

EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA Y TIPO DE MICRONÚCLEOS EN NIÑOS CON DESNUTRICIÓN MODERADA Y GRAVE

Elsa CERVANTES RÍOS¹, Leonor RODRÍGUEZ CRUZ¹, Jaime GRANIEL GUERRERO² y Alda Rocío ORTIZ MUÑOZ^{1*}

¹ Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340, México, D.F.

² Hospital Pediátrico Iztapalapa del Gobierno del Distrito Federal. Av. Ermita Iztapalapa No. 780. Col. Granjas San Antonio, Iztapalapa, C.P. 09070, D.F.

*Autor de correspondencia: arom@xanum.uam.mx

(Recibido noviembre 2013; aceptado septiembre 2014)

Palabras clave: desnutrición, micronúcleos, aneugénico, clastogénico, citometría de flujo, niños desnutridos

RESUMEN

A nivel mundial la desnutrición es responsable, directa o indirectamente, del 60 % de los 10.9 millones de muertes que ocurren anualmente entre niños y niñas menores de 5 años y más de las dos terceras partes se asocian con prácticas inadecuadas de alimentación durante el primer año de vida. La relación entre este padecimiento y el daño genético ha sido ampliamente estudiada en humanos y modelos animales. El análisis de micronúcleos (MN) empleando citometría de flujo es una herramienta útil para evaluar daño cromosómico *in vivo*. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la infección y la desnutrición en la frecuencia de MN y distinguir entre los MN formados por fragmentos de cromosomas y los formados por cromosomas completos rezagados durante la anafase; en eritrocitos de sangre periférica de niños bien nutridos no infectados y con infección asociada y en niños con desnutrición moderada y grave, ambos con infección. El análisis se efectuó utilizando citometría de flujo. Los resultados del presente trabajo indican que los niños con desnutrición moderada y grave con infecciones asociadas, presentan un incremento en la frecuencia de MN y como consecuencia inestabilidad génica. Muy pocos MN en los grupos de estudio fueron cinetocoro positivos, lo cual sugiere que los MN se derivaron principalmente de rupturas cromosómicas en lugar de pérdida de cromosomas enteros. Los datos indican que la deficiencia de nutrientes y las infecciones podrían actuar conjuntamente para inducir daño al ADN de estos niños.

Key words: malnutrition, micronuclei, aneugenic, clastogenic, flow cytometry, malnourished children

ABSTRACT

Around the world, malnutrition is responsible, directly or indirectly, for 60 % of the million deaths that occur annually among children under the age of 5 years and more than two-thirds of these deaths are associated with not appropriate feeding practices during the first year of life. The relationship between malnutrition and genetic damage

has been widely studied in humans and animal models. Micronuclei (MN) analysis via flow cytometry is a useful tool to assess chromosomal damage *in vivo*. The aim of this study was to evaluate the effects of infection and malnutrition on the frequency of MN and distinguish between chromosome fragments and whole chromosomes lagging behind in anaphase; in erythrocytes from the peripheral blood of well-nourished, uninfected and well-nourished, infected children, and moderately malnourished and severely malnourished children, both with infection, using a flow cytometric analysis technique. The results of this study indicate that children with moderate and severe malnutrition associated with infections, shows an increase in the frequency of MN and gene instability as a result. Very few MN from either well-nourished infected and malnourished children exhibited kinetochore staining, suggesting that the MN were derived from chromosome breakage rather than from whole chromosome loss. The data indicate that malnutrition and infection could act together to induce damage to DNA of these children.

INTRODUCCIÓN

El estado nutricional afecta cada aspecto de la vida y salud de los niños, incluyendo un crecimiento y desarrollo normal, así como la actividad física y la respuesta adecuada a enfermedades (Rodríguez *et al.* 2011).

La desnutrición puede originarse por la ingesta deficiente de cualquier nutriente. El establecimiento y gravedad de ésta depende de la causa e intensidad. Puede ser originada por una dieta inadecuada o por causas secundarias como deficiencias o alteraciones en la absorción gastrointestinal, un incremento en la demanda de nutrientes o una excesiva excreción de éstos, como es el caso de los cuadros diarreicos (Scrimshaw y SanGiovanni 1997, Rodríguez *et al.* 2011). Así, la deficiencia en la ingesta de macronutrientes como proteínas, carbohidratos y lípidos deriva en un estado patológico conocido como desnutrición calórico proteica (DCP).

Este padecimiento se encuentra entre los principales problemas de salud pública en países en vías de desarrollo y está asociado con una alta mortalidad y morbilidad en niños menores de cinco años (Müller y Krawinkel 2005, Rodríguez *et al.* 2011). Más de 77 millones de niños nacen cada año en países con altos índices de desnutrición. De éstos, alrededor de 7.4 millones mueren antes de los tres años y 0.6 millones mueren entre los tres y cinco años (Elsayh *et al.* 2013).

Es importante recalcar que generalmente, los niños con desnutrición padecen de infecciones, en este sentido, se ha documentado ampliamente que la relación entre este síndrome y las infecciones es bidireccional (Brown 2003, Müller y Krawinkel 2005). Existen múltiples mecanismos de acción en la relación entre éste y la susceptibilidad a las infecciones

bacterianas. Se ha reportado que la DCP afecta el funcionamiento del sistema inmunológico. Ante la presencia de infecciones, la respuesta inmunológica deber ser estimulada adecuadamente, esto depende de nutrientes que no están disponibles cuando un organismo se encuentra en un estado nutricional deficiente, por lo que se establece un círculo vicioso entre esta condición, la deficiencia de respuesta del sistema inmunológico y la susceptibilidad a infecciones. Los niños desnutridos, por lo general, sufren de infecciones gastrointestinales y respiratorias (Rodríguez *et al.* 2011).

Por otro lado, la gravedad de la desnutrición puede ser clasificada de acuerdo al déficit de peso/talla para la edad cronológica del niño, de tal forma que si este parámetro disminuye entre el 10 y el 24 % se considera leve, si se reduce del 25 al 40 % se considera moderada y si supera el 40 % es grave (Gómez 1946, Gómez *et al.* 2003).

La desnutrición es una condición que afecta de manera multisistémica a los organismos que la padecen. En este sentido, se ha determinado que tiene un efecto deletéreo sobre la integridad del ADN de los individuos con este síndrome (Betancourt *et al.* 1995, Ortiz *et al.* 1997, 2004). Recientemente Ortiz *et al.* (2011) demostraron que en ratas con desnutrición inducida por competencia de alimento, existe una alta frecuencia de micronúcleos (MN) y que ésta incrementaba con la administración de trimetoprim-sulfametoxazol (medicamento frecuentemente utilizado en el tratamiento de infecciones respiratorias en niños). De igual forma, Cervantes-Ríos *et al.* (2012), demostraron que los niños con desnutrición moderada y grave presentaban inestabilidad genómica, la cual estaba reflejada por una alta frecuencia de MN en reticulocitos (RET) y eritrocitos (E) de sangre periférica, en comparación con niños bien nutridos.

