954) Studies on the undernourished child XIII. Treatment of third degree malnutrition without commercial vitamins. Am. J. Dis. Child., 87, 684-693.

Gómez, F., Ramos-Galván, R., Cravioto, J., Frenk, S., Janeway, C. y Gamble, J.L. (1957) Intracellular composition and homeostatic mechanisms in chronic infantile malnutrition I. General considerations. *Pediatrics* 20., 101-104.

Gómez, F., Ramos-Galván, R., Cravioto, J., y Frenk, S. (1958) Prevention and treatment of chronic severe malnutrition (Kwashiorkor). *Ann. New York Acad. Sci.*, 69, 969-988.

González-Fernández, A., Giménez-Martín, G., Fernández-Gómez, M.E. y De la Torre, C. (1974) Protein synthesis requirements at specific points in the interphase of meristematic cells. *Exp. Cell. Res.*, 88, 163-170

González-Torres, M.C., Villaseñor, L. y Betancourt, M. (1983) Proliferación celular de linfocitos e intercambio de cromátidas hermanas en niños desnutridos. LVII Reunión de la Asoc. Inv. Pediátrica, San Miguel de Allende, Gto. Diciembre 2 y 3. pp:49-71.

Gorodezky, C., Betancourt, M., Salazar-Mallén, M., Amezcua, M.A. y Cravioto, J. (1986) Blast Transformation in Mexican malnourished children. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 28, 217-220.

Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H. y Sugiyama, T. (1975) Simple differential giemsa staining of sister chromatids after treatment with photo-sensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma (Berl.)*, 53, 223-230.

Gratzner, H.C. y Leif, R. (1981) An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry.*, 6, 385-389.

Gratzner, H.C. (1982) Monoclonal antibody against 5-bromo y 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.*, 218, 474-475.

Gray, J.W., Bogart, E., Gavel, D., George, Y. y Moore, D.H. (1983) Rapid cell cycle analysis: II. Phase durations and dispersions from computer analysis of RC curves. *Cell Tissue Kinet.*, 16, 457-471.

Gray, J.W., F. Dolbeare, M.G. Pallavicini, W. Beisker y Waldman, F. (1986) Cell cycle analysis using flow cytometry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 49, 237-255.

Harker, G.J.S., Zbroja, R.A., Wass, J., Vincent, P. C., y Stephens, F.O. (1983) Cell cycle homogeneity in bone marrow samples from different sites: Flow cytometric evaluation of multiple samples from sheep. *Exp. Hematol.*, 11, 1037-1041.

- Hoffenberg, R. (1975) Adaptation of plasma protein synthesis and breakdown to undernutrition. Proc. 9th Int. Congr. Nutrition, Mexico 1972, 1, 22-30. (Karger, Basel 1975).
- Hoffman-Goetz, L. y Chandra, R. K. (1986) Nutrition and Immunology. Immunol.Today., 5, 86-87.
- Holman, R.T., Johnson, S.B., Mercuri, O., Itarte, H.J., Rodrigo, M.A. y De Tomas, M.E. (1981) Essential fatty acid deficiency in malnourished children, Am. J. Clin. Nutr., 34, 1534-1539.
- Howard, D. y Pelc, S.R. (1953) Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage, Heredity, London (Suppl). 6, 261-273.
- Ishii, Y. y Bender, M.A. (1980) Effects on inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in chinese hamster cells. Mutat. Res., 79, 19-32.
- Ivett, J.L. y Tice, R.R. (1981) Diethylstilbestrol-diphosphate induces chromosomal aberrations but not sister chromatid exchanges in murine bone marrow cells in vivo. Environ.Mutagen., 3, 445-452.
- Ivett, J.L. y Tice, R.R. (1982) Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. Environ.Mutagen., 4, 358 (Abstract).
- Jansen, G.R. y Hunsaker, H. (1986) Effect of dietary protein and energy synthesis during lactation in rats. J.Nutr., 116, 957-968.
- Javad, Z.M. (1978) Effects of reduced food intake on reproduction in mice. Aust. J. Biol. Sci., 31, 629-639.
- Kato, H. (1974) Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. Nature., 252, 739-741.
- Kato, H. y Sandberg, A.A. (1977) The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro, Exp. Cell. Res., 109, 445-448.
- Kato, H. (1977) Mechanism for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. Chromosoma (Berl)., 59, 179-191.
- Kato, H. (1980) Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. Cancer Genet.Cytogenet., 2, 69-77.

