

12
2ej.

Universidad Nacional Autonoma de Mexico

Facultad de Ciencias

Biologia

" Analisis del Ciclo Celular In Vitro en
celulas de medula osea de ratas
desnutridas durante la lactancia mediante
la incorporacion de timidina tritiada."

TESIS

Que para obtener el Titulo de
BIOLOGO

Presenta: Jose Luis Gomez Olivares

Mexico, D.F. 1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Paginas
I. ANTECEDENTES	1-21
A) <u>Desnutrición</u>	1-12
1) Definición e importancia	1-2
2) Estudios sobre desnutrición en animales	2
3) Alteraciones causadas por la desnutrición	2
3.1 Alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas.	2-4
3.2 Alteraciones inmunológicas.	5-6
3.3 Alteraciones en la conducta, desarrollo mental y aprendizaje.	6-7
3.4 Alteraciones a nivel celular.	7-10
3.5 Alteraciones a nivel citogenético.	10-11
3.6 Alteraciones a nivel molecular.	11-12
B) <u>Estudios sobre Cinética Celular</u>	
1) Definición del ciclo celular	12-13
2) Características de las fases del ciclo	13-16
3) Estudios sobre proliferación celular	16-22
i) Utilización de precursores radiactivos del ADN.	17-20
ii) Utilización de precursores no radiactivos del ADN.	21-22
C) <u>Justificación del Estudio</u>	23

II OBJETIVO	23
III MATERIALES Y METODOS	24-28
1) Animales	24
2) Desnutrición experimental	24
3) Cultivo de médula ósea	24-25
4) Incorporación de la Timidina marcada con tritio	25
5) Cosecha de células	25-26
6) Autorradiografía (Dipping)	26
7) Revelado y Fijación	26-27
8) Tinción	27
9) Análisis de las preparaciones	27-28
IV RESULTADOS	29-39
1) Evaluación de la desnutrición respecto al peso corporal.	29-33
2) Ciclo Celular	33-40
V DISCUSION	41-47
A) Desnutrición	41
B) Ciclo Celular	41-47
VI CONSIDERACIONES FINALES	48
VII BIBLIOGRAFIA	49-58

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Paginas
Figura 1. Via de incorporación al ADN de la timidina marcada con tritio.	18
Gráfica 1. Análisis del ciclo celular mediante la incorporación de timidina tritiada con el método de la fracción de mitosis marcadas.	28
Cuadro 1. Peso corporal (g) de ratas testigos y desnutridas desde el día siguiente a su nacimiento hasta los 21 días de edad (destete).	30
Gráfica 2. Desnutrición durante la lactancia. Curva de incremento en peso en ratas desnutridas y testigo.	31
Gráfica 3. Diferencia en peso entre ratas testigo y desnutridas de 21 días de edad (Histograma).	32
Figura 2. Características morfológicas de ratas testigo y desnutridas de 21 días de edad.	33
Figura 3. Figura metafásica considerada marcada (a), y se presenta una metafase considerada no marcada.	35
Cuadro 2. Fracción de mitosis marcadas <u>in vitro</u> en ratas Bien nutridas y Desnutridas.	36
Gráfica 4. Fracción de mitosis marcadas <u>in vitro</u> en ratas Bien nutridas y Desnutridas.	37
Cuadro 3. Duración del ciclo celular y fases en ratas desnutridas y testigo (Resultados de tres curvas)	38
Gráfica 5. Distribución del tiempo de duración de las fases del ciclo en ratas desnutridas y testigo	40
Cuadro 4. Tiempo de ciclo <u>in vitro</u> obtenido por distintas metodologías en medula ósea de ratas desnutridas y testigo.	46

I - ANTECEDENTES

A) DESNUTRICION.

Definición e importancia.

Se conoce con el nombre de desnutrición calórico-proteica (DCP) al 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 protéico. 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). La nutrición es un factor de suma importancia para el crecimiento y desarrollo óptimo de los organismos. 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 cuál 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 del tercer mundo. Estudios sobre la mortalidad infantil y preescolar en países latinoamericanos, revelan que la desnutrición es responsable directa o indirectamente de más de un tercio de las muertes de niños de 0 a 5 años de edad (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 y se calcula que de los mil 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.

La desnutrición se presenta fundamentalmente en niños lactantes y preescolares, principalmente en los lactantes destetados tempranamente, quienes 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 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 oportunidades experienciales en etapas cruciales de la vida (Cravioto, 1975).

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 determinando que la desnutrición es un resultado ecológico en donde están interactuando diversos factores que dan como resultado una insuficiente ganancia de peso en el lactante menor, que es una de las características más obvias de la desnutrición.

2) Estudios sobre desnutrición en animales.

Es claro que los estudios en humanos son representativos de los efectos de la desnutrición teniendo importancia prioritaria; ee sin embargo, para el entendimiento de los efectos en diversos aspectos, es imposible e inaceptable el estudio en seres humanos, por lo anterior los cuadros clínicos que se presentan en la desnutrición calórico-protéica severa han sido reproducidos en trabajos realizados en animales de experimentación por varios autores para tratar de analizar los daños provocados por la desnutrición sin la interferencia de las infecciones que generalmente la acompañan. Los animales son desnutridos experimentalmente con base en una dieta deficiente en la cantidad de proteínas y/o energía o deficiente en la calidad de estos. Se han realizado estudios en diversos animales, principalmente ratón, rata, conejo, cerdo y mono.

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 etapa 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 en la que la desnutrición es prevalente.

3) Alteraciones causadas por la desnutrición.

3.1 Alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas.

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

Los resultados obtenidos de la evaluación de los efectos de la desnutrición van desde la determinación de una alteración en la implantación y supervivencia de crías, hasta el tamaño de la camada y reducción del

peso al nacimiento en ratones expuestos a una deficiencia alimenticia mayor al 50 % (Javad, 1978). Por otra parte se ha encontrado una menor ganancia de peso durante la gestación en ratas con desnutrición crónica sin alterarse el número de crías vivas (Galler y Zartarian, 1981). Otro efecto observado a este respecto es el determinado en ratas sometidas a una dieta deficiente durante el periodo de gestación causando retraso en el crecimiento intrauterino (Fernández y col, 1985). Asimismo se ha determinado que una dieta con bajo contenido proteico administrada a madres y crías da como resultado una alteración en la composición corporal, esto es, un alto contenido de agua y disminución en el contenido de proteínas (Young y Rasmussen, 1985). Una deficiencia alimenticia durante el periodo en cual las madres amamantan a sus crías promueve un incremento en el catabolismo de cantidades considerables de tejido materno (por ejemplo, músculo esquelético, corazón, hígado y riñón) tratando con esto mantener un desarrollo normal de los productos (Glore y Layman, 1985). También se ha observado que cuando se suministran cantidades bajas de proteínas y energía a madres durante la lactancia, se produce una disminución en la fase de síntesis de proteínas en glándulas mamarias (Jansen y Hunsaker, 1986).

3.1.2 Alteraciones sobre el suero .-

Los efectos producidos por la desnutrición en el suero han sido puestos en evidencia a través de los estudios realizados por Hoffenberg en 1975, quien los cuales demostró una disminución en el contenido de albúmina, observando que cuando una dieta es baja en proteínas, la cantidad de aminoácidos que llegan al hígado disminuye y de esta manera la síntesis de la albúmina se ve reducida. A pesar de este efecto hay una transferencia de aminoácidos a sitios extravasculares. Al presentarse ésta situación, la cantidad de albúmina sintetizada es considerablemente menor a la que es metabolizada, y por lo tanto se presenta una disminución en su concentración.

Holman y col en 1981 encontraron alteraciones respecto al contenido de fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos en suero de niños con DCP.

3.1.3 Alteraciones en el tejido óseo.-

Kuranitsu y col en 1985, encontraron que en el fémur, el incremento en peso y la longitud y la actividad de la fosfatasa alcalina, se ven reducidas en ratas que mostraron DCP. Asimismo, determinaron que existe un efecto aditivo cuando se presentan tanto deficiencia calórica como de proteínas.

provocando ambos efectos más severos como son: una menor longitud y grosor de los huesos y mostrando una placa de crecimiento sumamente delgada.

Lee y col., en 1986, demostraron que suministrando una dieta baja en energía se ve afectado el contenido de minerales principalmente calcio, fósforo y magnesio en huesos de ratas adultas.

3.1.4 Alteraciones en el Sistema Nervioso .-

Salas en 1978, al mantener ratas madres con deficiencia de alimento durante el periodo prenatal encontró reducción permanente del peso cerebral y en el número de células cerebrales, observando también una disminución en el número de ramificaciones dendríticas y axones terminales.

En una revisión de los efectos de la desnutrición sobre el SNC realizado por Morgane y col., 1978 se hace mención de varias premisas entre las cuales destacan:

i) La desnutrición en el periodo de lactancia, resulta en una reducción del número de células cerebrales en ratas y en niños.

ii) La evidencia derivada de estudios en animales de experimentación, ha establecido claramente que la desnutrición como una variable aislada producirá marcados cambios físicos, químicos y funcionales en el cerebro.

iii) Una desnutrición postnatal y prenatal en ratas produce un decremento en el grosor de la corteza cerebral.

iv) El SNC sufre una serie de cambios físicos, químicos y funcionales, causados por la desnutrición en periodos críticos, que pueden resultar en una marcada perturbación en la función del cerebro.

En 1981 Morand y col. al trabajar con ratas expuestas a desnutrición durante el periodo prenatal, encontraron que en las neuronas y oligodendrocitos hay una disminución en la concentración de ácidos grasos monoinsaturados. Sikes y col., 1981 al estudiar diversas regiones del cerebro en ratas desnutridas durante el periodo de lactancia encontraron una densidad y tamaño de la oligodendroglia normal y, por otro lado, observaron una disminución en el contenido de mielina.

3.2 Alteraciones inmunológicas.

La DCP está asociada con una marcada susceptibilidad a las enfermedades infecciosas y a un comportamiento anómalo de varias facetas de la respuesta inmune por lo cual se incrementa la vulnerabilidad a las enfermedades producidas por microorganismos patógenos. Numerosos investigadores han demostrado diferencias significativas de las funciones de inmunidad mediada por células, así como deficiencias en los niveles de complemento sérico y la actividad fagocítica. Estos hallazgos han sido obtenidos de necropsias humanas y han sido reproducidos en animales con DCP (Chandra, 1980).

También se ha encontrado una asociación entre la DCP y una disminución del número de linfocitos T circulantes. Debido que la cuenta total de linfocitos es baja durante la deficiencia nutricional, el número de linfocitos T en la sangre periférica está siempre disminuido (Chandra, 1979).

Los mecanismos involucrados en estas observaciones no son claros aunque se cree que puedan deberse a alteraciones como cambios en las proteínas de la superficie de la membrana o la presencia de inhibidores tales como la proteína C reactiva junto con altas concentraciones de la inmunoglobulina E. Otras causas pueden ser la linfolesis como consecuencia de las altas concentraciones de cortisol libre en el plasma, la maduración y diferenciación anómalas de las células T responsables de la respuesta inmune celular (Chandra, 1979). Así mismo se ha reportado una marcada heterogeneidad funcional y fisicoquímica de los linfocitos formadores de rosetas. En estos estudios se ha encontrado que en niños con DCP, los linfocitos con receptores para la IgM (células T, "cooperadoras") están disminuidos, y aquellos con receptores para la IgG (células T, "supresoras") están ligeramente aumentados (Chandra, 1979).

El incremento de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (Tdt) presente en linfocitos en la DCP sugiere una diferenciación incompleta en las células nulas para madurar hacia linfocitos post-tímicos. Esta es una evidencia indirecta de la alteración de la influencia de inducción del timo en la DCP (Chandra, 1980).

Good y col en 1980 reportaron un incremento en la respuesta inmune mediada por células en ratas y ratones sometidos a desnutrición experimental. Estos resultados contrastan con los reportados por Chandra (1980) y otros autores que encuentran que la respuesta a mitógenos como Concanavalina A (Con A), Fitohemaglutinina (PHA) o Lipopolisacáridos es similar tanto en organismos desnutridos como normales.

Fernández y Yunis en 1976 reportaron una respuesta alta en la incorporación de timidina tritiada (3H-TdR) en células de bazo de ratas desnutridas como efecto de la estimulación por parte de los tres agentes mitógenicos. Cuando se analizó la PHA los controles tuvieron cuentas que

fueron sobrepasadas alrededor de 130 veces al utilizar ratas desnutridas: al usar concanavalina A, la respuesta fué 99 veces la del testigo y con lipopolisacárido la respuesta se incrementó 30 veces.

Otras reacciones importantes de la respuesta inmune, alteradas por la DCP y que están asociadas al funcionamiento óptimo de los linfocitos T y B son: la quimiotaxis y la capacidad opsonica del plasma que están reducidas (José y col, 1970).

La respuesta inmune óptima requiere una función adecuada de varios componentes celulares y humorales, así como las interacciones entre ellos. Hay circuitos de retroalimentación positivos e inhibitorios. Es probable que la deficiencia nutricional afecte los diferentes mecanismos de defensa del huésped en una extensión variable. La mayor parte de los estudios a la fecha han sido enfocados hacia la respuesta inmune individual. Los mecanismos inmunoreguladores auxiliar y supresor, muy bien pueden dar la clave del laberinto de interacciones de nutrición e inmunidad en el hombre y en los modelos animales (Chandra, 1980).

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

Cravioto y Robles en 1963 y 1965 realizaron los primeros estudios sistemáticos acerca del desarrollo mental valorado 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. Así Cravioto y col, en 1966, demostraron un alto nivel de asociación entre el riesgo de haber padecido desnutrición en la infancia y desarrollo intersensorial retardado. Señalaron 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. Este trabajo es considerado como una cita clásica, sobre la base de la información recopilada por el Instituto de Información Científica de los Estados Unidos de Norteamérica.

Cravioto en 1978, demostró que fallas en el aprendizaje adecuado de la lectura y escritura están asociados primeramente 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 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 niños con desnutrición leve (de primero o segundo grado) se agraven y lleguen a ser desnutridos de tercer grado.