Por su gran sensibilidad, el ensayo de MN es una herramienta confiable y reproducible para evaluar genotoxicidad, lo cual ha sido confirmado a través de diversos protocolos de investigación en sistemas vegetales y animales (Valencia-Quintana *et al.* 2013). Debido a estas características, actualmente, numerosos estudios incluyen el ensayo de MN para medir daño al ADN y evaluar la genotoxicidad de factores físicos, químicos, ambientales y de estilo de vida (Lau *et al.* 2009, Cveticanin *et al.* 2010, Lal y Ames 2011), dentro de ellos se incluye el estado nutricional de los individuos. En años recientes se han implementado métodos para realizar el ensayo de MN usando citometría de flujo (Dertinger *et al.* 2011). Esto ha hecho posible analizar muestras de sangre periférica en lugar de células de médula ósea, lo cual confiere al estudio una serie de ventajas importantes, ya que no es invasivo, se requiere poca muestra de sangre para llevarlo a cabo, se analizan un gran número de células (lo cual da un alto poder estadístico), es confiable y proporciona resultados objetivos (Dertinger *et al.* 2000, 2003, 2006, Tourus *et al.* 2003). Actualmente estos métodos pueden implementarse para analizar eritrocitos de sangre periférica de especies en las cuales el efecto del bazo es particularmente evidente, ya que éste es capaz de filtrar los eritrocitos que presenten inclusiones intracelulares, lo cual podría reducir la sensibilidad de la prueba, sin embargo, existe amplia evidencia de que el ensayo es confiable y reproducible (Stopper *et al.* 2005, Dertinger *et al.* 2006, 2007, Witt *et al.* 2008).

Los MN son pequeños cuerpos extranucleares de cromatina que se forman durante la división celular y pueden estar constituidos por fragmentos acéntricos de cromosomas o de cromátidas, o en su defecto, por cromosomas completos. Estas estructuras se originan debido a que los fragmentos acéntricos o los cromosomas completos, se encuentran separados durante la anafase y no son incluidos en el núcleo principal durante la telofase (Sedelnikova *et al.* 2007, Fenech *et al.* 2011). Los MN están envueltos por una membrana nuclear, similar a la del núcleo de la célula hija, sin embargo, su tamaño es muy pequeño en comparación a éste (Zalacain 2005).

Cuando un MN está formado por fragmentos acéntricos, se considera de tipo clastogénico, y si está formado por cromosomas completos se considera de tipo aneugénico (Cervantes *et al.* 2012). Bajo este criterio, detectar el centrómero y el cinetocoro en los MN puede incrementar la especificidad del ensayo de MN, ya que los MN de tipo aneugénico pueden ser reconocidos por anticuerpos dirigidos contra el cinetocoro (cinetocoro positivos). Por otro lado, los

de tipo clastogénico, carecen de cinetocoro/centrómero, por tanto son cinetocoro/centrómero-negativos (Luzhna *et al.* 2013). Alternativamente las regiones centroméricas pueden ser reconocidas mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés de, *Fluorescent In Situ Hybridization*) (Mateuca *et al.* 2006).

En general, un MN de tipo clastogénico se forma después de que el ADN ha sufrido daño, como puede ser el rompimiento de doble cadena, que si no es reparado adecuadamente da como resultado el rearrreglo asimétrico de cromosomas e intercambio de los mismos. Por otro lado, los MN de tipo aneugénico se forman por deficiencias en la segregación cromosómica durante la anafase, usualmente causada por fallas en el huso mitótico, daño en el cinetocoro, hipometilación del ADN centromérico y alteraciones en la regulación del ciclo celular (Mateuca *et al.* 2006).

En estudios anteriores, se ha demostrado que la desnutrición favorece la inestabilidad génica, ya que se han registrado altas frecuencias de MN en niños y ratas (Cervantes *et al.* 2012, Ortiz *et al.* 2004, 2011). Sin embargo, no se había determinado el tipo de MN que se forman. Identificar el tipo o tipos de MN que se generan, nos proporcionará un panorama general sobre las alteraciones en las vías de reparación y en la segregación de cromosomas que estos organismos pueden estar exhibiendo. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar el tipo de MN que se forman en niños con desnutrición moderada y grave con el fin de lograr un mejor entendimiento de la relación entre el estado nutricional y los mecanismos que pueden estar implicados en la formación de MN.

MATERIALES

Reactivos: heparina sódica (250 U/mL, Micro-lab, México). BBS (BBS: 0.9 g de NaCl + 0.0444 g de NaHCO₃ en 100 mL de H₂O destilada) a pH 7.5. RNasa (1 mg/mL) (M.P. Biomedicals, Inc. Francia). Anticuerpo dirigido contra CD71 conjugado con FITC (anti-CD71-FITC; Chemicon International, USA & Canada). Anticuerpo dirigido contra CD61 conjugado con PE (anti-CD61-PE; Chemicon International, USA & Canada). Isotipo conjugado con FITC (anti-IgG1-FITC; Millipore, Australia Pty. Limited). Tween al 0.1 %. Anticuerpo dirigido contra cinetocoro (anti-K; Chemicon International, USA & Canada). Cy5 (Chemicon International, USA & Canada). Yoduro de propidio (IP; 2 µg/mL, Sigma).

MÉTODO

3.1 Grupos de estudio

Para la realización del estudio se obtuvo la aprobación del Comité de Ética y Bioseguridad del Hospital Pediátrico Iztapalapa, del Gobierno del Distrito Federal. Se realizó un muestreo aleatorio simple para coleccionar muestras de sangre periférica de pacientes pediátricos con edades entre los 6 y los 60 meses. Se contó con el consentimiento informado de los padres de los niños que participaron en este estudio.

Para coleccionar las muestras, se utilizaron jeringas heparinizadas. Se tomaron aproximadamente 2 mL de sangre periférica. Una vez tomadas las muestras, fueron almacenadas a 4 °C para ser transportadas en una nevera portátil para muestras biológicas hasta el laboratorio, en donde fueron procesadas.

De acuerdo al estado nutricional, los niños incluidos en el estudio se dividieron en cuatro grupos:

Bien nutridos (BN): Con peso y talla adecuados para la edad, sin infecciones.

Bien nutridos con infecciones (BNI): Con peso y talla adecuados para la edad, con infecciones gastrointestinales y/o respiratorias de tipo bacteriano.

Desnutrición moderada con infecciones (DESMI): Con déficit de peso/talla mayor al 25 % y menor al 40 % para la edad y talla, así como infecciones gastrointestinales y/o respiratorias de tipo bacteriano.

Desnutrición grave con infecciones (DESGI): Con déficit de peso/talla superior al 40 % además de infecciones gastrointestinales y/o respiratorias de tipo bacteriano.

El grado de la desnutrición se evaluó de acuerdo a los signos clínicos y a los síntomas presentados, así como con la valoración del déficit peso/talla, según lo establecido en las tablas de peso/talla para niños mexicanos de Ramos-Galván (1976). Las infecciones bacterianas fueron diagnosticadas rigurosamente de acuerdo a los datos clínicos y a las pruebas de laboratorio de rutina. No se incluyeron en el estudio a niños que presentaron infecciones virales, tuberculosis, enfermedades cardíacas o alergias. No se analizaron las muestras que se hemolizaron, se coagularon o no presentaron integridad celular.