Khouri, F.P. y McLaren, D.S. (1973) Cytogenetic studies in protein-calorie malnutrition. *Am. J. Genet.*, 25, 465-470.

Kihlman, B.A. y Hartley, B. (1968) Effect of hydroxyurea and other inhibitors of DNA synthesis on *Vicia* chromosomes previously exposed to X-rays or radiomimetic chemicals. *Hereditas.*, 59, 439-463.

King, M.T., Wild, D., Gocke, E. y Eckhardt, K. (1982) 5-Bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis *in vivo* of sister-chromatid exchanges in bone-marrow and spermatogonial cells. *Mutat. Res.*, 97, 117-129.

Korenberg, J.R. y Freedlender, E.F. (1974) Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 48., 355-360.

Kram, D., Bynum, G.D., Senula, G.C. y Schneider, E.L. (1979) In utero sister chromatid exchange analysis for detection of transplacental mutagens. *Nature.*, 279, 531-533.

Kram, D., Bynum, G.D., Dean, R., Schneider, E.L. Farland, W.H. y Williams, J.R. (1981) Effects of acute and chronic administration of mitomycin C on the induction of sister chromatid exchanges *in vivo*. *Environ. Mutagen.*, 3, 489-495.

Krishna, G., Nath, J., y Ong, T. (1986) Comparative *In vivo* and *In vitro* sister chromatid exchange studies in chinese hamster bone marrow and spleen cells. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.*, 6, 321-330

Kuramitsu, N., Matsui, T., Yano, H. y Kawashina, R. (1985) The influence of protein and/or energy deficiency on the growth of long bone in rats. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.*, 31, 189-196.

Latt, S.A. (1973) Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 70, 3395-3399.

Latt, S.A. (1981) Sister chromatid exchange formation. *Ann.Rev.Genet.*, 15, 11-55.

Latt, S.A., R.R. Schreck, A. D'Andrea, T.N. Kaiser, A. Schlesinger, S. Lester, y K. Sakai. (1984) Detection, Significance, and Mechanism of Sister Chromatid Exchange Formation: Past Experiments, Current Concepts, Future Challenges. En: *Sister Chromatid Exchanges* (Tice, R. and A. Hollaender eds.). Plenum Press. New York. pp 11-40.

Lechting, A. (1985) Early Malnutrition, Growth, and Development. En: Nutritional Needs and Assessment of Normal Growth (Gracey, M and F. Falkner) Vevey/Raven Press. New York. pp: 185-219.

Lee, C. J., Panemangalore, M. y Wilson, K. (1986) Effect of dietary energy restriction on bone mineral content of mature rats. Nutr. Res., 6, 51-59.

Littlefield, L.G., Coyler, S.P., Sayer, A.M. y Dufrain, R.J. (1979) Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes exposed during G0 to four classes of DNA-damaging. Mutat. Res., 67, 259-269.

Lowry, O.M., Rosebrough, N.M., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-267.

Maes, M., Underwood, L.E., Gerard, G. y Ketelslegers, J.M., (1984) Relationship between plasma somatomedin-C and liver somatogenic binding sites in neonatal rats during malnutrition and after short and long term refeeding. Endocrinol., 115, 786-792.

Majumdar, A.P.N. (1986) Effects of undernutrition and subsequent nutritional rehabilitation or hidrocortisone administration on growth and function of the gastrointestinal tract in rats. Nutr. Rep. Int., 33, 187-198.

Mazrimas, J.A. y D.G. Stetka. (1978) Direct evidence for the role of incorporated BUdR in the induction of sister chromatid exchanges. Exp. Cell. Res. 117, 23-30.

McClintock, B. (1938) The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior or ring-shaped chromosomes. Genetics. 23, 315-376.

McFee, A.F., Lowe, K.W. y San Sebastian J.R. (1983) Improved sister-chromatid differentiation using paraffin-coated bromodeoxyuridine tablets in mice. Mutat. Res. 119, 83-88.