Cravioto y Arrieta en 1979, observaron que en lactantes menores de 6 meses con desnutrición severa, la estimulación sistemática aunada al tratamiento médico dietético es capaz de hacer que se recuperen del déficit mental 7 de cada 10 niños, 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 y col en 1979, determinaron el contenido de ADN, ARN y proteínas en corteza cerebral. Sus resultados mostraron que la estimulación es capaz de minimizar los efectos causados por la desnutrición y que en el grupo con desnutrición y aislamiento ambiental se producen las alteraciones bioquímicas más graves.

3.4. Alteraciones a nivel celular.

3.4.1. Estudios de alteraciones a nivel celular mediante el empleo de timidina marcada con tritio.

Ramalingaswami y Deo en 1968 al inducir desnutrición por falta únicamente de proteínas en monos rhesus jóvenes lograron simular la desnutrición tipo Kwashiorkor. Encontraron gran similitud entre su modelo experimental y la desnutrición en humanos. Definieron las reacciones básicas ante la falta de proteínas a nivel celular y sus resultados sugieren que todas las células de la mayoría de los órganos están afectadas pero no en el mismo tiempo ni con la misma severidad, observando que los órganos con alto recambio de proteínas son los que se ven principalmente afectados. Asimismo establecieron que una prolongación en el ciclo celular medido por autorradiografía con timidina tritiada (3H-TdR) es asociada directamente a una característica de deficiencia de proteínas.

Deo y colaboradores en 1967 estudiaron la regeneración celular en ratas de la cepa Wistar adultas parcialmente hepatectomizadas teniendo un grupo control (16% caseína) y un grupo con dieta baja en proteínas (1% caseína). Encontraron en el grupo desnutrido un alto índice por incorporación de 3H-TdR como una evidencia del alargamiento de la fase de síntesis del ADN, lo que ocasiona que un mayor número de células se marquen. Por otro lado al comparar el índice de marcaje entre el control y los desnutridos entre las 24-28 horas después de la hepatectomía se observó que en el grupo deficiente de proteínas no había incremento en los núcleos marcados durante ese tiempo, lo cual indica una pobre proliferación celular. Asimismo el elevado índice mitótico observado fue considerado como evidencia en el alargamiento de la fase de división.

Deo y Ramalingaswami en 1970 hicieron algunas consideraciones acerca del control de la proliferación en organismos pluricelulares. básicamente 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 recambio celular continuo 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 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.

Deo y Mathur en 1975, en un estudio realizado en folículos de pelo y epidermis de fetos de ratas siguiendo la técnica de incorporación de ³H-TdR, determinaron fases del ciclo celular por medio de porcentajes de células marcadas contra tiempo. Reportaron que en la desnutrición se afectan algunas fases del ciclo celular, observando que en los animales desnutridos la fase G2 se prolongó en 100% y la fase S en un 57%.

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, observando un acortamiento de la fase G1. Señalan que en trabajos previos y en el suyo propio se encuentran consistentemente un aumento en la fase de síntesis de ADN, lo cual puede representar una adaptación para compensar la baja velocidad de síntesis de esta molécula.

3.4.2 Estudios de alteraciones a nivel celular mediante el empleo de otras metodologías.

Winick y Noble estudiaron en 1966 el efecto de la desnutrición sobre el peso total del animal, peso de algunos órganos (cerebro, timo, bazo), contenido de ADN, ARN y proteínas en ratas. Encontraron que la desnutrición en etapas tempranas de la vida, como es del nacimiento a los 21 días, disminuye el peso, contenido de proteínas, de ADN y ARN señalando una reducción en el número de células sin alterarse el tamaño celular.

Deo y col en 1975 consideraron que la proliferación, migración, diferenciación y muerte celular son procesos biológicos básicos que juegan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de los tejidos. Normalmente se

mantiene un balance entre estos procesos, por lo que alteraciones de uno con respecto a otro modifican el desarrollo. La desnutrición altera la proliferación y migración, aunque la diferenciación parece no estar alterada, 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. En la desnutrición los tejidos y las células no son afectadas de la misma manera, ni en tiempo ni en dimensión.

Ortiz, en 1980 al analizar el ciclo celular in vivo en médula ósea en ratas desnutridas y bien nutridas durante la lactancia, utilizando la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas, encontró un considerable retraso en la proliferación en las ratas desnutridas. Al analizar el índice mitótico entre ambos lotes, encontró que las ratas experimentales mostraban un índice mitótico más alto que las ratas testigo. Indica que este fenómeno pudiera ser explicado si se considera que la fase mitótica dura más tiempo, y que por esto al inyectar colchicina a los animales durante una hora antes del sacrificio se encuentren más mitosis en estas ratas.

Gaben-Cogneville, y col en 1981 estudiaron el efecto de la desnutrición en las fracciones del estroma y de los adipocitos del tejido inguinal de ratas que fueron desnutridas por periodos variables a partir del nacimiento y encontraron que la proliferación y diferenciación celular se ven severamente afectadas en relación directa a la duración del período de desnutrición.

Murthy y col (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 tres ciclos de duplicación ó más en los cultivos de los desnutridos. De sus resultados concluyeron que la duración del ciclo en los linfocitos de niños desnutridos es mayor, proponiendo que puede estar alterada la respuesta al mitógeno PHA en la desnutrición.

González-Torres y col en 1983, trabajando también con 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 torrente sanguíneo o que responden con mayor rapidez a la PHA.

Ortiz y col en 1986 estudiando la proliferación celular in vitro en médula ósea de ratas desnutridas y bien nutridas durante la lactancia, mediante la técnica de tinción diferencial de cromátidas hermanas, encontraron que en los tiempos que analizaron el porcentaje de mitosis en primer ciclo de replicación fue mayor en las células desnutridas. Por otro

lado, observaron que en las células bien nutridas existe una considerable cantidad de mitosis en tercer ciclo de duplicación mientras que en las ratas desnutridas estas no aparecen. Determinaron de esta manera que las células de las ratas desnutridas en condiciones de cultivo muestran un retraso en la proliferación celular al ser comparados con los animales testigos.

Betancourt y González en 1986 determinaron la cinética de proliferación in vitro de fibroblastos de ratas severamente desnutridas durante la lactancia. Al analizar el número de células, la cantidad de ADN y la de proteínas, observaron una diferencia en los tres parámetros analizados con respecto a los obtenidos en el lote testigo, proponiendo que la diferencia mostrada es debida a la velocidad de proliferación la cuál es más lenta en las células desnutridas.

3.5. Alteraciones a Nivel Citogenético

Armendares y col. en 1971 y Betancourt y col en 1972 encontraron una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de niños desnutridos. Por otro lado Thorburn y col en 1972, Khouri y McLaren en 1973, y Upadhyaya y col en 1975, al estudiar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en niños desnutridos no encontraron diferencia significativa en relación niños bien nutridos. Se propuso que la alta frecuencia de aberraciones cromosómicas en los niños se podría deber a una mayor susceptibilidad a diversos agentes externos. Para probar lo anterior Betancourt y col 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 bien nutridos encontrando una frecuencia de aberraciones similar entre los niños desnutridos y testigos en todas las dosis de radiación probadas.

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. Vijayalaxmi en 1975, encontró en la médula ósea de ratas desnutridas durante ocho semanas a partir de los 21 días de edad, una frecuencia de aberraciones cromosómicas significativamente mayor a la encontrada en ratas alimentadas con una dieta alta en proteínas. Betancourt y col en 1979, determinaron el porcentaje de aberraciones cromosómicas en ratas desnutridas a partir del destete con una dieta de proteínas deficientes en metionina y triptofano (maíz) consumida "ad libitum" y reduciendo la cantidad de consumo a la mitad. Las aberraciones encontradas fueron rompientes cromatídicos y algunos cromosómicos, no encontrándose diferencias significativa entre el porcentaje de aberraciones entre las ratas desnutridas y ratas control.

El estudio de la frecuencia de Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICH) se ha considerado un método más sensible para detectar daño al material genético. Sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios ya que Mutchinick y col en 1979; González-Torres y col (1983) estudiaron la frecuencia de ICH en linfocitos de niños desnutridos, no encontrando diferencia entre los desnutridos y testigos mientras que Murthy y col en 1980 observaron una frecuencia de ICH significativamente mayor en los desnutridos.

En animales desnutridos experimentalmente, Murthy y Srikantia en 1981, observaron una mayor frecuencia de ICH en ratones desnutridos después de la época del destete. Así mismo Betancourt y col (1986) determinaron in vivo en ratas desnutridas durante la lactancia un incremento en los ICH, mientras Ortiz en 1987 al analizar la frecuencia de intercambios in vitro en ratas desnutridas durante la lactancia encontró que no existe diferencia entre ratas testigo y desnutridas y propone que algunos factores de las condiciones de cultivo influyen en la frecuencia observada y de esta manera se pierde la diferencia de ICH observada in vivo.

3.6 Alteraciones a Nivel Molecular .-

Avitabile y col, en 1981 mediante la incorporación de uridina tritiada en distintas regiones del cerebro en ratas desnutridas experimentalmente desde el décimo día de gestación y hasta el término del periodo de lactancia, realizando un estudio de la síntesis de ARN, determinaron que la síntesis en las ratas desnutridas se encuentra alterada, por lo que los autores concluyen que en las ratas la etapa de vulnerabilidad del cerebelo, se encuentra durante las primeras tres semanas posteriores al nacimiento.

Serra y col en 1982, al estudiar el efecto de la desnutrición sobre la ADN polimerasa y la Timidina quinasa (enzimas esenciales para que se realice la síntesis del ADN), en diversas regiones del cerebro en ratas a las que les indujeron desnutrición a partir del décimo día de gestación y durante el periodo de lactancia, encontraron que la actividad de las enzimas en estudio se encuentra disminuida en cerebro.

Vanella y col en 1983 utilizando ratas desnutridas con deficiencia de proteínas, al analizar la actividad de las enzimas hipoxantinaganina fosforibosiltransferasa (HGPRTasa) y la adeninafosforibosiltransferasa (APRTasa) encontraron que al quinto día posterior del nacimiento la actividad de ambas enzimas estaba disminuida. Esta disminución no se mostró de forma permanente, sino que a los treinta días posteriores al nacimiento se encontraron valores similares entre ambos grupos. Como conclusión estos autores indican que la desnutrición durante la gestación y en los primeros días de la vida altera significativamente la actividad de ambas enzimas.

Castro y col en 1986, en su estudio demostraron un aumento en la sensibilidad a nucleasa micrococcal, así como una disminución en la longitud del nucleosoma cuando se suministro una dieta rica en azúcares pero libre en lípidos. En tanto que cuando se suministro una dieta deficiente en proteínas, magnesio o zinc, se disminuyó la sensibilidad de la cromatina a la nucleasa. Los mecanismos por los cuales la dieta tiene un efecto en la conformación estructural del ADN no son aún claros. Una posible explicación para la disminución de la sensibilidad de la cromatina a la nucleasa fue propuesta por Castro y Toule en 1986 en la que esta sensibilidad se pudo relacionar con los cambios en la composición de la histona H1 y se ha encontrado también que una disminución en la concentración de cisteína altera significativamente la metilación de la guanina.

B) C I C L O C E L U L A R

1) Definición del Ciclo Celular.

Se da el nombre de ciclo celular al período que transcurre entre la formación por división de una célula madre y el tiempo requerido para que ella misma se divida (Baserga, 1985; Gimenez-Martin y col 1977 ; Mitchison, 1971).

El ciclo celular es una cadena de eventos variables que involucran interacciones entre el complejo núcleo-citoplasma y ambiente. En las células eucariontes, el ciclo celular puede ser considerado como una secuencia ordenada de procesos interrelacionados distinguibles por las transiciones fisiológicas y citológicas en fases con una actividad reconocible (Padilla y Whitson, 1980)

El ciclo celular en los organismos eucariontes, se ha dividido tradicionalmente en dos etapas:

- a) Interfase, que es el período de crecimiento.
- b) División celular o Mitosis.

La duración de la interfase es, en términos generales, mayor que el período en el que transcurre la mitosis. En la mayoría de las células animales y vegetales la duración del ciclo celular es de un día aproximadamente, siendo el tiempo más frecuente de veinte horas; de este tiempo, la mitosis toma más o menos una hora, mientras que el resto es ocupado por la interfase (Mazia, 1974).

Las fases con las que actualmente se designa al ciclo celular fueron definidas inicialmente por Howard y Pelc en 1953, quienes observaron que la interfase se dividía en tres etapas de acuerdo a los fenómenos moleculares ocurridos durante esta fase, designando al periodo de replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) como la fase S (de síntesis), este periodo fue tomado como referencia para definir las otras etapas del ciclo: G1 ("gap" pre-sintético), que es el tiempo transcurrido entre el final de la mitosis y el comienzo de la síntesis, y G2 ("gap" post-sintético), que es el periodo comprendido entre el final de la síntesis y el principio de la división celular conocida como fase M (mitosis) o fase D (división). Estudios posteriores han llevado a la caracterización de una etapa en la cual las células no entran en el ciclo celular denominada G₀, así como subdivisiones de las fases como es el caso de G_{1a} y G_{1b} (Darzinkiewicz y col., 1981).

El tiempo de duración de las fases G₁, S, G₂ y M son diferentes en los distintas clases de células pero las variaciones entre las células individuales de la misma clase son pequeñas (Mitchison, 1971).

En los organismos multicelulares los diferentes 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. 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.

La célula durante la interfase debe duplicar además de su ADN todos los componentes celulares y su masa. 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, solo unos pocos son sintetizados en un punto específico del ciclo. En tanto que el ADN, su génesis se encuentra restringida en un sitio específico del ciclo.

La mayoría de las poblaciones celulares están constituidas por dos clases de células: las que continuamente se encuentran ciclando o en proliferación 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 en condiciones naturales nunca se dividirán.