La inclusión del grupo bien nutridos con infecciones, fue necesaria ya que los niños desnutridos son también infectados.

3.2 Fijación de la muestra

La sangre se mantuvo a 4 °C y fue fijada en metanol ultrafrío dentro de las tres horas siguientes a la extracción. Posterior a su fijación, las muestras se almacenaron en un ultracongelador a -70 °C al

menos durante 24 horas antes de ser teñidas para su posterior análisis (Cervantes *et al.* 2012).

3.3 Tinción celular

Detección de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de niños de los cuatro grupos de estudio

El día del análisis, las muestras fueron retiradas del ultracongelador. Se resuspendió el volumen total y se tomó una alícuota de 1 mL. Para eliminar el fijador, se centrifugó con BBS a 4 °C, a 600 xg durante 5 minutos a 4 °C. El botón recuperado se resuspendió en 100 µL de BBS y se redistribuyó en alícuotas de 25 µL en 3 tubos de polipropileno que contenían 80 µL de RNasa (1 mg/mL). El primer tubo fue utilizado para detectar la autofluorescencia, al segundo tubo se agregaron 5 µL de anti-IgG1-FITC, y fue usado como control negativo. En el tercer tubo se agregaron 5 µL de anti-CD71-FITC para marcar reticulocitos (RET) y 10 µL de anti-CD61-PE para marcar plaquetas y poder excluirlas de la región de análisis (Dertinger *et al.* 2003). Todos los tubos se incubaron a 4 °C durante 40 minutos, y por 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al término de la incubación se agregaron 500 µL de BBS y se procedió a su análisis por citometría de flujo. En este momento se agregaron a todos los tubos 2 µL de yoduro de propidio frío (2 µg/mL, Sigma) para evidenciar la presencia de MN (Dertinger *et al.* 2000).

3.3.1.2 Análisis de MN por citometría de flujo

El ensayo de MN utilizado en este trabajo se basó en el uso de anti-CD71-FITC para marcar a los RET y diferenciarlos de los eritrocitos (E), el uso de IP para detectar MN en ambas poblaciones celulares y anti-CD61-PE. Se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA) con láser de argón a 488 nm de excitación y el paquete computacional Cell Quest (versión 3.0.1, Becton Dickinson) para analizar los datos. Se adquirieron 500,000 eventos por muestra. Las señales de anti-CD71-FITC, anti-CD61-PE e IP fueron detectadas en los canales FL1, FL2 y FL3 respectivamente. Para el análisis de los datos se desplegaron gráficas de puntos, con las cuales se implementó la siguiente estrategia de regionalización:

Se seleccionó la población de análisis graficando "Forward Scatter" (dispersión frontal de la luz) contra "Side Scatter" (dispersión lateral de la luz), para delimitar la región de células individuales.

Posteriormente, en una gráfica de FL3 vs. FL1 se identificó la región de acuerdo al contenido de ADN para excluir a las células nucleadas.

Por último se delimitó la región, excluyendo a las plaquetas (anti-CD61-PE vs. anti-CD71-FITC).

En la **figura 1** se muestran las gráficas de puntos obtenidas de acuerdo a esta estrategia de regionalización.

3.3.2 Determinación del tipo de micronúcleos en reticulocitos y eritrocitos de sangre periférica de los cuatro grupos de estudio

Las muestras fueron procesadas igual que en el punto anterior, una vez que se colocaron las alícuotas de 25 mL en los 3 tubos de polipropileno el tubo 1 se incubó con BBS más Tween al 0.1 % por 5 minutos, después se centrifugó a 600 xg por 5 minutos. Al botón recuperado se le agregaron 20 μ L de anti-Cinetocoro para detectar la presencia de cinetocoro (anti-K) y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se centrifugó y al botón recuperado se

agregaron 50 μ L de Cy5 y se incubó a temperatura ambiente. Se centrifugó y se agregaron 80 μ L de RNasa (1 mg/mL) más 5 μ L de anti-CD71-FITC. Al tubo 2 (para calibrar) se le agregaron 80 μ L de RNasa (1 mg/mL) más 5 μ L de anti-CD71-FITC. Al tubo 3 (control negativo) se agregaron 5 μ L de anti-IgG1-FITC. Todos los tubos se incubaron a 4 °C durante 40 minutos, y por 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al término de la incubación se agregaron 500 μ L de BBS y se procedió a su análisis por citometría de flujo. En este momento se agregaron a todos los tubos 2 μ L de IP (2 μ g/mL) para evidenciar la presencia de MN (Dertinger *et al.* 2003).

3.3.2.1 Análisis del tipo de MN por citometría de flujo

Para determinar el tipo de MN, se utilizó anti-CD71-FITC para marcar a los RET y diferenciarlos

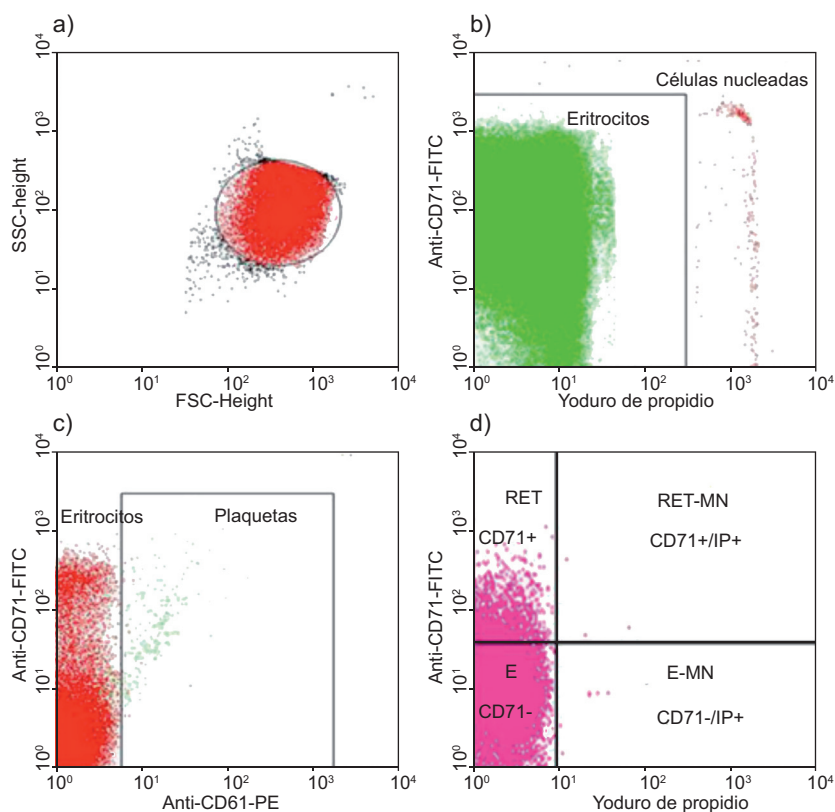


Fig. 1. Se observa la secuencia de análisis para delimitar a la región de interés. a) Selección de la población de E con base a la dispersión frontal (FSC-Height) y lateral (SSC-Height) de la luz. b) Eliminación de células nucleadas con base a la tinción de IP vs. anti-CD71-FITC. c) Eliminación de las plaquetas con base a la tinción anti-CD61-PE vs. anti-CD71-FITC. d) Se muestra la gráfica de puntos en la que se observan las poblaciones de interés: RET (tinción positiva a anti-CD71-FITC), RET-MN (tinción positiva a anti-CD71-FITC y a IP), E (Tinción negativa a anti-CD71-FITC y E-MN (tinción negativa a anti-CD71-FITC y positiva a IP)