McMurray, D.N., Watson, D.R. y Reyes, M.A. (1981) Effect of renutrition on humoral and cell-mediated immunity in severely malnourished children. Am. J. Clin. Nutr., 34, 2117-2126.

Melamed, M.R. (1972) Cytology automation, Clin. Bull., 2, 136-141.

- Meselson, M. y Stahl, F.W. (1957) The replication of DNA in Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 178-189.
- Minden, J.M., Major, P., Griffin, J., Wu, A. y Kufe, D. (1983) Generation time of leukaemic blast progenitor cells, Cell Tissue Kinet., 16, 577.
- Mitchison, J.M. (1971) The Biology of the cell cycle. Cambridge University Press. Cambridge. 313 pp.
- Miura, K., Morimoto, M. y Koizumi, A. (1983) Proliferative kinetics and mitomycin C-induced chromosome damage in Fanconi's anemia lymphocytes. Human Genet., 63, 19-23.
- Morales-Ramirez, P. (1980) Analysis in vivo of sister-chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary-gland cells. Mutat. Res., 74, 61-69.
- Morales-Ramirez, P., Vallardino-Kelly, T. y Rodriguez-Reyes, R. (1984a) In vivo persistence of sister chromatid exchanges (SCE) induced by Gamma rays in mouse bone marrow cells. Environ. Mutagen. 6, 529-537
- Morales-Ramirez, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodriguez-Reyes, R. (1984b) Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxyuridine system. En: Sister Chromatid Exchanges (Tice, R.R. and Hollaender, A. eds.) Plenum Press. N.Y. pp:599-611.
- Morales-Ramirez, P., Rodriguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T. (1987) Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges in vivo by three-way differentiation, Mutat. Res., 178, 49-56.
- Morand, O., Chanez, C., Masson, M., Dumont, O., Flexor, M.A., Baumann, N. y Bourre, J.M. (1981) Intrauterine growth retardation (Malnutrition by vascular ligation) induces modifications in fatty acid composition of neurons and oligodendrocytes, J. Neurochem., 37, 1057-1060.
- Morgan, W.F. y Crossen, P.E. (1981) Factors influencing sister chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes, Mutat. Res., 81, 395-402.
- Morimoto, K. Sato, M. y Koizumi, A. (1983) Proliferative kinetics of human lymphocyte in culture measured by autoradiography and sister chromatid differential staining. Exp. Cell Res., 145, 349-356.

- Morimoto, K. (1984) Proliferative kinetics and chemical-induced sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. En: Sister Chromatid Exchanges (Tice, R. and A. Hollaender). Parte B. Plenum Press. New York. pp: 677- 693.
- Murthy, P.B., Bhaskaram, P. y Srikantia, S.G. (1980) Sister Chromatid exchanges in protein-energy malnutrition, Hum. Genet., 55, 405-406.
- Murthy, P.B. y Srikantia, S.G. (1981) SCE Frequency in malnourished mice, Metabolism., 30, 1-2.
- Murthy, P.B. y Bhaskaram, P. (1981) Unscheduled DNA synthesis in lymphocytes from malnourished children, Nutr. Rep. Int., 23, 321-325.
- Murthy, P.B., Rahuin, M.A. y Tulpule, P.G. (1982) Lymphocyte proliferation kinetics in malnourished children measured by differential chromatid staining. Br.J.Nutr.. 47, 445-450.
- Mutchinick, O., Lisker, R., Ruz, L., Salamanca, F. y Armendares, S. (1979) Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition, Ann. Genet., 22, 129-132.
- Ogawa, Y., Matsumoto, K., Kamata, E., Ikeda, Y y Kaneko, T. (1985) Effect of feed restriction on peripheral blood and bone marrow cells counts of wistar rats. Exp. Anim., 34, 407-416.
- Oikawa, A., Thoda, H., Kanai, M., Miwa, M. y Sugimura, I. (1980) Inhibitors of poli (adenosine diphosphate ribose) polymerase induce sister chromatid exchanges. Biochem. Biophys. Res. Comm., 97, 1311-1316.
- Oku (1981) Immunologic measurement of DNA synthesis rate in individual mouse L. cells. The Bulletin of the Yamaguchi Medical School, 28, 11-17.
- Ortiz, R. y Betancourt, M. (1984) Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. J. Nutr., 114, 472-476.
- Ostrosky-Wegman, P., Garcia-Montero, R., Perez -Romero, B., Alvarez- Chacón, R. y Cortinas de Nava, C. (1986) Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed in vitro and in vivo. Mutat. Res., 173, 81-87.
- Painter, R.B. (1980) A replication model for sister-chromatid exchange. Mutat. Res., 70, 337-341.

- Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 1286-1290.
- Pardee, A.B. Dubrow, R. Hamlin, J.L. y Kletzien, F. (1978) Animal cell cycle. Ann. Rev. Biochem., 47, 715-750.
- Pardee, A.B. (1986) Biochemical and molecular events regulating cell proliferation. J. Pathol., 149, 1-2.
- Pera, F. y Mattias, P. (1976) Labelling of DNA and differential sister chromatid staining after BrdU treatment "in vivo". Chromosoma., 57, 13-18.
- Peretta, M., Garrido, F. y Oliva, P., (1981) Hepatic RNA polymerase activity in protein-calorie malnutrition (PCM) in rats and the effect of re-feeding, IRCS Med. Sci., 9, 456.
- Perry, P y Wolff, S. (1974) New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature., 251, 156-158.
- Perry, P. y Evans, H.J. (1975) Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature., 258, 121-125.
- Prescott, D. M. (1976) Reproduction of eukaryotic cells. Academic Press. New York. 138 pp.
- Pringle, J.R. y Hartwell, L.H. (1981) The Saccharomyces cerevisiae cell cycle. In the Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. (J.N., Strathern, E.W, Jones, and J.R. Broach, eds). Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 97-142.
- Quastler, H. y Sherman, F.G. (1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Expl. Cell. Res., 17, 420-438.
- Rabello-Gay, M.N., de O. Carvalho, M.I., Otto, P.A. y Targa, H.J. (1985) The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophamide in mouse bone marrow. Mutat. Res., 158, 181-188.
- Ramalingaswami, V. y Deo, M.G. (1968) Experimental protein-calorie malnutrition in the rhesus monkey, En: Calorie Deficiencies and Protein Deficiencies (McCance, R.A. and Widdowson, E. M.), pp 265-274.

- Ramos Galván, R., Cravioto, J. y Navarrete, A. (1958) Letalidad en el niño desnutrido. " Análisis de 1100 casos de internados en el servicio de nutrición del Hospital Infantil de México. Durante los años de 1953 a 1957 inclusive ". Bol. Med. Hosp. Inf. (Méx.). 15, 875-923.
- Ramos-Galván, R., Pérez-Navarrete, J.L., y Cravioto, J. (1960) Algunos aspectos de crecimiento y desarrollo en el niño mexicano. Bol. Med. Hosp. Infantil (Méx.)., 17, 455-474.
- Rao, P.N. y Adlakha, R.C. (1985) Chromosome condensation and decondensation factors in the life cycle of eukaryotic cells. En Mediators in cell growth and differentiation. Ford, R.J. and Maizel A. eds. Raven Press, New York. pp. 45-69.
- Raza, A., Preisler, H., Meyers, G. y Bankert, R. (1984) Rapid enumeration of S-phase cells by means of monoclonal antibodies. New. Eng. J. Med., 310, 991-995.
- Reddy, V., Raghuramulu, N. y Bhaskaram, C. (1976) Secretoty IgA in protein-calorie malnutrition. Arch. Dis. Child., 51, 871-874
- Reedy, G.P.V. y Pardee, A.B. (1980) Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 3312-3316.
- Rose, A.H., Holt, P.G. y Turner, K.J. (1983) IgE responses of malnourished mice: immunogenic and tolerogenic effects of low grade antigenic stimulation. Clin. Immunol. Immunopathol., 18, 371-382.
- Rossi, T.M., Lee, P.C. y Lebenthal, E., (1983) Effect of feeding regimens on the functional recovery of pancreatic enzymes in postnatally malnourished weanling rats, Pediat. Res., 17, 806-809.
- Rossow, P.W., Riddle, V.G.H. y Pardee, A.B. (1979) Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 control animal growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 4446-4450.
- Ruiz-Escalona, A. (1948) Atrepsia o síndrome atrépsico. Gac. Méd. Méx., 78., 178-191.
- Russev, G.C. y Tsanev, R.G. (1973) Continuous labeling of mammalian DNA "in vivo" Anal. Biochem., 54, 115-119.
- Sadasivan, G. y Raghuram, T.C. (1973) Chromosomal aberrations in malnutrition. Lancet., 2, 574.