De acuerdo a Mitchison (1971), Graves (1975), Prescott (1976), Pardee y col. (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 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:

- i) Sintetizan algunas variantes de histonas
- ii) El complemento de los ribosomas y el contenido de ARN es diferente
- iii) La proteína p53 se requiere para la salida de G₀.
- iv) El grado de condensación de la cromatina observado en esta fase es mayor, y se ha propuesto la existencia de un período G₀2 (Sans y col, 1980).

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 dramáticamente. Se ha observado que si se bloquea la síntesis de ARN al principio de esta fase hay un retardo en la fase S, mientras que si el bloqueo es hacia el final no lo hay lo cual ha indicado que la síntesis de ARN se lleva a cabo al inicio de G₁. Se ha demostrado también una gran actividad de síntesis de proteínas durante esta fase, siendo característica la síntesis de proteínas no histonas y varias proteínas específicas reportadas por Baserga en 1985 entre las cuales se encuentran: calmodulina, proteína inestable (R), actina, ornitina descarboxilasa, proteína p53 y varias proteínas citoplásmicas. También en esta etapa se ha detectado fosforilación de la histona H1, y síntesis de proteínas 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. Estudios realizados en células híbridas han mostrado que el paso de las fases G₁ a S puede ser inducido por un factor

citoplásmico. Así mismo, 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. Los requerimientos energéticos para que se lleve a cabo son altos pero no tanto como en S, sin embargo hay síntesis de nucleótidos trifosfatados (ATP, GTP, TTP y CTP).

Fase S.- La síntesis del ADN está restringida casi en su totalidad al período de la interfase denominado como S. Para la síntesis o duplicación del ADN cada fibra de éste, está dividida en muchas unidades 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, habiendo un orden temporal establecido que se mantiene siempre. Se propone que los duplicones se encuentran conjuntados 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, sin embargo se ha propuesto que la metilación está involucrada en el mantenimiento de este orden, pero esto no ha sido claramente confirmado. Existen algunas evidencias más que indican que la síntesis de proteínas puede ser requerida para la travesía de S, y es posible que el patrón de iniciación dependa de una secuencia ordenada de síntesis y de la acción de moléculas iniciadoras que actúan en duplicones específicos. Así mismo, se ha propuesto con base en los estudios de Graves (1975), en células híbridas, que la información genética para las moléculas iniciadoras de la duplicación son codificadas en el mismo cromosoma al igual que el duplicón donde van a actuar. Existe otra hipótesis acerca del control de la iniciación que propone que el control de la iniciación puede estar operando por medio de cambios estructurales en el cromosoma involucrando quizás en asociaciones con la envoltura nuclear.

Las enzimas requeridas para la síntesis del ADN son diversas Pardee y col en 1978 pusieron énfasis en dos grupos de enzimas las ADN polimerasas y las ligasas. Baserga en 1985 consideró de importancia además otras enzimas relacionadas con el metabolismo del ADN como la timidina quinasa y las ribonucleótido reductasas.

Reddy y Pardee en 1980 consideraron de importancia para la iniciación de la síntesis del ADN la integración de un complejo formado por varias proteínas que contiene la mayoría de los polipéptidos que son requeridos para la síntesis del ADN y proteínas asociadas.

Además durante la fase S se llevan a cabo otros eventos variados como son la síntesis de proteínas del tipo de las histonas (H2A, H2B, H3 y H4) la cual está relacionada con la síntesis del ADN. La fosforilación de la histona H1 que continúa durante la fase S, en dos sitios adicionales a los de G1 y aparecen otros receptores de membrana para diferentes factores de proliferación celular.

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. Se ha descrito la existencia de proteínas involucradas en la condensación de los cromosomas las cuales se han denominado "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 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 (Rao y Adkha, 1985). Otro evento importante que se lleva a cabo en esta etapa, es la realización de un proceso de reparación del ADN conocido como reparación G2, que ha sido ampliamente estudiado a partir de su descubrimiento en 1968 por Kihlman y Hartley.

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 (cariocinesis) y la división citoplásmica (citocinesis), ambos están generalmente 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 disolución y la reestructuración de la envoltura nuclear. Durante esta fase la síntesis de proteínas y de ARN son prácticamente nulas.

4.- Estudios sobre la cinética celular.

Técnicas utilizadas para el estudio del Ciclo 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, este ha sido muy útil para determinar la cinética de proliferación celular y el tiempo de duración 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 y col en 1957 también demostraron la replicación semiconservativa del ADN en células eucariontes.

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

i) La utilización de precursores radiactivos.- Han sido ampliamente usadas las técnicas basadas en la incorporación de precursores radiactivos en el ADN.

Autorradiografía:

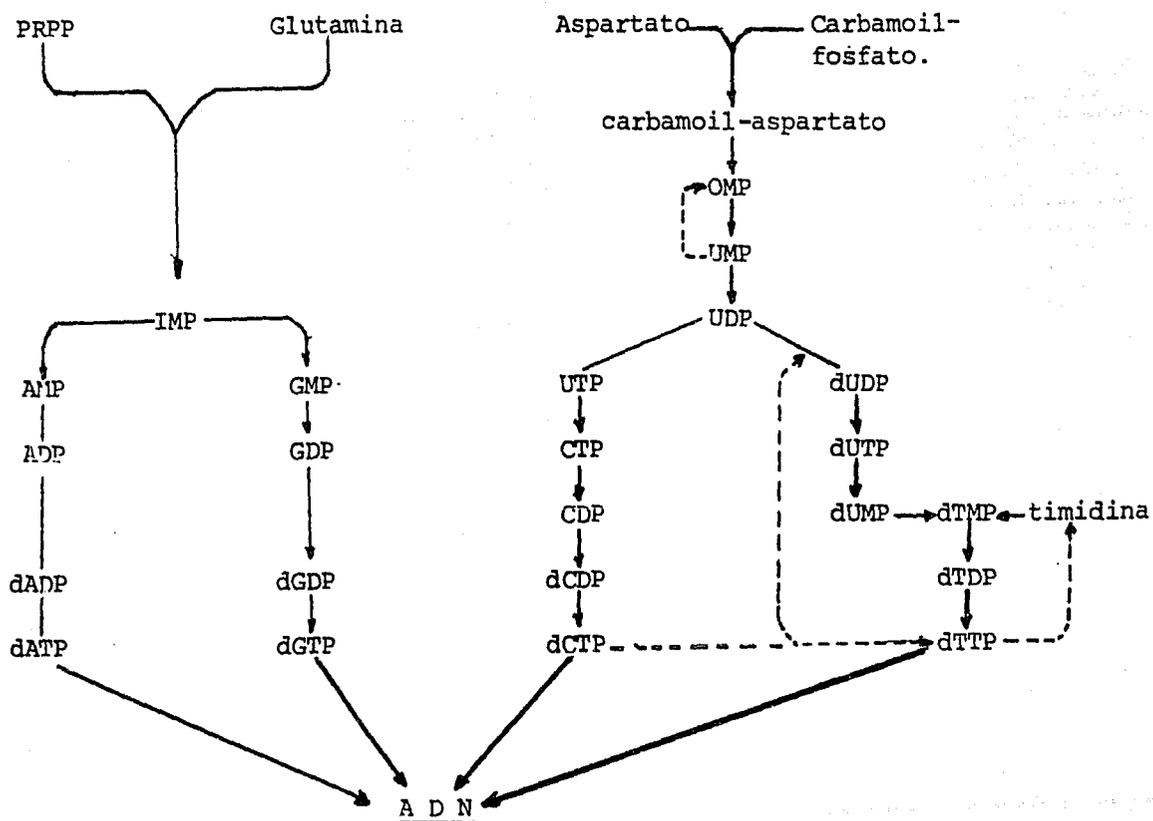
El empleo de elementos radiactivos como marcadores de los ácidos nucleicos y su detección por autorradiografía se remonta al grupo de Taylor que emplearon fosfato marcado con ^{32}P y ácido orótico marcado con ^{14}C sin embargo tuvieron el problema de que ambos isótopos emiten una elevada energía de ionización por lo cual no obtuvieron una eficiente resolución. Friedkien y col en 1956 determinaron con el uso de la timidina marcada con ^{14}C que era exclusivamente incorporada en el ADN de células de mamíferos. En tanto Plaut y Mazia (1956) empleando también timidina marcada con ^{14}C estudiaron la distribución de la marca en figuras metafásicas de raíces de Creppis. Así mismo Taylor y col en 1957 empleando un marcado continuo en raíces de Vicia faba con timidina marcada con tritio demostraron la incorporación de ese precursor en el ADN, así como el descubrimiento de los ICH.

En los métodos autorradiográficos el precursor del ADN más comúnmente utilizado es la timidina marcada con tritio (3H-TdR) (Nicollini, 1975; Shackney, 1973b ; Shackney, 1975a), desoxiribonucleósido que es incorporado en el ADN por la vía por la síntesis del dTTP (Desoxitimidina-trifosfato). Las cinasas fosforilan nucleótidos de timidina a dTTP, estas se encuentran activas en tejidos que presentan una pronunciada síntesis de ADN tales como timo y médula ósea, así como en tejidos que presentan una baja proliferación como el hígado (Davidson, 1976). La fosforilación de la 3H-TdR es eficientemente usada por las células de mamíferos (Nicollini, 1975) (Figura 1), y que es empleado con mucha frecuencia en el estudio de las características proliferativas de poblaciones celulares de mamíferos en crecimiento (Shackney, 1975b).

El mecanismo por el cual puede ser explicada la observación de la detección autorradiográfica de cromosomas metafásicos que han incorporado 3H-TdR esta basado en tres postulados fundamentales según Taylor y col, 1957; Plaut y Mazia, 1956 :

FIGURA 1.

VIAS DE BIOSINTESIS DE DESOXIRRIBONUCLEOSIDOS TRIFOSFATADOS.



(TOMADO de Davidson, 1976)

- a) La duplicación semiconservativa del ADN
- b) Una cromátida se encuentra constituida por una sola doble hélice
- c) Los cromosomas no se segregan al azar en la división celular.

La autorradiografía es una técnica basada en la detección de radiactividad por medio de la formación de depósitos de plata en una emulsión fotográfica (Nicollini, 1975). Una emulsión consiste de cristales de bromuro de plata mezclados en gelatina. Esta técnica se basa en el mismo principio que la fotografía, excepto que la energía para la conversión del bromuro de plata a plata metálica es derivada de radiación ionizante emitida por el precursor marcado radiactivamente. Las partículas beta inciden sobre la capa de emulsión en donde un grupo de electrones libres chocan con iones plata con los cuales se combinan para formar átomos de plata. La imagen latente de un autoradiograma es formada cuando hay suficientes átomos de plata acumulados en un sitio ó mancha sensibilizado para formar un núcleo de plata metálica que es catalizada para convertirse de cristal a grano de plata durante el revelado.

Los reveladores utilizados son agentes reductores que proveen electrones para reducir iones a átomos de plata. Porque los cristales que tienen imagen latente son reducidos más rápidamente a plata metálica que otros cristales. Los cristales que no son preferencialmente reducidos son disueltos por el fijador, dejando fuera de la vista de un patrón de granos de plata que denotan la presencia del material radioactivo (Stein y Yanishevsky, 1979).

Generalmente, en este tipo de estudios las células son clasificadas en marcadas y sin marcar, dependiendo de si el número de granos que se muestran sobre el núcleo exceden un número basal establecido al azar (Nicollini, 1975; Simpson-Herren y col 1976) de esta manera se puede dividir a la población de células en dos categorías: células que sintetizaron ADN y las que no lo hicieron.

Cronkite y col (1959) han hecho ciertas suposiciones en relación a la timidina y el ADN, entre estas se encuentran:

- i) El tritio marcador en la timidina, es estable y no cambia o se combina con hidrógeno disponible.
- ii) Cuando la timidina es incorporada al ADN, es estable y la base de timina marcada no cambia por timina sin marcar.
- iii) La timidina no es almacenada por lapsos de tiempo prolongados antes de ser utilizada en la síntesis del ADN en una célula.

- iv) Ni el ADN o sus productos de degradación son significativamente reutilizados en la síntesis del ADN nuevo.

Por medio del análisis de los patrones de marcado en función del tiempo se puede determinar :

- Índice de marcado.-

Se puede determinar 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. En 1980 Schoenfeld y Kallman propusieron un procedimiento cuantitativo para lograr una determinación más clara del índice de marcaje, esto es realizando 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 con el precursor radiactivo de acuerdo a un número basal de granos de plata que se encuentran encima de los cromosomas que conforman la figura metafásica. Es el método más ampliamente usado y proporciona información acerca de la duración de las fases del ciclo celular.

Según una recopilación de Schneider y col (1978), los métodos autorradiográficos tienen varias desventajas técnicas y entre las cuales ellos consideran que :

- 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 largo período intermitótico.

Gray y col 1977 han demostrado que la radiactividad por célula en la fase S (RCSI), es un método en el cual la duración del ciclo celular y de sus fases puede ser estimada por la medición periódica de radiactividad de células que recibieron un pulso de marcado con timidina tritiada.

ii) Utilización de precursores no radiactivos.-

a) Tinción diferencial de cromátidas hermanas :

Un hallazgo muy importante en la década de los años 70 fue la utilización de la técnica que incluye el uso de 5-bromodesoxiuridina (BrdU)-Hoechst-Giemsa para el análisis de la cronología y topografía de la duplicación del ADN en los cromosomas de los organismos superiores (Yurov y Liapunova, 1976). Esta técnica ha hecho posible demostrar las áreas en el cromosoma que se duplican simultáneamente en la parte temprana, media y tardía del período S. Esta técnica se logra mediante la incorporación de la BrdU que es un análogo de la timidina que se incorpora fácilmente a las cadenas de ADN en formación. En las células que han pasado un ciclo de duplicación en presencia de BrdU sus cromosomas se muestran en la mitosis todos oscuros, ya que ambas cromátidas son químicamente idénticas pues se encuentran monosustituidas. En metafases de células que han atravesado por dos ciclos de duplicación en presencia de BrdU sus cromosomas presentan una cromátida oscura que está monosustituida y una cromátida clara que se encuentra doblemente sustituida con BrdU, en este tipo de figuras metafásicas el cincuenta por ciento de las cromátidas se encuentran claras y el otro cincuenta por ciento oscuras. Para las células que han atravesado por tres o más ciclos de duplicación en presencia de BrdU se presentan cromosomas metafásicos con ambas cromátidas claras esto es doblemente sustituidas con BrdU y cromosomas con una cromátida clara y una oscura en estas metafases se observa un setenta y cinco por ciento de cromátidas claras y el veinticinco restante, oscuras.