de los E, IP para detectar MN en ambas poblaciones celulares y anti-cinetocoro acoplado a Cy5 para detectar la presencia de cinetocoro, partiendo de la premisa de que si se observa “señal” para cinetocoro, el MN es de tipo aneugénico (MN-K+) y si no se detecta “señal”, el MN es de tipo clastogénico (MN-K-).

Se utilizó el mismo citómetro de flujo descrito previamente. Se adquirieron 500,000 células por muestra. Las señales de anti-CD71-FITC, IP y Cy5 fueron detectadas en los canales FL1, FL2 y FL3 respectivamente. Para el análisis de los datos se desplegaron gráficas de puntos, con las cuales se implementó la siguiente estrategia de regionalización:

Se seleccionó la población de análisis graficando “Forward Scatter” contra “Side Scatter”, para delimitar la región de células individuales.

En una gráfica de FL3 vs. FL1 se identificó la región de las células nucleadas, para excluirlas de la región de análisis.

Después, con base en la tinción de IP y anti-CD71-FITC, se identificaron las siguientes poblaciones: RET, reticulocitos micronucleados (RET-MN), E y eritrocitos micronucleados (E-MN).

Por último se delimitó la región, de acuerdo a la tinción con anti-CD71-FITC y a anti-K Cy5, para detectar los porcentajes de las diferentes poblaciones de eritrocitos: RET-MN que no presentan cinetocoro (RET-MN-K-), RET-MN que presenten cinetocoro (RET-MN-K+), E-MN que no presenten cinetocoro (E-MN-K-) y E-MN que presenten cinetocoro (E-MN-K+). Los porcentajes de estas poblaciones se calcularon usando la hoja de cálculo EXCEL. En la **figura 2**, se observa la estrategia de regionalización descrita.

3.4 Análisis estadístico

Para conocer la diferencia estadística entre los grupos de estudio se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de las prueba de U de Mann-Whitney con una $p \leq 0.05$ (Paquetes estadísticos: NCSS, versión 07.1.9 y NOPANDEV).

RESULTADOS

En el **cuadro I** se resumen las características clínicas de los niños incluidos en el estudio. Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y promedios de la edad, peso, estatura y déficit de peso, así como el porcentaje de niños con un tipo particular de infección.

Los datos indican que el grupo DESGI presenta mayor frecuencia de RET-MN en comparación con el grupo de niños DESMI ($2.02 \% \pm 1.67$ y

$1.46 \% \pm 0.84$ respectivamente). Sin embargo, no existe diferencia significativa entre estos dos grupos. Cuando se hizo la comparación entre los grupos BN vs. BNI ($0.46 \% \pm 0.26$ y $1.19 \% \pm 0.68$), se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$), lo cual indica que la frecuencia de RET-MN de BNI muestra un incremento asociado con la infección (**Figura 3**). De igual forma, al comparar al grupo de niños BNI con el grupo DESMI, estos últimos mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$). Con relación al grupo DESGI el porcentaje también es significativamente mayor con respecto a los grupos BN y BNI ($p \leq 0.05$).

Para complementar estos datos, se determinó el tipo de MN para cada uno de los grupos de estudio de acuerdo al análisis descrito previamente.

El porcentaje promedio de RET-MN-K+ y E-MN-K+ en los niños del grupo BN fue de $0.02 \pm 0.01 \%$ y de $0.55 \pm 0.15 \%$ respectivamente. El grupo BNI mostró un porcentaje promedio de RET-MN-K+ de $0.11 \pm 0.02 \%$ y de $0.63 \pm 0.09 \%$ para E-MN-K+. En el grupo de niños DESMI se observó que los porcentajes promedio de RET-MN-K+ y E-MN-K+ fueron de $0.03 \pm 0.1 \%$ y de $0.43 \pm 0.06 \%$ respectivamente, mientras que para el grupo DESGI los valores encontrados fueron de $0.13 \pm 0.01 \%$ de RET-MN-K+ y de 0.42 ± 0.14 de E-MN-K+.

Para calcular el porcentaje de MN de tipo clastogénico se hizo una resta, la cual consistió en tomar el total de eventos analizados como un 100 % (ver estrategia de regionalización para tipo de MN). A este 100 % se le restó el porcentaje de MN de tipo aneugénico y el resultado fue tomado como el porcentaje de MN de tipo clastogénico. Estos resultados se concentran en el **cuadro II**.

Los datos indican que los MN de tipo aneugénico, es decir, cinetocoro positivos, representan una fracción muy pequeña de las dos poblaciones celulares (**Figura 4**). También se observa que los E-MN presentan mayor frecuencia de MN de tipo aneugénico, en comparación con los RET, en todos los grupos. Como puede observarse, la gran mayoría de MN fue de tipo clastogénico, los cuáles están relacionados con la ruptura de la cadena de ADN. Al hacer una comparación entre grupos no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Diferentes factores pueden influir sobre el efecto de los agentes genotóxicos y la formación de MN. Entre ellos se encuentran la edad, el género, el estilo de vida y el estado nutricional, así como la