Sakamoto, M., Ishii, S., Nishioka, K. y Shimada, K. (1981a) Level of complement activity and components C1, C4, C2, and C3 in complement response to bacterial challenge in malnourished rats. *Infection Immunity.*, 32, 553-556.

Sakamoto, M., Ishii, S., Nishioka, K. y Shimada, K. (1981b) Incorporation of leucine-(C 14) into complement infection of rats in malnourished stages. *Am.J.Clin.Nutr.*, 34, 2127-2132.

Salas, M. (1978) Privación neonatal de alimento y desarrollo cerebral: Aspectos morfológicos, conductuales y electrofisiológicos. *Bol. Est. Med. y Biol.* 30, 111-124.

Sans, J. Gimenez-Martin, G y De la Torre, C. (1980) Onset of cell proliferation in dormant roots of *Allium cepa* L. Bulbs kinetic analysis. *Biologie Cellulaire*, 36, 95-103.

Schneider, E., J. Chaillet y Tice, R. (1977) *In vivo* BrdU labeling of mammalian chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 100, 396-401.

Schneider, E.L., Tice, R.R. y Kram, D. (1978) Bromodeoxyuridine differential chromatid staining technique: A new approach to examining sister chromatid exchange and cell replication kinetics. En: *Methods in cell biology*. Vol. XX (Prescott, D.M. ed). Acad. Press, New York. pp. 379-409.

Schneider, E.L. y B. Gilman. (1979) Sister chromatid exchanges and aging. *Hum. Genet.*, 46, 57-63.

Schoenfield, D. y Kallman, R.F. (1980) Determining the labeling index in autoradiography. *Cell Tissue Kinet.*, 13, 339-348.

Schwartzman, J.B. y Goyanes, V. (1980) A new method for identification of SCEs per cell cycle in BrdUrd-substituted chromosomes. *Cell.Biol.Int.Rep.*, 4, 415-423.

Schwartz, J.L., Banda, M.J. y Wolff, S. (1982) 12-O-Tetradecanoyl phorbol -13-acetate (TPA) induces sister-chromatid exchanges and delays in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell lines. *Mutat.Res.*, 92, 393-409.

Serra, I., A. Vanella, R. Avola, y A.M. Giuffrida. (1982) DNA Polimerase and thymidine activities in different regions of rat brain during postnatal development: Effect of Undernutrition. *Neurochem. Res.*, 7, 943-951.

Siegel, S. (1986) *Estadística no paramétrica*. Ed. Trillas. 344 pp.

Sikes, R. W., G.N. Fuller, C. Chronister, J. De France y R.C. Wiggins. (1981) The relative numbers of oligodendroglia in different brain regions of normal and postnatally undernourished rats. *Brain.Res.Bull.*, 6, 385-391.

Slob, A. K., Snow, C.E. y Natris-Mathot, E. (1973) Absence of behavioral deficits following neonatal undernutrition in the rat. *Dev.Psychobiol.*, 6, 177-186.

Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. (1981) *Métodos estadísticos*. Compania editorial continental. 703 pp.

Stetka, D.G. y Wolff, S. (1976) Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. in vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat.Res.*, 41, 343-350.

Suzuki, H. y T.H. Yoshida. (1983) Frequency of sister chromatid exchanges depending on the amount of 5-bromodeoxyuridine incorporated into parental DNA. *Mutat.Res.*, 11, 277-282.

Takehisa, S. (1982) Induction of sister chromatid exchanges by chemical agents. En : *Sister Chromatid Exchanges*. (Wolff, S. ed). John Wiley and Sons. pp. 515-529.

Taylor, J.H. Woods, P.S., y Hughes, W.L. (1957) The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 43, 122-128.

Taylor, J. H. (1958) Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics.*, 43, 515-529.