B) Análisis de la distribución del ADN.-

Con los avances en la citofluorometría ha sido posible una rápida y segura cuantificación del contenido de ADN celular, el empleo de esta técnica ha incrementado el estudio de la cinética celular. En estas técnicas se colectan las células, se dispersan para tener suspensiones de una sola célula y se tinen con un colorante fluorescente específico para ADN. (Melamed, 1972). Varios modelos matemáticos han sido reportados con el propósito de resolver las distribuciones en los compartimentos del ciclo celular, G₁, S, G₂ y M.

Recientemente Gratzner y Leif (1981) y Oku en el mismo año han desarrollado un método basado en dar un pulso de marcaje con BrdU, y su posterior hidrolización produciendo un ADN de cadena sencilla que es el que ha incorporado BrdU tifiendo 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 y Raza y col. 1984 desarrollaron un anticuerpo monoclonal contra BrdU para detectar síntesis de ADN. Se ha demostrado que el análisis citofluorométrico simultáneo del contenido de ADN celular y la cantidad de BrdU incorporada en el ADN permite una rápida y exacta cuantificación de células en los distintos compartimentos del ciclo celular, así como un indicador confiable del proceso de síntesis de ADN celular durante la fase S sin ningún procedimiento laborioso.

Gray en 1983b, consideró algunas características de 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.
- 5) No requiere incorporación de precursores como la timidina tritiada o la bromodesoxiuridina que son potencialmente tóxicos o mutagénicos.

Para complementar la información se ha propuesto analizar el ciclo celular tomando en cuenta 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 ha analizado la estructura de la cromatina nuclear en base a 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 compartimentos funcionalmente distintos. Sasaki y col (1986) proponen que un análisis bivariado de citofluorometría utilizando un anticuerpo monoclonal contra BrdU permite la determinación confiable de los porcentajes de células en las fases G1, S y G2M del ciclo celular. Así mismo Gray y col 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 de contenido de ADN y cantidad de BrdU incorporada utilizando dos colorantes fluorescentes de diferente longitud de onda (rojo y verde), uno se une al ADN total y el otro solo 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, dispersión y fracción de crecimiento.
- 3) Análisis de la proliferación celular en respuesta a agentes específicos.

JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Con base en los antecedentes previamente expuestos, se hace evidente que la DCP es una enfermedad grave, que es un serio problema de Salud Pública en nuestro país y que se encuentra ampliamente distribuida mundialmente. Esto ha dado cabida a la formación y consolidación de varios grupos de investigación que se han interesado en el estudio de este padecimiento. Actualmente en distintos países se realizan estudios acerca de los efectos de la desnutrición, tanto en humanos como en animales de experimentación, en diversas áreas del conocimiento científico que incluyen puntos de vista como el inmunológico, fisiológico, bioquímico, celular, molecular, de desarrollo, conductual, etc.

Los resultados obtenidos en los diferentes campos pueden llegar a complementarse para comprender mejor las manifestaciones producidas por la enfermedad y lograr el tratamiento más adecuado de los niños desnutridos, tanto a nivel individual como de comunidad.

Dada la gran importancia que presenta la desnutrición en nuestro país y los efectos o daños causados por ella se dan en último grado a nivel celular, en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalpa se tiene el programa de estudio "Efectos a nivel celular de la desnutrición".

O B J E T I V O :

Determinar la duración in vitro del ciclo celular y de cada una de sus fases en células de la médula ósea de ratas desnutridas en el periodo de lactancia, mediante la incorporación de timidina marcada con tritio ($^3\text{H-TdR}$).

H I P O T E S I S :

La hipótesis a probar es que si la desnutrición es una enfermedad que afecta el ciclo de las células de médula ósea, entonces al analizar el tiempo de duración del ciclo celular y de sus fases, en ratas desnutridas y testigos de 21 días de edad, se encontraran diferencias significativas en el tiempo de duración del ciclo y en alguna(s) de sus fases.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

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-Iztapalapa, mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura, luz y circulación de aire.

2) Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia

La desnutrición experimental se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Widdowson y McCance, 1960 con algunas modificaciones.

Al día siguiente del nacimiento se formaron dos lotes de camadas. El lote testigo fue integrado por una nodriza con seis crías y el lote experimental se integro por una nodriza con quince crías, induciéndoles de esta forma desnutrición por competencia de alimento. Se registró el peso de las crías cada 48 horas durante 21 días.

Al término de este tiempo se evaluó el grado de desnutrición que presentaron los animales que constituyeron el grupo experimental, considerándose con DCP aquellos que presentaron una pérdida mayor al 40% de peso corporal del obtenido en las ratas del lote testigo.

3.- Cultivo de médula ósea

Al término del periodo de lactancia las ratas que se consideraron desnutridas así como las testigo, fueron sacrificadas por decapitación.

Se colocó a la rata en la tabla de disección y retiró cuidadosamente la piel de cada una de las patas posteriores descubriendo tanto la pierna como el pie. Para asegurarse que el ambiente fuera estéril se trabajó en la proximidad de la flama de un mechero bunsen.

Se retiró el pie cortando la articulación, así como el fémur el cual fue colocado con todo y la masa muscular en una caja de petri conteniendo solución salina fisiológica estéril.

La siembra fue realizada de acuerdo con la técnica propuesta por Mishell y Shiigi, (1980), modificada por Ortiz y col., en 1986.

En la campana de flujo laminar, se eliminaron las masas musculares lo más posible para dejar al descubierto los huesos. Se separó el fémur de la tibia. Se cortaron las epifisis del fémur y se extrajo la médula ósea inyectando al interior del hueso 5ml de medio cultivo Mc Coy 5a modificado (Microlab) suplementado con 20 % de suero fetal de ternera (Microlab), previamente inactivado a 60°C durante 30 minutos en baño María; 2 % de L-Glutamina (Microlab) y 0.1 % de solución penicilina/estreptomicina (Microlab). El material fue colectado en una caja de petri y se resuspendió suavemente con ayuda de una pipeta pasteur. Se incubaron las células a 37°C en incubadora con 10 - 20% CO₂ en aire humidificado. La densidad celular utilizada fue de 3 millones de células por mililitro de medio de cultivo. Se incubaron las células antes del marcaje para su adaptación a las condiciones del medio durante aproximadamente 12 horas. La duración de los cultivos fue de 2 a 26 horas posteriores al pulso de marcado.

4.- Incorporación de la Timidina marcada con tritio (³H-TdR)

El pulso de marcado se realizó de acuerdo a la técnica de Egozcue, 1971 y Gray y col., 1981 con algunas modificaciones.

Se añadió a los cultivos ³H-TdR a una concentración de 0.1 uCi/ml con 17 Ci/mmol de Actividad específica (New England Nuclear) durante un lapso de 30 min continuando las células en incubación.

Lavado de la marca: Una vez terminado el tiempo en el cual las células incorporaron timidina tritiada, estas se colectaron por centrifugación a 1 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min. Se retiró el sobrenadante que contenía la marca radioactiva. Las células se resuspendieron en medio fresco libre de tritio o solución salina balanceada. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones. se volvieron a centrifugar las células a 1 000 rpm durante 10 min y se incubaron nuevamente en medio de cultivo libre de marca hasta el tiempo de cosecha deseado.

5.- Cosecha

Se cosecharon las células generalmente cada una o dos horas hasta completar 26 horas de cultivo, este procedimiento se realizó de acuerdo con la técnica propuesta por Egozcue, 1971., con algunas modificaciones propuestas por Ortiz (comunicación personal).

Una hora antes de la cosecha se agregaron a los cultivos 0.2 ml. de colcemida (Microlab) a una concentración de 10 ug/ml para la obtención de cromosomas en metafase y se dió inicio a la cosecha.

Se resuspendieron las células y se pasaron a tubos para centrifugarlos a 1 000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante dejando una pequeña cantidad de éste con el cual se resuspendieron los paquetes celulares agitando vigorosamente en un agitador eléctrico, se añadió gota a gota y con agitación constante 4 ml de solución hipotónica (KCl 0.057 M), incubando a 37°C. en baño de agua durante 20 min. Se centrifugo como antes y se desechó el sobrenadante dejando aproximadamente 0.75 ml. Se resuspendieron los paquetes vigorosamente, añadiendo gota a gota fijador (metanol:ácido acético en proporción 3:1). Se dejaron en reposo por diez minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron. Después se eliminó el sobrenadante y se volvió a añadir gota a gota el fijador hasta obtener a un volumen final de 4 ml. Se centrifugaron una vez más hasta que el sobrenadante apareciera transparente y el paquete celular blanco. Se dejaron aproximadamente 2 ml de fijador y se almacenaron a 40°C.

Veinticuatro horas después se hicieron las preparaciones siguiendo la técnica de secado a la flama. Las preparaciones se mantuvieron a temperatura de 40°C hasta el momento de exponerlas a la emulsión autorradiográfica.

6.- Autorradiografía por Emulsión (Dipping)

Exposición a la película fotográfica

En un cuarto oscuro, equipado con luz roja (Filtro Kodak Wratten No.2 con bombilla de 15 Volts), se preparó un baño María a 40°C. Se dejó fundir la emulsión fotográfica (Nuclear Emulsión NTB 2 Kodak obsequio del Laboratorio de Zoología de la Universidad de Brigham Young, E.U.A.) durante un lapso de 20 - 25 min. Se agregó una porción de la emulsión y una proporción igual de agua destilada en un recipiente con dimensiones algo mayores que las de un portaobjetos. Se colocaron dos portaobjetos espaldas con espaldas y se sumergieron en la emulsión durante 2 - 3 seg, colocándolos en una gradilla de plástico en posición contraria a como fueron sumergidos y se dejaron secar durante 0.5 - 1.5 hrs. Una vez secos los portaobjetos se colocaron en una caja de preparaciones o en una caja coplin guardándolos en la obscuridad. Se colocó en el interior de la caja con las preparaciones un bolsa pequeña conteniendo sulfato cálcico anhidro que actuó como desecante.

El tiempo óptimo de exposición a la película fotográfica fue de 5 días cuando la caja se dejó en el congelador a -40°C aproximadamente.

7.- Revelado y Fijación

Se realizó de acuerdo con la técnica de Egozcue, 1971 y Giménez-Martin y col 1985. Todas las soluciones utilizadas se mantuvieron a una temperatura aproximada de 18°C. Este procedimiento se realizó en cuarto oscuro bajo la protección de luz roja .

- a) Se colocaron los portaobjetos en revelador Kodak D 19 durante 3 min.
- b) Se transfirieron los portaobjetos a agua acidulada (ácido acético 1%) durante 2 min.
- c) Se pasaron a un vaso de coplin conteniendo agua destilada durante 2 min.
- d) Se expusieron a fijador ácido Kodak durante 5 min.
- e) Se realizaron tres lavados con agua destilada durante 5 min. cada uno.

8.- Tinción

Se realizó de acuerdo con la técnica de Egozcue, 1971.

- a) Se tñieron las preparaciones con Giemsa al 5% en una solución conteniendo fosfato dibásico (0.2 M), ácido cítrico (0.1 M), alcohol metílico y agua destilada durante 5 min.
- b) Se lavaron con agua corriente.

Con la utilización de esta solución amortiguadora se obtuvo una coloración azul pálido de los cromosomas, sobre los que destacan claramente los granos de plata.

9.- Análisis

El análisis del ciclo celular de médula ósea fue realizado de acuerdo con la técnica de MITOSIS MARCADAS propuesta por Quastler y Sherman, 1959.

Para cada tiempo de cosecha se realizó el conteo en ciego de 100 metafases consecutivas en cada preparación, obteniéndose la fracción de mitosis marcadas por tiempo de cosecha. Se considero una mitosis como marcada, cuando esta tuviera 5 ó más granos de detección autorradiográfica. Se analizaron tres preparaciones por tiempo se sacó el promedio de ellas, obteniéndose tres curvas.

Las fases del Ciclo Celular se dedujeron y sus longitudes se medieron de la manera siguiente (Gráfica 1) :

La fase G2 (Periodo postsintético o premitótico) se refiere al intervalo de tiempo entre la eliminación de la marca radioactiva y el tiempo cuando el 50% de las mitosis se encontraron marcadas. En este punto se incluye también la mitad del periodo mitótico por lo que se le denomina G2+1/2M

La fase S (Periodo de Sintesis de ADN). El intervalo de tiempo entre los puntos de las líneas o curvas ascendentes y descendentes de la primera onda (curva), que correspondan al 50% de las mitosis marcadas.

La fase G1 (Periodo presintetico o postmitótico) puede ser calculada de la manera siguiente:

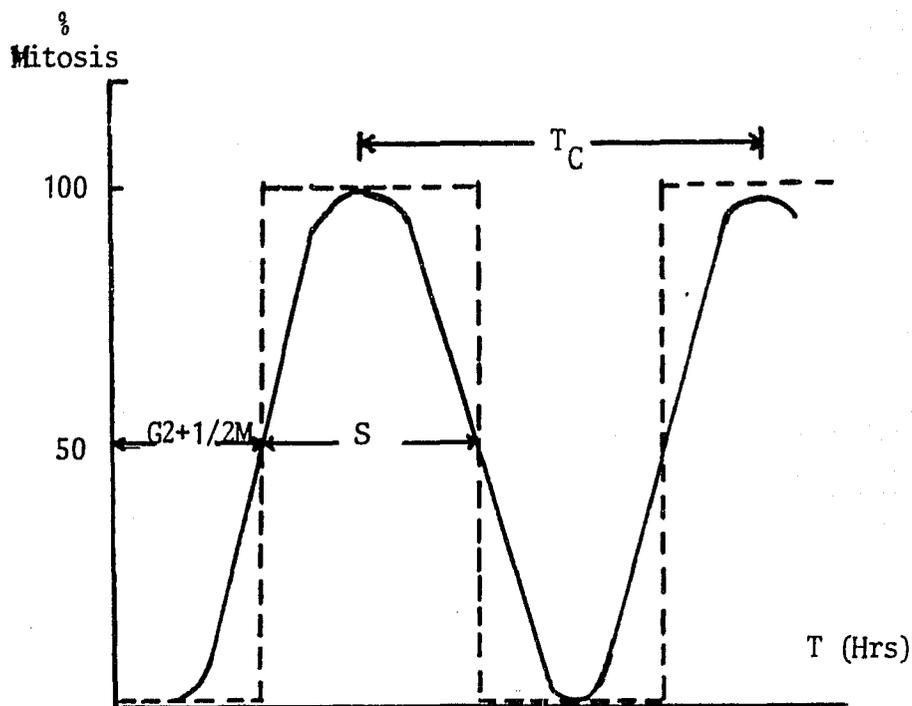
$$G1+1/2M = Tc - (G2+1/2M + S)$$

donde:

Tc = Duración del Tiempo Total de Ciclo Celular.