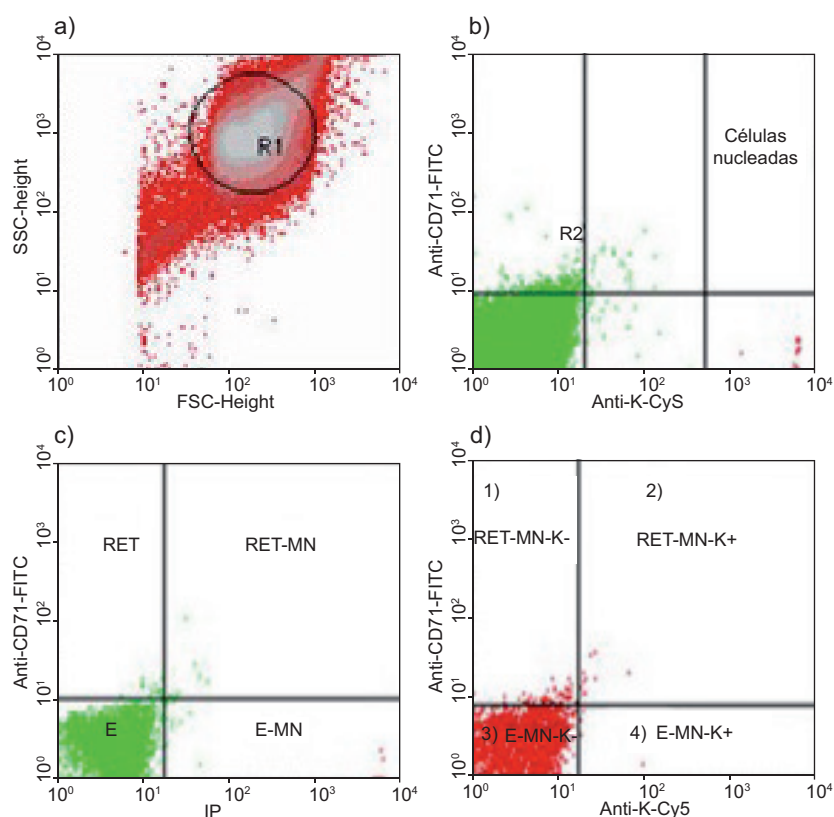


Fig. 2. Las gráficas de puntos muestran la secuencia de regionalización, así como las poblaciones de interés. a) Se ubica a la población de E con base a la dispersión frontal (FSC-Height) y lateral (SSC-Height) de la luz. b) Eliminación de células nucleadas con base a la tinción de anti-K-Cy5 vs. anti-CD71-FITC. c) Se delimitan las poblaciones de RET, RET-MN, E y E-MN. D) Se identifican las poblaciones de interés: 1) RET-MN-K-: RET positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e IP, pero negativos a la tinción con anti-K-Cy5 (RET con MN de tipo clastogénico). 2) RET-MN-K+: RET positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e IP, así como a la tinción con anti-K-Cy5 (RET con MN de tipo aneugénico). 3) E-MN-K-: E positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e IP, pero negativos a la tinción con anti-K-Cy5 (E con MN de tipo clastogénico). 4) E-MN-K+: E positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e IP, así como a la tinción con anti-K-Cy5 (RET con MN de tipo aneugénico)

susceptibilidad al desarrollo de enfermedades (Iarmarcovai *et al.* 2008). En el siglo pasado, se han llevado a cabo múltiples estudios sobre la generación de MN y un análisis prospectivo de estos estudios muestra que la variabilidad en la frecuencia de MN depende de los factores antes mencionados, mientras que las características intra e interindividuales también influyen sobre la formación de MN (Sato *et al.* 1990).

El ensayo de MN se ha establecido como un método confiable para analizar daño cromosómico *in vivo* y es utilizado por muchos investigadores para monitorear la integridad del ADN después de la exposición a agentes tóxicos o bien después de someter a organismos a una deficiente nutrición (Ofer *et al.* 2004). Diversos investigadores han demostrado que

los RET representan una población celular adecuada para realizar el ensayo de MN por citometría de flujo (MacGregor *et al.* 2006, Dertinger *et al.* 2007, 2011, Hotchkiss *et al.* 2008, Cervantes *et al.* 2012). La evaluación del daño genotóxico usando el ensayo de MN es una herramienta importante para estudiar la asociación entre la nutrición y el daño al ADN (Mateuca *et al.* 2006). Se considera importante incluirlo en los estudios citogenéticos, ya que proporciona información adicional y complementaria a la obtenida con el análisis de aberraciones cromosómicas y de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas. Además, la citometría de flujo, es un método altamente sensible, relativamente fácil de realizar y con un significado biológico claro.

CUADRO I. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS NIÑOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO. SE MUESTRA EL NÚMERO DE NIÑOS EN CADA GRUPO (n), LOS INTERVALOS Y PROMEDIOS DE EDAD, PESO, ESTATURA Y DÉFICIT DE PESO, ASÍ COMO EL PORCENTAJE DE NIÑOS CON UN TIPO PARTICULAR DE INFECCIÓN. ^AMIXTA: EL NIÑO PRESENTA INFECCIÓN GASTROINTESTINAL Y RESPIRATORIA

Grupo	n	Edad (meses) $\bar{x}$	Peso (Kg) $\bar{x}$	Estatura (cm) $\bar{x}$	Déficit de peso (%)	Tipo de Infección
BN	18	39.5 (6-60)	14.4 (7-21)	95.7 (51-123)	< 10	Sin infección
BNI	23	29.3 (8-60)	12.6 (7-24.5)	89 (65-123)	< 10	Respiratorias (82.6 %) Gastrointestinales (17.3 %)
DESMI	21	18.6 (6-60)	7.8 (3-17.5)	76.2 (50-128)	28.7 (23.1-35.4)	Respiratorias (52.3 %) Gastrointestinales (33.3 %) Mixta ^A (14.2 %)
DESGI	14	14.9 (6-45)	5 (3-9)	64 (58-83)	48.2 (34-75)	Respiratorias (50 %) Gastrointestinales (35.7 %) Mixta ^A (14.2 %)

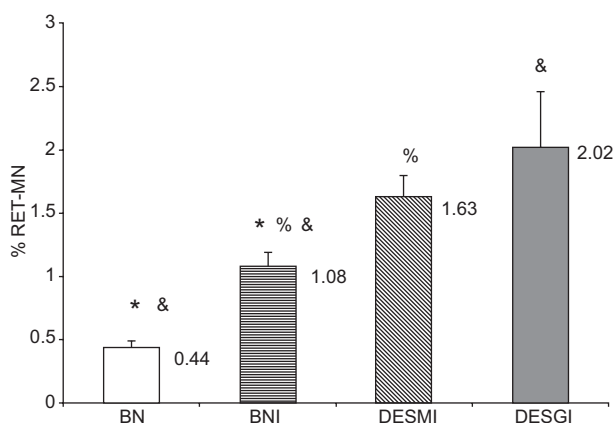


Fig. 3. Porcentaje de RET-MN en niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada e infecciones (DESMI) y con desnutrición grave e infecciones (DESGI). Los datos son presentados como promedio $\pm$ error estándar. Se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre BN vs. BNI, BNI vs. DESMI, DESGI vs. BN, BNI.

Los datos obtenidos mostraron que el grupo DESGI presentó la mayor frecuencia de RET-MN, pues hubo un incremento de 4.5 veces en comparación con el grupo BN y de 1.8 veces en comparación con el grupo BNI (se encontró diferencia significativa $p \leq 0.05$). Esto indica que estos niños sufren daño al ADN, el cual está influenciado por el estado nutricional y por efecto de las infecciones. Los niños DESMI mostraron una frecuencia de RET-MN menor que el grupo DESGI, pero no se encontró diferencia significativa. Cuando se compararon los grupos DESMI vs. BNI, se observó un incremento de 1.5 veces (diferencia

significativa $p \leq 0.05$), este incremento indica que los niños del grupo DESMI exhiben daño citogenético, el cual se relaciona con el estado nutricional. Al hacer la comparación DESMI vs. BN no se encontró diferencia significativa, por lo que se infiere que las infecciones que presentaron los niños con desnutrición moderada no influyen en la generación de MN en RET. Sin embargo, se observó que el grupo DESMI mostró un incremento de 3.7 veces con relación a los valores encontrados en el grupo BN (1.63 % vs 0.44 %), se podría inferir que la falta de diferencia significativa se relaciona con la variabilidad intra e inter grupal. Los valores obtenidos para el grupo BNI indicaron que había un incremento de 2.4 veces de RET-MN en comparación con el grupo BN, al encontrarse diferencia significativa ($p \leq 0.05$) y tomando en cuenta que ambos grupos están conformados por niños bien nutridos, se corrobora que la infección si ejerce un efecto deletéreo en la estabilidad del ADN. Al comparar a los grupos DESMI vs. DESGI se encontró que el grupo DESGI tiene un incremento de 1.2 veces de RET-MN con relación al grupo DESMI. Sin embargo, al no encontrarse diferencia significativa, se infiere que el grado de desnutrición no influye en la generación de MN.