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

Tice, R.R., Chaillet, J., y Schneider, E.L. (1975) Evidence derived from sister chromatid exchanges of restricted rejoining of chromatid sub-units. *Nature.*, 251, 70-72.

Tice, R., Schneider, E.L. y Rary, J.M. (1976) The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Exp. Cell Res.*, 102, 232-236.

Tice, R., Chaillet, J. y Schneider, E.L. (1976) Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges in vivo. *Exp. Cell. Res.* 102, 426-428.

Tice, R., Windler, G. y Rary, J.M. (1978) Effect of cocultivation on sister chromatid exchanges frecuencies in Bloom's syndrome and normal fibroblast cells. *Nature*. 273, 539-540.

Tice, R., Thorne, P. y Schneider, E.L. (1979) Bisack analysis of the phytohaemagglutinin-induced proliferation of human peripheral lymphocytes. *Cell. Tiss. Kinet.* 12, 1.

Tice, R.R., Lambert, B., Morimoto, K., y A.Hollaender. (1984) A review of the international symposium on sister chromatid exchanges: Twenty-five years of experimental research. *Environ.Mutagen.* 6, 752-767.

Tice, R.R. y Ivett, J.L. (1985) Cytogenetic analysis of bone marrow damage. En: *Toxicology of the blood and bone marrow.* (Irons, R.D. ed) Raven Press. New York. pp. 119-140.

Touraine, J.L. y Gay, G. (1981) Déficit immunitarie secondaire a la malnutrition. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 5, 835-838.

Trent, J.M., Gerner, E., Broderick, R.D. y Crossen, P.E. (1986) Cell cycle analysis using bromodeoxiuridine : comparison of methods for measurement of total cell transit time. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 19, 43-51.

Upadhyaya, K.C., Ishwar, C.V. y Ghai, O.P. (1975) Chromosome aberrations in protein-calorie malnutrition, *Indian Pediat.* 12, 857-864

Vanella, A., M.L., Barcellona, I. Serra., N. Ragusa., Avola, R., Avitabile, M. y A.M. Giuffrida. (1983) Effects of undernutrition on some enzymes involved in the salvage pathway of purine nucleotides in different regions of developing rat brain. *Neurochem. Res.*, 8, 151-158.

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

Wagner, R., Schimd, E. y Bauchinger, M. (1983) Application of conventional and FPG staining for the analysis of chromosome aberrations induced by low levels of dose in human lymphocytes. *Mutat.Res.*, 109, 65-71.

Waterlow, J.C., Cravioto, J. y Stephen, J.M.L. (1960) Protein Malnutrition in Man. En: *Advances in Protein Chemistry.* Vol.XV. Academic Press. N.Y. pp: 131-238.

Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.*, 171, 737.

Watson, R.R., McMurray, D.N., Martin, P. y Reyes, M.A., (1985) Effect of age, malnutrition and renutrition on free secretory component and IgA in secretions, *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 281-288.

Widdowson, E.M. y McCance, F.R.S. (1960) Some effects of accelerating growth. I. General somatic development. *Proc.R. Soc.Lond (Biol.)*, 152, 188-206.

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

Wolff, S. y Perry, P. (1974) Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma (Brl)* 48, 341-353.

Wolff, S., Bodycote, J. y Painter, R.B. (1974) Sister chromatid exchanges induced in chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutat.Res.*, 25, 73-81.

Wolff, S., Bodycote, J., Thomas, G.H. y Cleaver, J.E. (1975) Sister chromatid exchange in Xeroderma pigmentosum cells that are defective in DNA excision repair or post replication repair. *Genetics.*, 81, 349-355.

Wolff, S., Rodin, B. y Cleaver, J.E. (1977) Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and Xeroderma pigmentosum cells. *Nature.*, 265, 347-349.

Young, M.C. y Rasmussen, M. K. (1985) Effects of varying degrees of chronic dietary restriction in rat dams on reproductive and lactational performance and body composition in dams and their pups. *Am. J. Clin. Nutr.*, 41, 979-987.

Zakharov, A.F. y Egolina, N.A. (1972) Differential spiralisation along mammalian mitotic chromosomes BrdU revealed differentiation in chinese hamster chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 38, 341-365