GRAFICA 1.

ANALISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA CON EL METODO DE LA FRACCION DE MITOSIS MARCADAS.



IV. RESULTADOS

1) Evaluación de la Desnutrición experimental respecto al peso corporal

Desnutrición

Al nacimiento se tomó una población homogénea, mostrando un peso corporal promedio para las ratas que conformaron el lote experimental de 6.7 ± 0.6 g y para las ratas testigo 6.6 ± 0.5 g.

Las ratas de ambos grupos se pesaron cada tercer día durante 21 días y se observó que el lote experimental, integrado por camadas constituidas por una nodriza con 15 lactantes, mostró una menor ganancia en el peso al mostrado por el lote testigo integrado por camadas de una nodriza con 6 lactantes (Cuadro 1), (Gráfica 2).

Al término de la lactancia, determinada a los 21 días después del nacimiento, y antes de ser sacrificadas, se verificó el peso de las ratas, siendo para las ratas experimentales el peso promedio obtenido de 20.9 ± 2.5 g y 40.3 ± 4.4 g para las ratas testigos observándose una diferencia significativa en el peso corporal mostrado entre ambos grupos de lotes, con una reducción en peso corporal del 48% en las ratas desnutridas con respecto a los testigos lo cual se considero que los organismos experimentales tenían una desnutrición calórico-proteica grave ($t = 20.64$, gl 48, $p < 0.001$) (Gráfica 3).

Otras diferencias morfológicas y fisiológicas que se observaron a los 21 días se observaron entre las ratas del lote experimental y las del lote testigo fueron (Figura 2): una clara desigualdad en el tamaño; disminución en la capa de pelo, el cual se presentaba erizado y su comportamiento se caracterizó por presentar inseguridad y miedo; la cantidad de tejido adiposo depositado en el abdomen se encontró disminuido; también se observó una excesiva fragilidad en los huesos, lo cual era evidente al momento de realizar la extracción de la médula ósea.

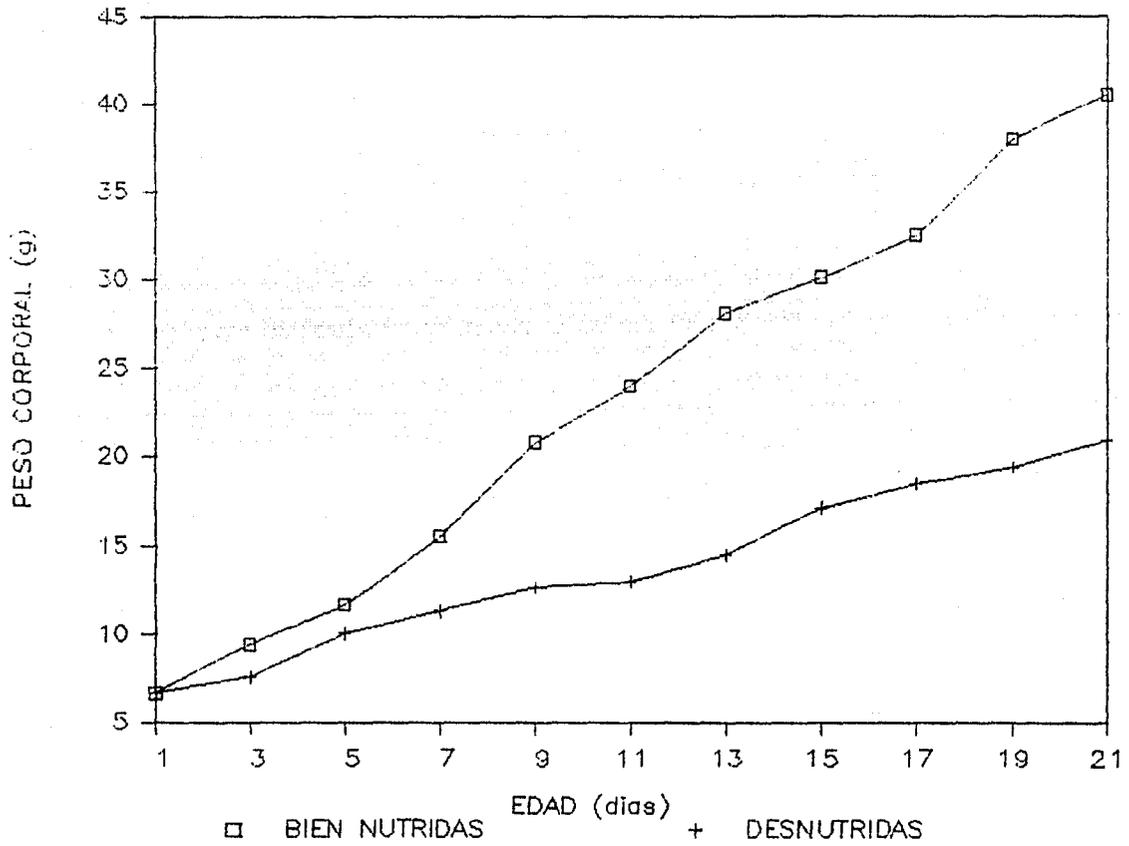
CUADRO 1

PESO CORPORAL (g) DE RATAS TESTIGO Y DESNUTRIDAS DESDE EL DIA SIGUIENTE A SU NACIMIENTO HASTA EL DESTETE (21 DIAS) DE EDAD.

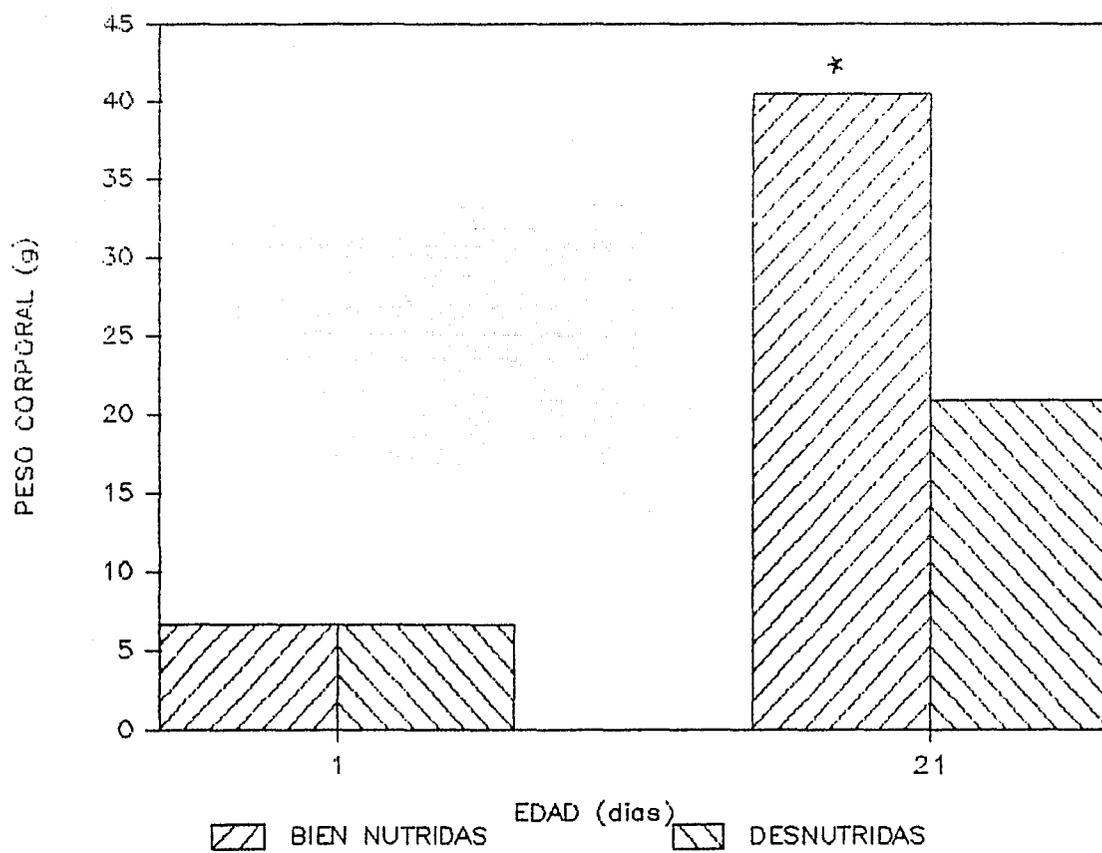
DIA	<u>TESTIGOS</u>		<u>DESNUTRIDAS</u>		PERDIDA DE PESO %
	PESO \pm D.E.*		PESO \pm D.E.*		
1	6.6	0.5	6.7	0.6	---
3	9.4	0.8	7.6	1.0	19.3
5	11.7	0.7	10.0	1.0	13.9
7	15.5	1.1	11.4	0.9	26.8
9	20.8	2.3	12.7	1.5	39.2
11	24.0	2.4	13.0	1.2	46.0
13	28.2	0.7	15.5	1.5	48.6
15	30.1	3.1	17.1	1.9	43.1
17	32.5	2.7	18.5	2.8	43.0
19	37.9	4.1	19.4	2.9	48.9
21	40.3	4.4	20.9	2.5	48.0

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

GRAFICA 2. INCREMENTO EN PESO DE RATAS
DE 1 A 21 DIAS DE EDAD.



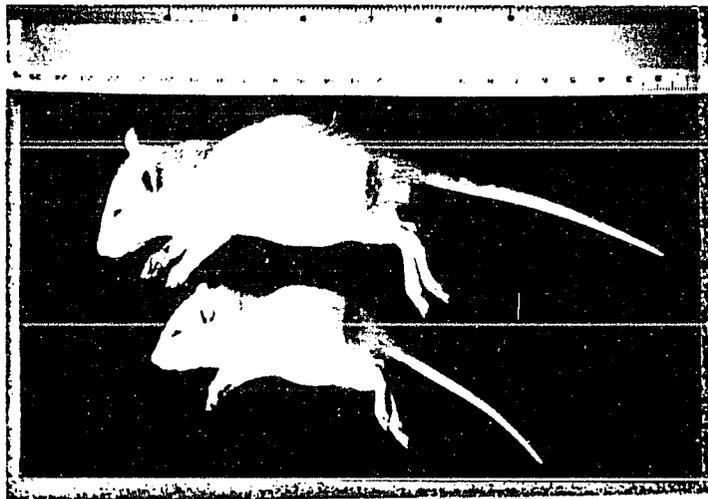
GRAFICA 3. DIFERENCIA EN PESO ENTRE RATAS BIEN NUTRIDAS Y DESNUTRIDAS.



* Diferencia significativa $t = 20.64$; $gl\ 48$; $p < 0.001$

FIGURA 2.

COMPARACION DE CARACTERISTICAS EXTERNAS
ENTRE RATAS BIEN NUTRIDAS (Arriba) Y
DESNUTRIDAS (Abajo) DE 21 DIAS DE EDAD.



2).- Ciclo Celular

En la figura 3. a) se muestra una figura metafásica marcada y b) una metafase no marcada.

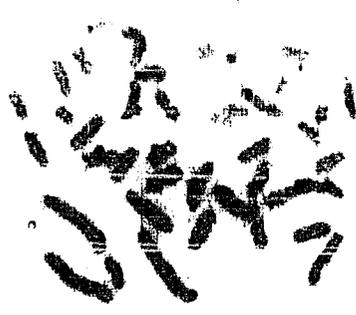
El análisis de la fracción o porcentaje de mitosis marcadas se llevó a cabo mediante el conteo 100 metafases consecutivas en cada una de las preparaciones obtenidas por cultivo y el promedio se obtuvo tomando el porcentaje total de mitosis marcadas entre el número de preparaciones. Con los datos obtenidos se construyó el Cuadro 2 se muestra las horas de incubación, el número de cultivos analizados y el porcentaje de mitosis marcadas por tiempo.

La gráfica 4. se construyó colocando en las ordenadas la fracción de mitosis marcadas (% MM) y en las abscisas, los tiempos de incubación. Como se puede apreciar, a las cero horas no se encontraron mitosis marcadas para ninguno de los dos grupos, apareciendo las primeras metafases marcadas en el grupo experimental a las 2 horas de incubación con un de 12% en tanto que las células de las ratas testigo no presentaron porcentaje alguno en este tiempo de incubación. Para las 3 horas de cultivo la fracción de mitosis marcadas en las células de las ratas de desnutridas fue de 71% . siendo en tanto este tiempo el momento en que aparecen las mitosis marcadas en las células de las ratas testigo observándose un porcentaje de 40%. A partir de este momento hubo un aumento en la fracción de mitosis marcadas para ambas poblaciones de células llegando a un máximo de 90% en el caso de las ratas desnutridas a las cinco horas y manteniéndose hasta las 7 horas después de iniciado el cultivo, en tanto que los puntos máximos mostrados por las células de las ratas testigo se muestran a partir de las 5 horas y se mantienen hasta las 9 horas de incubación y los porcentajes mostrados fueron 89, 94, 94, 90, y 88 respectivamente. A partir de las 8 horas de incubación hubo un considerable decremento en el porcentaje de mitosis que presentaron rastros de incorporación del precursor radiactivo. En el grupo de las ratas desnutridas, este persiste hasta las 18 horas de incubación, excepto a las 12 horas en la cual se presentó un pequeño incremento con respecto al tiempo anterior aunque no significativo. En el caso de las células de las ratas testigo, el decremento de marcaje fue posterior al mostrado por las ratas experimentales, el cual se mostró a las 9 horas de incubación y llegó a su mínimo de porcentaje a las 15 horas de cultivo. El porcentaje de mitosis que nuevamente mostraron incorporación de la marca radioactiva en las células de las ratas desnutridas mostró un incremento considerable a partir de las 18 horas y se mantuvo hasta las 26 horas de incubación en tanto que el incremento en el porcentaje de mitosis marcadas en las células de los organismos testigo fué a partir de las 15 horas tiempo en el cual se mantuvo hasta las 26 horas de incubación.