Diversos estudios han establecido que el incremento en la formación de RET-MN en los niños con desnutrición, podría estar relacionado con el hecho de que los agentes infecciosos, en este caso de tipo bacteriano, desencadenan en el organismo una respuesta inmunológica, la cual incrementa la concentración de radicales libres (Ames *et al.* 1993). Con relación a esto, previamente se ha reportado, en organismos con este síndrome, que los sistemas antioxidantes son

CUADRO II. PORCENTAJE DE MN DE TIPO ANEUGÉNICO Y CLASTOGENICO EN RET Y E DE SANGRE PERIFÉRICA DE LOS NIÑOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO. NIÑOS BIEN NUTRIDOS (BN), BIEN NUTRIDOS INFECTADOS (BNI), CON DESNUTRICIÓN MODERADA (DESMI) Y GRAVE (DESGI) AMBOS CON INFECCIONES. PROMEDIO $\pm$ ERROR ESTÁNDAR DE CADA GRUPO DE ESTUDIO

Tipo de MN (%)	BN	BNI	DESMI	DESGI
RET-MN-K+ (Aneugénico)	0.02 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.04
RET-MN-K- (Clastogénico)	99.9	99.8	99.97	99.87
E-MN-K+ (Aneugénico)	0.55 $\pm$ 0.15	0.63 $\pm$ 0.15	0.43 $\pm$ 0.07	0.4 $\pm$ 0.08
E-MN-K- (Clastogénico)	99.45	99.37	99.57	99.6

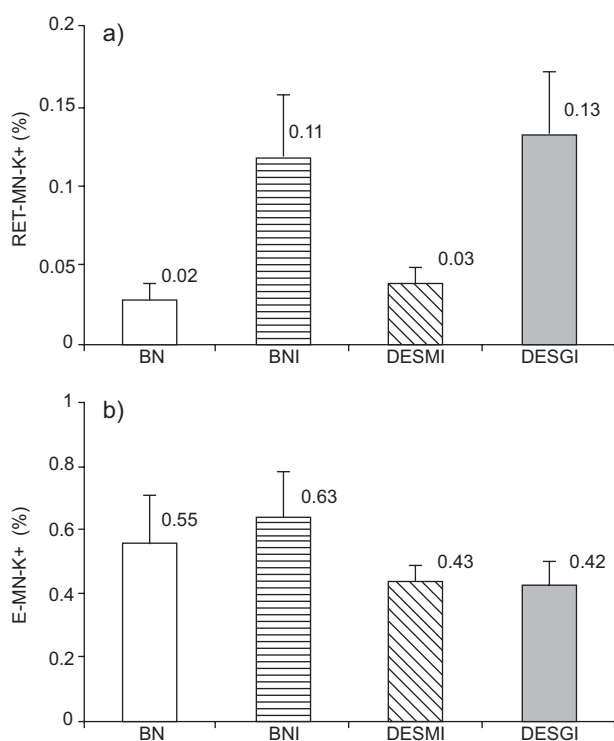


Fig. 4. Porcentaje de RET y E que presentan MN de tipo aneugénico (RET-MN-K+ y E-MN-K+) en muestras de sangre periférica de niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada e infecciones (DESMI) y con desnutrición grave e infecciones (DESGI). Los datos son presentados como promedio $\pm$ error estándar. a) Porcentaje de RET-MN-K+ para todos los grupos b) Porcentaje de E-MN-K+ en los cuatro grupos de estudio. No se encontró diferencia significativa $p > 0.05$.

deficientes; esto provoca una excesiva acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual a su vez genera daño al ADN (Ball *et al.* 1998, Ashour *et al.* 1999, Fang 2002). También, Cervantes (2012), demostró que los niños con desnutrición moderada y grave muestran una baja actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. Los datos indican que esos niños muestran una capacidad antioxidante deficiente. Sin embargo, es necesario realizar más estudios encaminados a determinar si el estrés oxidante está relacionado con la formación de MN e inestabilidad génica.

Con relación a lo anterior, existen datos consistentes de que la concentración de moléculas antioxidantes en niños con desnutrición grave, se encuentra disminuida, lo cual genera un estado de estrés oxidante, que podría desembocar en el daño al ADN por oxidación (Becker *et al.* 1995, Lehnhart *et al.* 1998), además se ha observado que las concentraciones de glutatión en plasma y sangre total son especialmente bajas, este hecho se relaciona con daño a las membranas celulares, y probablemente al ADN (Reid 2000, Golden 2002).

Con respecto a la determinación del tipo de MN, los datos del presente estudio muestran que en los cuatro grupos de estudio, las frecuencias de RET-MN y de E-MN de tipo aneugénico, son muy bajas, en consecuencia los MN de tipo clastogénico en ambas subpoblaciones celulares representan la mayor proporción de los MN formados en los niños incluidos en este estudio, lo cual refleja que en ellos, la cadena de ADN sufrió rupturas que no pudieron ser reparadas.

Con relación a lo anterior, se ha reportado que el rompimiento de la cadena de ADN tiene como

consecuencia la formación de MN de tipo clastogénico (Fenech *et al.* 2011, Luzhna *et al.* 2013). El rompimiento de la cadena de ADN podría estar relacionado con la presencia de algunas ERO como el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) que es un radical muy reactivo y que tiene la capacidad de abstraer átomos de hidrógeno de la molécula de ADN, así como de pegarse a las bases formando aductos, lo que provoca una diversidad de daños (Medeiros 2008). Cuando las ERO se encuentran por encima de ciertos niveles, el balance oxidantes/antioxidantes se pierde y es entonces cuando algunas ERO pueden atacar al ADN provocando su ruptura (Jain 2008). Como ya se mencionó anteriormente, se ha reportado que en organismos que padecen desnutrición, los sistemas antioxidantes son poco eficientes (Granot *et al.* 2004, Jain *et al.* 2008).

Los niños que se analizaron en este estudio presentaban infecciones de tipo respiratorio o gastrointestinal (**Cuadro I**). Con relación a esto, estudios epidemiológicos han revelado que la mayoría de las infecciones gastrointestinales de tipo bacteriano, que padecen niños de países en vías de desarrollo, son provocadas por *V. cholera* y *E. coli* (Rodríguez *et al.* 2011). También se ha demostrado que estas enterotoxinas interfieren con la síntesis de proteínas e inhiben la reparación del ADN (Brigotti *et al.* 2002, Sestili *et al.* 2005).