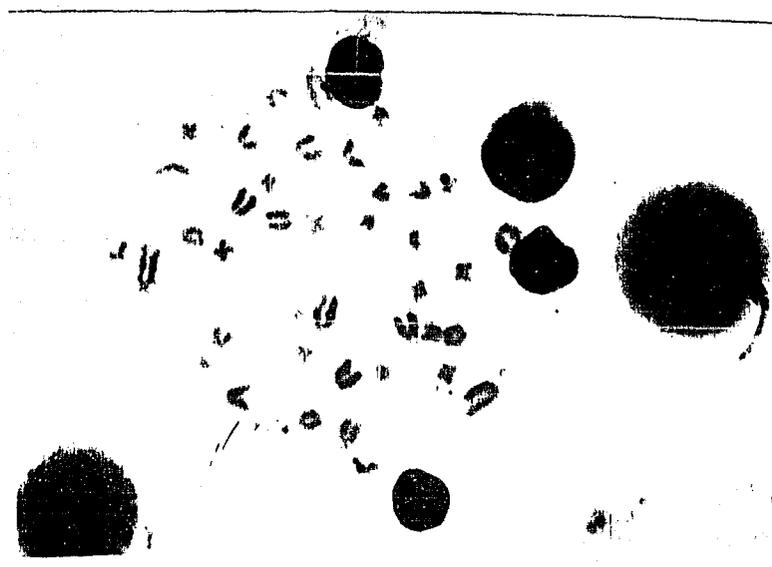
En el Cuadro 3 se muestran las mediciones realizadas de las tres curvas obtenidas en promedios y desviaciones estandar respectivas para cada población. En lo que se refiere a las células de las ratas desnutridas, los

FIGURA 3.

FIGURA METAFASICA CONSIDERADA COMO
MARCADA (a), y (b) UNA METAFASE
CONSIDERADA NO MARCADA.



(a)



(b)

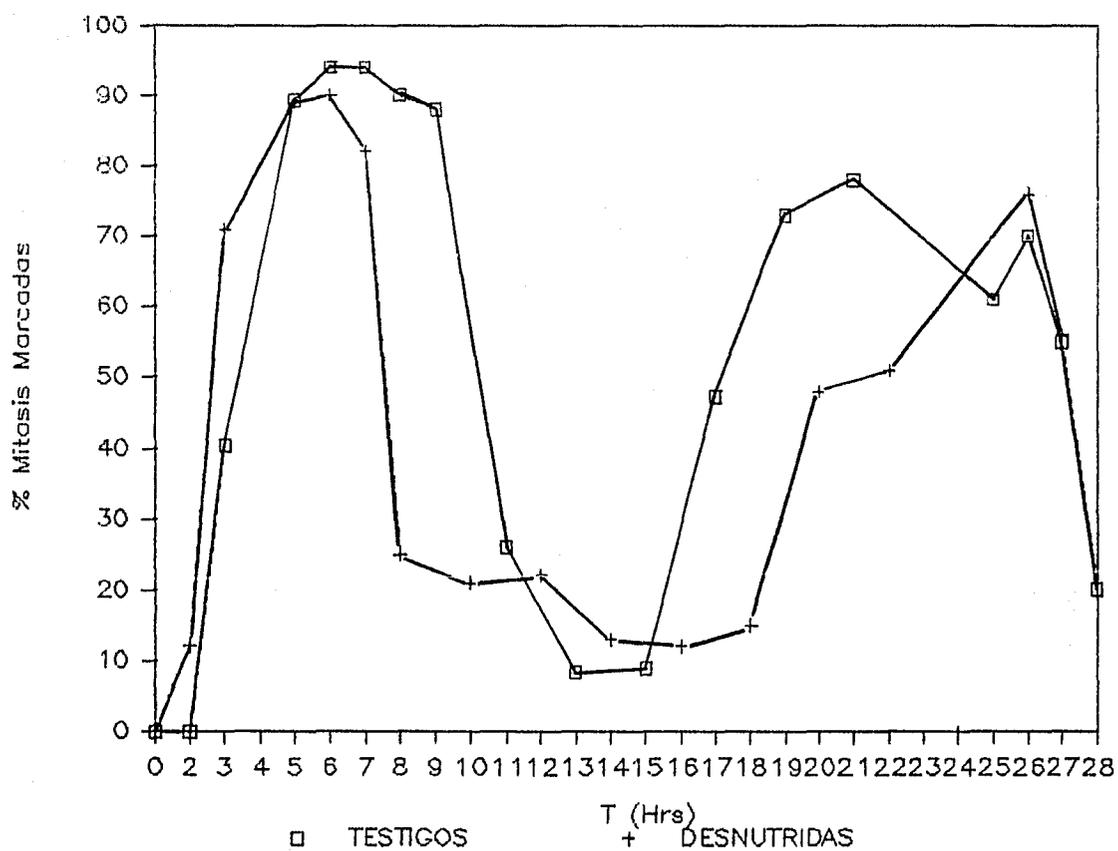
CUADRO 2 .

FRACCION DE MITOSIS MARCADAS *in vitro* EN CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATAS DESNUTRIDAS Y BIEN NUTRIDAS.

Tiempo de cosecha (hrs)	<u>Ratas Desnutridas</u>		Tiempo de cosecha (hrs)	<u>Ratas Bien Nutridas</u>	
	Fraccion de mitosis marcadas (%) X ± D.E.			Fraccion de mitosis marcadas (%) X ± D.E.	
0	0.0	± 0.0	0	0.0	± 0.0
2	12.0	± 15.2	2	0.0	± 0.0
3	71.0	± 11.1	3	40.0	± 16.0
5	89.0	± 2.0	5	89.0	± 5.5
6	90.0	± 2.6	7	94.0	± 2.6
7	82.0	± 7.5	8	90.0	± 4.9
8	25.0	± 27.6	9	88.0	± 14.0
10	21.0	± 18.8	11	26.0	± 3.5
12	22.0	± 18.8	13	8.3	± 4.0
14	14.0	± 12.0	15	9.0	± 5.3
16	12.0	± 9.5	17	47.0	± 5.1
18	14.8	± 10.0	19	73.0	± 14.2
20	48.0	± 3.6	21	78.0	± 3.6
22	51.0	± 5.0	25	61.0	± 10.0
26	76.0	± 8.5	26	70.0	± 2.6
27	56.0	± 17.0	27	54.7	± 2.9

El numero de mitosis analizadas por cultivo fue de 100 y promedio mostrado es de 300 mitosis.

GRAFICA 4. PORCENTAJE DE MITOSIS MARCADAS EN
MEDULA OSEA DE RATAS BIEN NUTRIDAS
Y DESNUTRIDAS DE 21 DIAS DE EDAD.



CUADRO 3 .

DURACION DEL CICLO CELULAR Y SUS FASES EN
RATAS DESNUTRIDAS Y TESTIGO DE 21 DIAS DE EDAD.

Fase	Ratas Testigo			$\bar{X} \pm D.E.$
	Duracion T (Hrs)			
	I	II	III	
$G_2 + \frac{1}{2} M$	3.80	3.60	2.80	$3.40 \pm 0.53^*$
S	6.40	6.80	7.60	$6.80 \pm 0.80^*$
$G_1 + \frac{1}{2} M$	4.40	3.00	3.40	$3.60 \pm 0.72^{**}$
T_c	14.20	13.40	13.80	$13.80 \pm 0.40^{**}$

	Ratas Desnutridas			$\bar{X} \pm D.E.$
	I	II	III	
$G_2 + \frac{1}{2} M$	2.80	2.50	2.50	2.60 ± 0.17
S	4.40	4.80	6.30	5.16 ± 1.00
$G_1 + \frac{1}{2} M$	12.60	10.70	9.40	10.90 ± 1.61
T_c	19.80	18.00	18.20	18.66 ± 0.98

* Estadísticamente significativo $p < 0.05$ ** Estadísticamente significativo $p < 0.001$

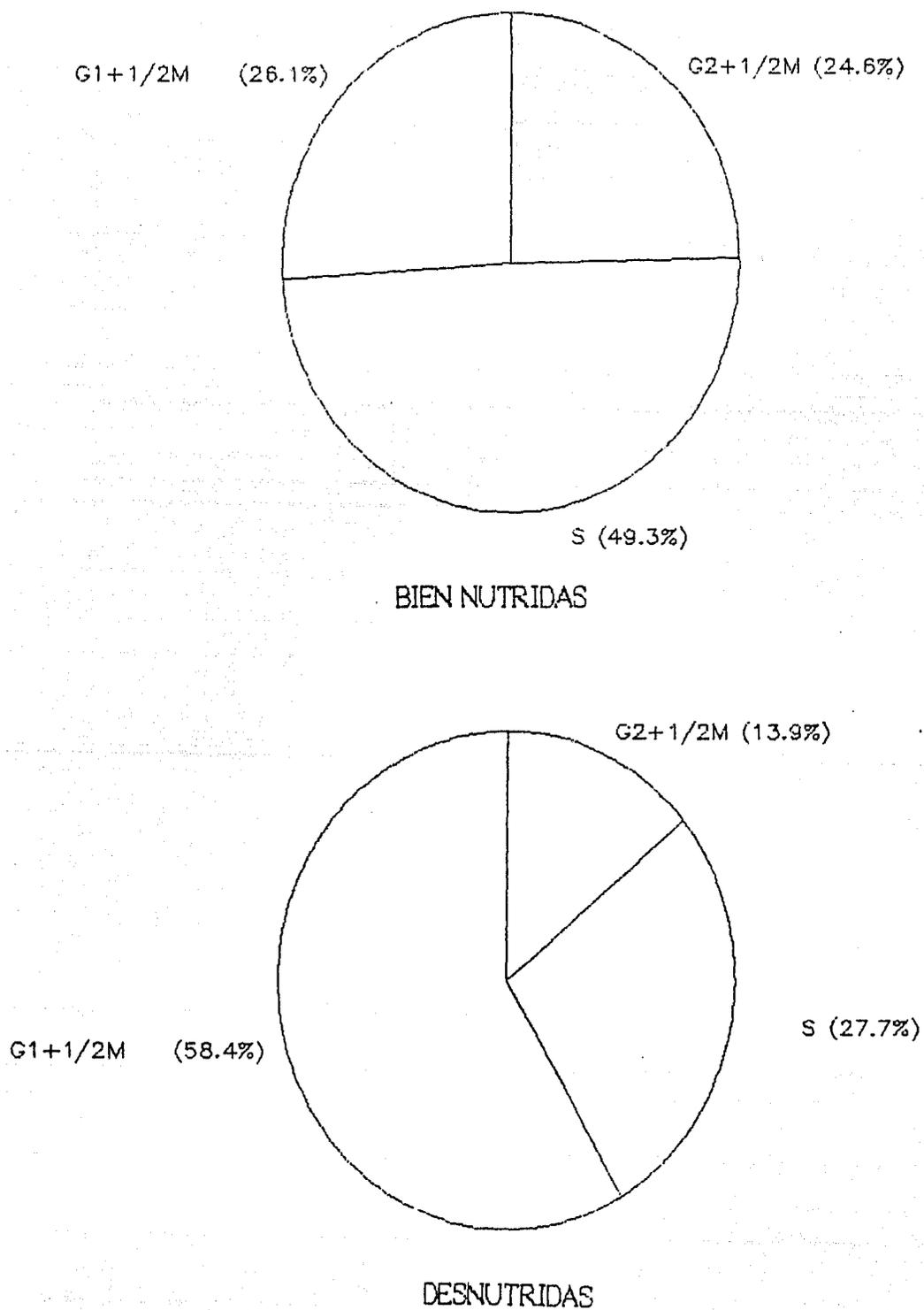
tiempo de duración obtenidos para la fase G2+1/2M fueron desde 2.5 horas hasta 2.8 con un promedio de 2.6 ± 0.17 horas, para la etapa de síntesis del ADN los tiempos de duración obtenidos por este método gráfico presentaron un intervalo de 4.40 hasta 6.30 horas con un promedio de 5.16 ± 1.00 horas, mientras que los tiempos de duración del periodo G1+1/2M mostraron valores de 9.40 a 12.60 horas con un valor promedio de 10.90 ± 1.61 horas. Los tiempos de duración que se obtuvieron para las ratas testigo mostraron un intervalo de 2.80 horas como valor mínimo a 3.80 horas como valor máximo obteniendo un promedio de 3.40 ± 0.52 horas, para el periodo G21/2M, el tiempo de duración mínimo fue de 4.40 horas en tanto el máximo fue de 6.30 y el promedio de la fase S fue de 6.80 ± 0.80 horas y para la etapa de G1+1/2M su duración mínima fue de 3.40 y una máxima de 4.00 dando un promedio de 3.60 ± 0.72 horas.

Se empleó la prueba de t de Student para comprobar si existía significancia estadística entre ambos lotes para cada fase del ciclo y lo que se obtuvo fue que para la fase G2+1/2M al existió diferencia ($t = 2.58$, gl 4, $p > 0.05$), asimismo la fase S presentó diferencia ($t = 2.21$, gl 4, $p > 0.05$), en tanto que en la fase presintética o G1+1/2M mostró una diferencia altamente significativa ($t = 8.29$ gl 4, $p < 0.001$).

El tiempo de ciclo calculado en este método gráfico se muestra en el Cuadro 3, donde se presentan los valores obtenidos a partir de tres las tres curvas obtenidas a partir de la fracción de mitosis marcadas. Los valores de duración para las ratas desnutridas fueron de 17.20 horas como valor mínimo y de 19.80 horas como máximo dando un promedio de 18.66 ± 0.98 horas, en tanto que los valores para las ratas testigo fueron 13.40 como valor mínimo y 14.20 horas como máximo con un promedio de 13.80 ± 0.40 horas. Para ver si había significancia estadística entre ambos grupos de células respecto a la duración del ciclo celular se empleó la prueba de t de Student la cual mostró una diferencia significativa ($t = 5.66$, gl 4, $p < 0.001$) en favor de los organismos testigo.

En la Gráfica 5 se muestra la proporción que representa para cada fase en el ciclo celular para cada lote de ratas. Como se observa en las ratas desnutridas, el porcentaje que ocupa la fase G2+1/2M fue de 13.9%, en tanto que el periodo de síntesis del ADN presentó un porcentaje de 27.7% y la fase G1+1/2M la proporción que esta guarda en el ciclo fue de 58.4%. La proporción obtenida para las ratas testigo fue para la fase G2+1/2M de 24.6, para la etapa S el porcentaje observado fue de 49.3%, en tanto que el periodo G1+1/2M mostró una proporción del 26.1%.

GRAFICA 5. DURACION DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR EN PORCENTAJE EN RATAS TESTIGOS Y DESNUTRIDAS.



V.- DISCUSIÓN

1).- Peso corporal

Los datos en relación al aumento en peso corporal muestran que las ratas sometidas a la desnutrición experimental por deficiente cantidad de alimento muestran rápidamente un retraso del incremento en el peso corporal, observándose ya a los 9 días tienen una diferencia de aproximadamente 40 % y esta diferencia llega a ser del 48 % 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. Además presentaron algunas características físicas típicas en la desnutrición como el erizamiento del pelo y la falta de respuesta a los estímulos externos, entre otras. 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, lográndose obtener DCP en una de las etapas más importantes de los organismos, ya que presentan durante ella un crecimiento y desarrollo más rápidos por lo que son más susceptibles a las agresiones del medio externo (Morgane y col, 1978 ; Gonipath y Roy, 1986). El método de incrementar el número de crías por camada se considera que resulta menos drástico y causa menor daño emocional a crías y madres 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 y col en 1973, o inutilizar algunas glándulas mamarias de la madre como lo propusieron Galler y Turkewitz en 1977, y Codo y Carlini en 1979, aunque este daño no puede ser descartado del todo, ya que se pueden presentar alteraciones en aspectos como el cuidado materno.

2).- Ciclo Celular

En este trabajo se confirma la eficiencia de la técnica de incorporación de timidina marcada con tritio, ya que permite la identificación de células individuales marcadas. Ha sido demostrado que la timidina es utilizada eficientemente en la síntesis de ADN por las células en crecimiento (Cronkite y col, 1959). La cinética de marcado obtenido sigue el comportamiento de dos oleadas característico del tipo de análisis que se pretendió realizar, como el que se muestra en la grafica 1, donde presenta la fracción de mitosis marcadas en función del tiempo después de una exposición a timidina tritiada.

Las líneas en sólido representan la curva ideal que se puede obtener si todas las células tuvieran la misma velocidad tanto de ciclo como de síntesis del ADN. Sin embargo se debe considerar que la velocidad de síntesis del ADN no es constante en el paso por la fase S, ya que las células a diferentes partes de la fase S toman diferentes cantidades de $^3\text{H-TdR}$, y esto puede llevar a que las células sean mal designadas a las fases G1 y G2 (Gray, 1983b y Dean, 1986), o bien puede ser que la fracción celular en fase S este compuesta de subpoblaciones celulares que muestran diferentes velocidades de duplicación del ADN. La segunda suposición parece ser la más cercana a la realidad ya que la médula ósea se encuentra constituida por distintas subpoblaciones celulares (Baserga, 1981).

La entrada a la fase de síntesis en las células de organismos desnutridos al parecer es más rápida que la de los organismos bien nutridos, esto puede ser explicado de muy diversas formas. Si se considera el trabajo de González y col (1986) quienes observan que los linfocitos de niños desnutridos en en las primeras horas de cultivo presentan una más intensa proliferación, ya que estos mostraron una significativa cantidad de células que han pasado por dos ciclos de replicación respecto a los niños eutróficos, de ahí que proponen que los linfocitos de los niños desnutridos puedan venir previamente estimulados. Por otro lado, en el estudio de Gómez y col (1986), la proliferación celular *in vitro* en médula ósea evaluada por el incremento en el número de células, determinaron que en las primeras horas de cultivo las células de las ratas desnutridas aumentan con mayor intensidad que las células de las ratas testigo, cuando se colocan en un medio rico, es posible que en la superficie de las células desnutridas existan receptores a ciertos factores que al presentarse en el medio rico permita el desencadenamiento del programa de duplicación en un mayor número de células respecto a las ratas bien nutridas. Así la diferencia en velocidad de proliferación puede ser esclarecida obteniendo en índice de estimulación en por el cual se puede contemplar únicamente a la fracción de células que se encuentran proliferando activamente o bien están siendo estimuladas es estas condiciones de cultivo.

El tipo de análisis gráfico realizado en este trabajo permite la medición directa de la longitud de las cuatro fases del ciclo celular. Los resultados se presentan en el Cuadro 3, y muestran que las células de los organismos testigo presentan un tiempo de ciclo calculado de 13.8 ± 0.40 horas mientras que las ratas desnutridas muestran un tiempo de ciclo de 18.6 ± 0.98 horas. 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 Mathur y Deo en 1978 quienes mediante la incorporación de precursores radiactivos determinaron un alargamiento en la duración del ciclo celular en diversos tejidos de ratas desnutridas.

Los resultados obtenidos en este estudio pudieran considerarse en lo que a la duración de las fases se refiere, ya que en estudios realizados in vivo se ha demostrado que las fases del ciclo celular que preferencialmente se encuentran alteradas son G2 y S. Deo y col 1975 propusieron que las fases del ciclo celular que son afectadas por la desnutrición son la fase G2 por ser la más sensible a la privación de energía y la fase S por ser más sensible a la deficiencia de proteínas, permaneciendo la fase G1 sin alteración. En otros trabajos realizados por los mismos autores se propuso un alargamiento de la fase M y reportaron que la lesión fundamental causada por la desnutrición en órganos de alta renovación celular es una depresión de la proliferación celular con una pequeña alteración en la concentración de ARN y proteínas. Sin embargo cabe aclarar que los trabajos realizados por Deo y colaboradores fueron in vivo que es una condición totalmente distinta a la condición in vitro.

Así mismo Bansal-Rajbanshi y Mathur en 1985 encontraron, en células germinales, que ni la duración total del ciclo ni la de la fase G2 se veían alteradas, siendo más corta la fase G1 y observándose 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 proponiendo además, que esto puede representar una adaptación para compensar la disminución en la velocidad de síntesis de ADN, la cuál debe concluir antes de iniciarse la división celular.

El observar en este estudio que existe diferencia en duración en las cuatro fases del ciclo, ya que se encontró que existe una mínima diferencia significativa en la etapa de S y en G2 + 1/2M, sin embargo la etapa G1 + 1/2M existe una diferencia altamente significativa y es esta al que da el pronunciado alargamiento en el tiempo total del ciclo en las células de las ratas desnutridas. Asimismo nos hace pensar que en la condición de cultivo al encontrarse las células de las ratas desnutridas en un medio rico el efecto de la desnutrición se encuentra enmascarado y solo permite ver un fuerte daño, que puede representar un alargamiento en la fase G1 + 1/2M. Respecto al punto anterior se puede aseverar que como se ha propuesto en la fase G1 existe de un punto de transición o restricción (Pardee y col, 1978), el cual puede hacer posible este alargamiento observado en las células de los organismos desnutridos en esta fase y sea un reflejo de su existencia, o bien la falta de un factor estimulante para proseguir en el ciclo, respecto a esto, se ha propuesto en la proliferación células progenitoras de granulocitos-macrófagos una dependencia a la presencia de factores estimuladores de colonias, debido a que si este no está presente en el medio las células se detienen en la fase G1 del ciclo celular (Pluznik y col, 1984). Por otro lado se observa que la condición in vitro puede promover en las células un comportamiento distinto. En el caso de estudios in vitro, Krishna y col en 1986 propusieron 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 comparar los datos obtenidos in vitro con los obtenidos in vivo se observa que al parecer la condición in vitro logra disminuir el efecto que la desnutrición causa en las células de la médula ósea in vivo. 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. Así como analizar los componentes de membrana en las células desnutridas para poder llegar a esclarecer el porque las células desnutridas tienen una velocidad de inicio de proliferación más pronunciada que los organismos testigos. Estudios que también pueden aportar información son los referidos al índice de estimulación.

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 ³H-TdR para realizar este tipo de análisis es mínima. Además, se tiene control del ambiente fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, oxígeno y dióxido de carbono) (Freshney, 1983; Kruse y Patterson, 1973). Aunque también 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.

El ambiente in vitro para médula ósea utilizado en este estudio es favorable para división celular pero no para la diferenciación. La división celular en cultivo en suspensión se da en las primeras 48 horas de cultivo (Reisner, 1959). Las células en suspensión entran fácilmente en estado de mitosis y se dividirán si las condiciones son favorables. El tipo de cultivo en suspensión tienen muchas ventajas que le hacen ideal en estudios a corto plazo. Las células pueden ser contadas, mantienen sus características morfológicas que las identifican y en las muestras pueden ser determinadas la radiactividad o el conteo con la frecuencia deseada (Reisner, 1959).

Los resultados del presente estudio con un tiempo de duración de ciclo de 13.8 horas son comparables con el estudio de Ortiz, 1987 quien utilizando la incorporación de BrdU en un cultivo en suspensión para médula ósea de rata obtuvo un tiempo total de ciclo de 17.5 horas, asimismo cercano al reportado por los autores mencionados anteriormente. Las discrepancias entre el presente trabajo y el de Ortiz, 1987 es quizás debido a utilización de una metodología distinta para el mismo propósito, sin embargo también las posibles variaciones en la obtención de los porcentajes de mitosis marcadas podrían explicar esta diferencia, ya que está bien establecido que el conteo de las mitosis sin marcado puede variar considerablemente entre individuos (Shackney, 1975a). Asimismo puede influir la incertidumbre de poder delimitar una célula marcada de una que no debería ser considerada. Estos factores combinados pueden hacer imprecisa la estimación gráfica el tiempo del ciclo celular.

Para dar mayor realce a los resultados del análisis gráfico de los datos de la Fracción de Mitosis Marcadas, en un futuro es probable hacer correcciones considerando diferentes características tales como: que las células dejen de ciclar, se diferencien o mueran, ya que con este fin se han desarrollado procedimientos de análisis matemático (Shackney, 1974 ; Potten y col. 1985).

Una manera de estimar la confiabilidad de los resultados obtenidos en cuanto al tiempo total del ciclo respecta es compararlos con los obtenidos con otras metodologías como : tinción diferencial de cromátidas hermanas, fracción de mitosis marcadas y la curva de crecimiento exponencial en médula ósea de rata en condiciones de cultivo. Con los datos obtenidos mediante la tinción diferencial de cromátidas Ortiz, 1987 obtuvo un tiempo de generación de 17.5 horas, mientras que por autorradiografía el tiempo de ciclo obtenido fue de 13.8 horas. Por último al analizar la curva de crecimiento exponencial, se encontró que el tiempo de duplicación fue de 11.3 horas (datos no publicados). Al comparar estos resultados entre sí se hace evidente que existe un retraso en la proliferación celular expresado como tiempo total de ciclo que es más largo en las células de médula ósea de las ratas bien nutridas cuando es utilizado algún análogo para la determinación del tiempo de generación o de ciclo (ver Cuadro 4).

Considerando las células de ratas normales sin incorporación de análogos químicos como testigos, cuando es utilizada la 3H-TdR se observa que el retraso no fue tan severo con una diferencia de 2.00 horas, comparado con el retraso obtenido para la BrdU que fue de 5.7 horas. Estas variaciones pueden ser debidas, como ya se hizo énfasis anteriormente principalmente al hecho de que son metodologías que tienen imperfecciones en sus criterios de medición.

Un punto de suma importancia que es pertinente mencionar es el hecho de que, independientemente de la técnica utilizada para determinación del tiempo de generación o ciclo, el efecto en el alargamiento del tiempo de generación en las células de las ratas desnutridas experimentalmente es inherente a esta condición y es independiente de las técnicas empleadas para el estudio de la proliferación celular. El retraso observado para cada metodología se presentó: para la curva de crecimiento exponencial de 6.3 horas, para la medición del tiempo de generación empleando BrdU fue de 2.6 horas en tanto que para el análogo radioactivo (3H-TdR) fue de 4.5 horas.

Como ya se sabe, tanto, la BrdU como la 3H-TdR pueden ser tóxicos para las células. En relación a los efectos que causa la 3H-TdR muchos investigadores han enfatizado la necesidad de tener precaución cuando se emplean precursores del ADN marcados radiactivamente, pues se ha reportado que en el ADN celular causan anomalías biológicas graves incluyendo mutaciones, aberraciones cromosómicas, muerte celular, retardo en la proliferación celular y rompimiento de las cadenas del ADN (Ehmann y col. 1975). La variación en la radiosensibilidad en el ciclo celular y el retardo

CUADRO 4 .

DURACION DEL CICLO CELULAR *in vitro* EN MEDULA OSEA DE RATAS DESNUTRIDAS Y BIEN NUTRIDAS, MEDIDO POR DISTINTAS METODOLOGIAS.