También debe considerarse que el incremento en la frecuencia de RET con MN de tipo clastogénico (RET-MN-K-) en los grupos de estudio, podría deberse a la deficiencia de folato, ya que se ha reportado que esta condición es común en niños con desnutrición y que está asociada con diversas alteraciones (Olivares *et al.* 1992, Black *et al.* 2013). Previamente se ha demostrado que su carencia, propicia la incorporación de uracilo a la cadena de ADN, lo cual genera inestabilidad y favorece el rompimiento de esta molécula, hecho que se ve reflejado en la formación de MN de tipo clastogénico (MacGregor *et al.* 1997). Esto fue demostrado por Fenech *et al.* (1999) quienes reportaron que la deficiencia de ácido fólico provoca daño genético debido a rompimientos en la cadena del ADN. Además, estudios recientes han establecido la relación entre los niveles de folato y la formación de MN ya que el folato es un importante componente del grupo de las vitaminas B que participa en el ciclo de la homocisteína, del cual se libera S-adenosil metionina, que es un importante donador de grupos metilo para las ADN-metiltransferasas, y en ausencia de esta molécula el estado de metilación de ADN se verá afectado (Bull *et al.* 2012, Fuso 2013). De igual forma se ha observado que la suplementación

de folato favorece una evidente disminución en el daño al ADN y consecuentemente en la formación de MN (Lazalde *et al.* 2012). Se ha demostrado que en general, los organismos desnutridos presentan deficiencia de zinc (Brewster *et al.* 1997), lo que podría estar relacionado con la mayor frecuencia de RET-MN-K- en sangre periférica observada en este estudio. Otra posible causa podría ser la deficiencia de vitaminas C, E y D. Previamente se ha evidenciado que la deficiencia en estas vitaminas causa oxidación del ADN, daño cromosómico y rompimiento de doble cadena de ADN (Chatterjee 2001, Claycombe 2001, Halliwell 2001).

Por otro lado, es importante mencionar que el entendimiento de los mecanismos de inducción de MN en organismos desnutridos es de gran relevancia ya que ayudará a determinar qué vías están implicadas en la formación de estas estructuras.

Es importante recalcar que la frecuencia basal de MN en recién nacidos y niños es relativamente baja, pero la susceptibilidad a daño al ADN en niños puede incrementar la formación de MN si son expuestos a agentes genotóxicos (Holland *et al.* 2011). La habilidad para distinguir entre MN de tipo aneugénico y clastogénico, permite dilucidar los mecanismos por los cuales se formaron estas estructuras, lo cual a su vez permite determinar el mecanismo de acción de una gran cantidad de agentes genotóxicos.

Si bien el estudio de MN tiene gran aplicación en el área de la mutagénesis, existen diversos aspectos que no son del todo entendidos. No se sabe si los MN que son reincorporados dentro del núcleo principal pueden restaurar el genotipo completo de la célula y si los MN pueden contribuir a la regulación de la expresión genética. Tampoco se sabe cuál es el mecanismo de degradación de un MN. Más aún, es importante entender el papel de la epigenética en la formación de MN. En este sentido, es necesario seguir realizando estudios encaminados a entender, la relación entre la desnutrición y los mecanismos implicados en la generación de MN de tipo aneugénico y clastogénico.

CONCLUSIONES

Los datos del presente estudio muestran que tanto los niños con desnutrición moderada como grave presentan una alta frecuencia de RET-MN en comparación con los otros grupos de estudio, lo cual indica que ambos grados de desnutrición se asocian con un mayor daño al ADN. Este hecho está relacionado con inestabilidad génica. Por otro lado, los MN formados

en los niños incluidos en este estudio, son en su mayoría, de tipo clastogénico, lo cual está relacionado con rompimiento de doble cadena de ADN, esto puede estar favorecido por diversos factores, entre ellos el estrés oxidante.

En general, se establece que los niños con desnutrición experimentan inestabilidad génica, la cual puede estar favorecida por diversos factores, entre ellos, la presencia de infecciones, estrés oxidante y deficiencia de micronutrientes como el folato y el zinc. Es necesario realizar más estudios para determinar si todos esos factores se encuentran involucrados en la generación de MN.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la beca otorgada por CONACyT para estudios de Doctorado 18557. Apoyo PRO-MEP/103.5/13/6732.

REFERENCIAS

- Ames B.N., Shigenaga M.K. y Hagen T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7915-7922.
- Ashour M., Salem S., El-Gadban M., Elwan M. y Basu K. (1999). Antioxidant status in children with protein-energy malnutrition (PEM). Living in Cairo, Egypt. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 669-673.
- Ball A.M. y Sole M.J. (1998). Oxidative stress and the pathogenesis of heart failure. *Cardiology Clinics* 16, 665-675.
- Becker K., Leichserring M., Gana L., Bremer H. y Schimer R.H. (1995). Glutathione and associated antioxidant system in protein energy malnutrition: results of a study in Nigeria. *Free Radical Bio. Med.* 18, 257-263.
- Betancourt M., Ortiz R., González C., Pérez P., Cortés L., Rodríguez L. y Villaseñor L. (1995). Assessment of DNA damage by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat. Res.* 331, 65-77.
- Black R.E., Victora C.G., Walker S.P., Bhutta Z.A., Christian P., de Onis M., Ezzati M., Grantham-McGregor S., Katz J., Martorell R. y Uauy R. (2013). Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* 382, 427-451.
- Brewster D.R., Manary M.J., Menzies I.S., Henry R.L. y O'Loughlin E.V. (1997). Comparison of milk and maize based diets in kwashiorkor. *Arch. Dis. Child.* 76, 242-248.
- Brigotti M., Alfieri R., Seatili P., Bonelli M., Petronini P.G., Guidarelli A., Barbieri I., Stirpe F. y Sperti S. (2002). Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB J.* 16, 365-372.
- Brown K.H. (2003). Diarrhea and malnutrition. *J. Nutr.* 133, 328S-332S.
- Bull C.F., Mayrhofer G., Zeegers D., Mun G.L., Hande M.P. y Fenech C.F. (2012). Folate deficiency is associated with the formation of complex nuclear anomalies in the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 311-323.
- Cervantes-Ríos E., Ortiz-Muñoz R., Martínez-Hernández A.L., Cabrera-Rojo L., Graniel-Guerrero J. y Rodríguez-Cruz L. (2012). Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children. *Mutat. Res.* 731, 68-74.
- Cervantes E. (2012). Efecto de la desnutrición moderada y grave en la estabilidad genómica de niños menores de cinco años. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Chatterjee M. (2001). Vitamin D and genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 69-87.
- Claycombe K.J. y Meydani S.N. (2001). Vitamin E and genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 37-44.
- Cveticanin J., Joksic G., Leskovic A., Petrovic S., Sobot A.V. y Neskovic O. (2010). Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnol.* 21, 015102.
- Dertinger S., Tourus D., Hall N., Tometsko C. y Gasiewicz T. (2000). Malaria-infected erythrocytes serve as biological standards to ensure reliable and consistent scoring of micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Mutat. Res.* 464, 195-200.
- Dertinger S.D., Chen Y., Miller R.K., Rewer K.J., Smudzin T., Tourus D.K., Hall N.E., Olvany K., Murante F.G. y Tometsko C.R. (2003). Micronucleated CD71-positive reticulocytes: A blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. *Mutat. Res.* 542, 77-85.
- Dertinger S.D., Bishop M.E., McNamee J.P., Hayashi M., Suzuki T., Asano N., Nakajima M., Saito J., Moore N. y Tourus D.K. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: Intra- and inter-laboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicol. Sci.* 94, 83-91.
- Dertinger S.D., Miller R.K., Brewer K., Smudzin T., Tourus D.K., Roberts D.J., Avlasevich S.L., Sunugan S. y Chen Y. (2007). Automated human blood micronucleated reticulocyte measurements for rapid assessment of chromosomal damage. *Mutat. Res.* 626, 111-119.
- Dertinger S.D., Tourus D.K., Hayashi M. y MacGregor J.T. (2011). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform assessing *in vivo* cytogenetic damage. *Mutagenesis* 26, 139-145.
- Elsayh K.I., Sayed D.M., Zahran A.M., Saad K. y Badr G. (2013). Effects of pneumonia and malnutrition on