	<u>Ratas</u>		<u>Diferencia</u>	
	<u>Testigo</u> T (Hrs)	<u>Desnutridas</u> T (Hrs)	<u>Entre lotes</u> T (Hrs)	<u>Entre tecnicas</u> T (Hrs)
<u>Tecnica:</u>				
Tiempo de duplicacion ¹	11.8	18.1	6.30	---
Tincion diferencial entre cromatidas hermanas ²	17.5	21.0	2.60	5.70
Autorradiografia ³	13.8	18.6	4.80	2.00

¹ Gomez y col, 1986 (datos no publicados)

² Ortiz, 1987

³ Datos del presente trabajo.

inducido por la radiación ha sido demostrado en células que crecen in vitro, que son detenidas en la fase G2, mientras que las fases S y G1 son menos afectadas. Las células con una alta proliferación, como la médula ósea e intestino, continúan en el ciclo después de un corto retraso y pueden entonces mostrar fluctuaciones cíclicas en la sensibilidad hasta que comienzan a redistribuirse al azar en el ciclo (Denekamp, 1986).

Por último, es muy interesante mencionar que a pesar de todo lo expuesto anteriormente, el hecho de que a través de tres métodos diferentes realizados en el mismo laboratorio, se hayan obtenido resultados similares, en este caso alargamiento del ciclo celular en las células de las ratas desnutridas es muy significativo.

CONSIDERACIONES FINALES

Como se ha demostrado en animales de experimentación o estudiando órganos aislados, estos exhiben periodos de crecimiento temprano, en los cuales incrementan rápidamente su número de células. Durante este periodo el animal y/o órgano son más sensibles al estado de deficiencia nutricional.

El estudiar los efectos de la desnutrición en animales de experimentación permite controlar algunas de las variables que la acompañan en humanos como son: las infecciones, que incluso en algunos casos no se manifiestan y el evitar la ingestión de medicamentos, puesto que ambos factores pueden alterar los resultados y al controlarlos se revelan los efectos causados solo por la desnutrición.

La desnutrición durante la lactancia afecta severamente la proliferación celular ocasionando un alargamiento en la duración total del ciclo celular y el método empleado para inducir desnutrición experimental es efectivo, siendo el peso corporal un parámetro muy claro de DCP.

Se confirmó que la timidina marcada con tritio (^3H -TdR) es un marcador adecuado del ADN que permite mediante el empleo de la autorradiografía obtener la duración del ciclo celular y el de cada una de sus fases. Mediciones que por otros métodos no pueden ser determinados. Aún cuando la facilidad de obtener la duración total del ciclo por otros métodos es eficiente, y a pesar de que la autorradiografía es un método muy laborioso y tardado proporciona información más detallada en cuanto a la duración de las fases del ciclo celular.

Se confirma que la duración del ciclo está retrasado en las células de las ratas desnutridas y se propone que el daño causado por la desnutrición observado en condiciones de cultivo es en todas las fases del ciclo, siendo este mínimo para las fases S y $G_2+1/2M$, y más fuerte para el periodo $G_1 + 1/2M$ el cual está indicado por un pronunciado alargamiento.

La médula ósea es un excelente sistema de estudios a nivel citogenético pues, con excepción de la piel es el tejido de más fácil obtención y cultivo, con una alta tasa de proliferación.

La limitante principal en los estudios citogenéticos con médula ósea es considerar a las distintas poblaciones que contiene como una muestra homogénea, ya que no se puede determinar si todas las poblaciones son afectadas de la misma manera.

BIBLIOGRAFIA

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

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

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, 1332-1333.

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.

Betancourt, M. y González, H. (1986) Características de la proliferación celular en fibroblastos de ratas severamente desnutridas durante la lactancia. *Inv. Pediátrica*, 63, 36-51.

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.

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

Chandra, R.K. (1979) T and B lymphocyte subpopulation and leukocyte terminal deoxynucleotidyl transferase in malnutrition. *Acta Paediat. Scand.* 68, 841-845.

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

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

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.

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 Symposium 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 is a problem of ecology, *Bibl. Nutr. Diet No. 14* (Kager, 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.. (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. (1982) Nutrición, crecimiento y desarrollo. En: *La investigación biomédica en México. Pasado, presente y futuro.* (Academia de la Investigación Científica, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, eds.) pp 103-123.

Cronkite, E.P., Fliedner, T.M., Bond, V.P., Rubini, J.R., Becher, G. y Quatler, H. (1959) Dynamics of hemopoietic proliferation in man and mice studied by 3H-thymidine incorporation into DNA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 77, 3, 803-820.

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

Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Xue, S-B. y Melamed, M.R. (1981) Effect of n-butyrate on cell cycle progression and in situ chromatin structure of L 1210 cells. *Exp. Cell Res.*, 136, 279-293.

Davidson, J.N. (1976) *Davidson's the biochemistry of of the nucleic acid.* 8a ed. London. Chapman and Hall. 420 pp.

Dean, P.N. (1986) Data analysis in cell kinetics research. En: *Techniques in cel cycle analysis* (Gray, E. y Darzynkiewicz, Z. eds). Humana Press. New Jersey. pp 207-253.

Denekamp, J. (1986). Cell kinetics and radiation biology. *Int.J. Radiat. Biol.*, 49, 2, 357-380.

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. New York. pp 1-15.

a

Egozcue, J. (1971) Técnicas en citogenética. 1 .ed. Ed Espaxs. Barcelona. 144 pp.

Ehmann, U.K., Williams, J.R., Nagle, W.A., Brown, J.A., Belli, J.A. y Lett, J.T. (1975) Perturbations in cell cycle progression from radioactive DNA precursors. Nature (London)., 258, 633-636.

Fernández, G y Yuniz, E.L (1976) Supresion of adenocarcinoma by the immunological consequences of calorie restriction. Nature.. 263, 504.

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.

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

Friedkin, M., Tilson, D y Roberts, D. (1956) Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissues with thymidine-C14. J. Biol. Chem., 220, 627-637.

Gaben-Cogneville, A.M., Jahchan, T. y Swierczewski, E. (1981) Alteration by early underfeeding of cellular multiplication and differentiation in the inguinal fat pads of rats. J. Nutr., 111, 2098-2105.

Galler, J.R. y Turkewitz, G. (1977) Use of partial mamnectomy 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.

Giménez-Martín, G., De la Torre, C., López-Sáez, J.F. (1977) Cell division in higher plants. En: Mechanisms and control of cell division (Rost, T.L. y Gifford, E.M.Jr. eds). Dowd, Hutchinson and Ross. Pennsylvania. pp 261-307.

Giménez-Martín, G., De la Torre, C., López-Sáez, J.F. (1985) Manual Práctico del V Curso Iberoamericano de Biología Celular. UAM-I

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.

Gómez, J.L., Betancourt, M. y Ortiz, A.R. (1986) Determinación del número de células, contenido de ADN y proteínas como un método de evaluar la proliferación celular *in vitro* en médula ósea de ratas desnutridas. MEM. XI Congreso Nacional de Genética Humana., Puebla, Pueb. pp 32.

Gonipath.G. y Roy.S. (1986). Effects of undernutrition on the anterior pituitary gland of neonatal rat. *Indian J.Med. Res.*, 84, 167-172.

González-Torres. M.C., Villaseñor, L. y Betancourt. M. (1983) Proliferación celular de linfocitos e intercambio de cromátides hermanas en niños desnutridos. *Inv. Pediátrica.*, 57, 49-71.

Good, R.A., West, A. y Fernández. G. (1980) Nutrition modulation of immune response. *Fed. Proc.*, 39, 3098-3104.

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.

Graves, J.A.M. (1975) Control of DNA synthesis in somatic cell hybrids. En: *The eukaryote chromosome* (Peacock, W.J. y Brock, R.D. eds). Australian National University Press. Canberra. pp 367-379.

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

Gray, J.M., Pallavicini, M.G., George, Y.S., Groppi, V., Look, M. y Dean, P.N (1981) Rates of incorporation of radioactive molecules during the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, 108, 135-144.

Gray, J.W. (1983b) Quantitative cytogenetics: cellular response to cell cycle specific agents. *Pharmacol. Ther.*, 22, 163-197.

Hoffenberg, R. (1975) Adaptation of plasma protein synthesis and breakdown to undernutrition. *Proc. 9th Int. Congr. Nutrition, Mexico 1972*, Karger. Basel. 22-30.

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.

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.

- Jose, D.G., Welch, J.S. y Doherty, R.L. (1970) Humoral and cellular immune response to Streptococci influenza and other antigens in Australian aboriginal school children. *Aust. Paediat. J.* 6, 192-202.
- 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.
- 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
- Kruse, P.F. y Patterson, M.K. (1973) Tissue culture methods and applications. Academic Press. New York. 2530 pp.
- 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.
- 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.
- Mazia, D. (1974) The cell cycle. *Sci.Am.*, 229, 55-64.
- Mathur, M. y Deo, M.G. (1975) Kinetics of proliferation and differentiation of hair follicle and epidermis in neonatally undernourished rats. *Am. J. Pathol.*,
- Melamed, M.R. (1972) Citology 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.
- Mishell, B.B. y Shiigi, S.M. (1980) Selected methods in cellular immunology. Freeman. San Francisco. pp : 11.
- Mitchison, J.M. (1971) The Biology of the cell cycle. Cambridge University Press. Cambridge. 313 pp.
- 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.

- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. y Resnick, O. (1978) The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2, 137-270.
- Murthy, P.B., Bhaskaram, P. y Srikantia, S.G. (1980) Sister Chromatid exchanges in protein-energy malnutrition, *Hu. Genet.*, 55, 405-406.
- Murthy, P.B. y Srikantia, S.G. (1981) SCE Frequency in malnourished mice. *Metabolism.*, 30, 1-2.
- 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.*, 42, 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.
- Nicollini, C. (1975) The discrete phases of the cell cycle: autoradiographic, physical, and chemical evidences. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 821-826.
- Oku, K. (1981) Immunologic measurement of DNA synthesis rate in individual mouse L. cells. *Bull. Yamaguchi Med. School*, 28, 11-17.
- Ortiz, R. (1980) Duración del ciclo celular en ratas normales y desnutridas. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. pp 49.
- Ortiz, A.R., Gómez, J.L., Betancourt, M. (1986) Estudio de la proliferación in vitro de las células de la médula ósea de ratas desnutridas. NEM. XI Congreso Nacional de Genética Humana. Puebla, Pue. pp 19.
- Ortiz, A.R. (1987) Efecto de la desnutrición sobre las células de la médula ósea de rata. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. pp 138.
- Padilla, G. M. y Whitson, G.L (1980) Nuclear -cytoplasmic interaction in the cell cycle: An overview. En: nuclear- cytoplasmic interaction in the cell cycle. (Whitson, G.L. ed). Academic Press. New York. pp 1-8.
- 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.
- Plaut, W. S., y Mazia, D. (1956) The distribution of newly synthesized DNA in mitotic division. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 573-587.

Pluznik, D. H., Cunningham, R.E. y Noguchi, P.D. (1984) Colony-stimulating factor (CSF) controls proliferation of CSF-dependent cells by acting during G1 phase of the cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 7451-7455.

Potten, C.S., Wichmann, H.E., Dobek, K., Birch, J., Codd, T.M., Horrocks, L., Pedrick, M. y Tickle, S.P. (1985) Cell kinetics in the epidermis of mouse. III. The percent labelled mitosis (PLM) technique. Cell Tissue Kinet., 18, 59-70.

Prescott, D. M. (1976) Reproduction of eukaryotic cells. Academic Press. New York. 138 pp.

Quastler, H. y Sherman, F.G. (1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Expl. Cell. Res., 17, 420-438.

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.

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.

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.

Reisner, E.H.Jr. (1959). Tissue culture of bone marrow. Ann.N.Y.Acad.Sci., 77, 3, 487-500.

Sadasivan, G. y Raghuram, T.C. (1973) Chromosomal aberrations in malnutrition. Lancet., 2, 574.

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. Bulbs kinetics analysis. Biologie Cellulaire., 36, 95-103.

Sasaki, K., Murakami, T., Ogino, T., Takahasi, M. y Kawasaki, S. (1986). Flow cytometric estimation of cell cycle parameters using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. Cytometry., 7, 391-395.

- 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. p: 379-409.
- Schoenfield, D. y Kallman, R.F. (1980) Determining the labeling index in autoradiography. *Cell Tissue Kinet.*, 13, 339-348.
- Serra, I., A. Vanella, R. Avola. y A.M. Giuffrida. (1982) DNA Polymerase and thymidine activities in different regions of rat brain during postnatal development: Effect of Undernutrition. *Neurochem. Res.*, 7, 943-951.
- Shackney, S.E. (1973a) A cytokinetic model for heterogeneous mammalian cell populations. I. Cell growth and cell death. *J.theor.Biol.*, 38, 305-333.
- Shackney, S.E. (1973b) The effects of counting threshold and emulsion exposure duration on the percent-labeled mitosis curve and their implications for cell cycle analysis. *Cancer Res.*, 33, 2726-2731.
- Shackney, S.E. (1974) A cytokinetic model for heterogeneous mammalian cell populations. II. Tritiated thymidine studies: The per cent labeled mitosis (PML) curve. *J.theor.Biol.*, 44, 49-90.
- Shackney, S.E. (1975a) The radioautoradiographic transfer function and its implications for radioautographic methodology. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 811-820.
- Shackney, S.E. (1975b) On the discreteness of the phases of the cell cycle. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 827-829.
- Sikes, R. W., G.M. 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.
- Simpson-Herren, L., Sanford, A.H., Holmquist, J.P. Springer, T.A. y Lloyd, H.H. (1976) Ambiguity of the thymidine index. *Cancer Res.*, 36, 4705-4709.
- 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.
- Stein, G.H. y Yanishevsky, R. (1979) Autoradiography. En: *Methods in enzymology* (Jacoby, W.B. y Pastan, I.H. eds) Vol.LVIII. pp 279-292.
- 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.

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

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.

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

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.

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.

Yurov, Y.B. y Liapunova, N.A. (1977). The units of DNA replication in the mammalian chromosomes: evidence for a large size of replication units. *Chromosoma (Berl.)*. 60. 253-267.