- the frequency of micronuclei in peripheral blood of pediatric patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 6, 942-950.
- Fang Y.Z., Yang S. y Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E. y Bonassi S. (1999). The HUMN Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428, 271-283.
- Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D. y Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125-132.
- Fuso A. (2013). The “golden age” of DNA methylation in neurodegenerative diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51, 523-534.
- Golden M.H. (2002). The development of concepts of malnutrition. *ASNS*. 2117S-2122S.
- Gómez F. (1946). Desnutrición. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 3, 543-551.
- Gómez F., Ramos-Galván R., Frenk S., Cravioto J.M., Chávez R., Gómez F. (2003). Desnutrición. *Salud Pública de México*, 45, S576-S582.
- Granot E. y Kohen R. (2004). Oxidative Stress in Childhood. In *Health and Disease States*. *Clin. Nutr.* 23, 3-11.
- Halliwell B. (2001). Vitamin C and genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 29-35.
- Holland N., Fucic A., Merlo D.F., Sram R. y Kirsch-Volders M. (2011). Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis* 26, 51-56.
- Hotchkiss C.E., Bishop M.E., Dertinger S.D., Slikker W., Moore M.M. y MacGregor J.T. (2008). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: as index of chromosomal damage in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Toxicol. Sci.* 102, 352-358.
- Iarmarcovai G., Bonassi S., Botta A., Baan R.A. y Orsiere T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat. Res.* 658, 215-233.
- Jain A., Varma M., Agrawal B.K. y Jadhav A.A. (2008). Serum zinc and malondialdehyde concentrations and their relation to total antioxidant capacity in protein energy malnutrition. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 54, 392-395.
- Lal A. y Ames B.N. (2011). Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. *Mutagenesis* 26, 57-62.
- Lau A., Belanger C.L. y Winn L. (2009). *In utero* and acute exposure to benzene: investigation of DNA double-strand breaks and DNA recombination in mice. *Mutat. Res.* 676, 74-82.
- Lehhartz H., Ndasi R., Anninos A., Bottcher D., Mayatepek E., Tetanye E. y Leischsenring M. (1998). The clinical manifestation of the Kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. *J. Pediatr.* 132, 879-881.
- Lazalde-Ramos B.P., Zamora-Pérez A., Sosa-Macías M., Guerrero-Velázquez C. y Zúñiga-González G. (2012). DNA oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch. Med. Res.* 43, 476-481.
- Luzhna L., Kathiria P. y Kovalchuk O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics* 4, 1-17.
- MacGregor J.T., Werh C.M., Hiatt R.A., Peters B., Tucker J.A., Langlois R.G., Jacob R.A., Jensen R.H., Yager J.W., Shigenaga M.K., Frei B., Eynon B.P. y Ames B.N. (1997). “Spontaneous” genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutat. Res.* 377, 125-135.
- MacGregor J.T., Bishop E.M., McNamee P.J., Hayashi M., Asano N., Wakata A., Nakajima M., Saito J., Aidoo A., Moore M.M. y Dertinger D.S. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. *Toxicol. Sci.* 94, 92-107.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I. y Kirsch-Volders M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88, 1515-1531.
- Medeiros M. (2008). Daño al ADN. En *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. (Konigsberg F.M.). Ed. Manual Moderno. México, D.F. pp. 120.
- Müller O. y Krawinkel M. (2005). Malnutrition and health in developing countries. *Can. Med. Assoc. J.* 173, 279-286.
- Ofer T., Ho E., Traber G.M., Bruno S.R., Kuypers A.F. y Ames N.B. (2004). A simple assay for frequency of chromosome breaks and loss (micronuclei) by flow cytometry of human reticulocytes. *FASEB J.* 19, 485-487.
- Olivares G.M., Hertrampf D.E. y Chadud M.P. (1992). Anemia del lactante desnutrido marasmico. *Rev. Ch. Pediatr.* 63, 191-195.
- Ortiz R., Cortés L., González C., López L., Pérez P., Cortés E. y Betancourt M. (1997). Analysis of mitomycin C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. *Environ. Mol. Mutagen.* 30, 363-370.
- Ortiz R., Medina H., Rodríguez L., González-Márquez H. y Cortés E. (2004). Spontaneous and mitomycin

- C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environ. Mol. Mutagen.* 43, 179-185.
- Ortiz R., Medina H., Cortés E., Cervantes E. y Rodríguez L. (2011). Trimethoprim-Sulfamethoxazole increase micronuclei formation in peripheral blood from weanling well-nourished and malnourished rats. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 673-680.
- Ramos-Galván R. (1976). Somatometría pediátrica. *Archivos de Investigación Médica (México)* 6, 1.
- Reid M., Badaloo A., Forrester T., Morlese F.J., Frazer M., Heird W. y Jahoor F. (2000). *In vivo* rates of erythrocyte glutathione synthesis in children with severe protein-energy malnutrition. *Am. J. Physiol-Endoc. M.* 278, E405-E412.
- Rodríguez L., Cervantes E. y Ortiz R. (2011). Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: A public health problem. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 8, 1174-1205.
- Sato S., Takizawa H. y Inui N. (1990). A comparison of micronucleus induction in 3 mouse strains with representative clastogens. *Toxicol. Lett.* 52, 215-220.
- Scrimshaw N.S. y SanGiovanni J.P. (1997). Synergism of nutrition, infection, and immunity: An overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 464S-477S.
- Sedelnikova O.A., Nakamura A., Kovalchuk O., Koturbash I., Mitchell S.A. y Marino S.A. (2007). DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.* 67, 4295-4302.
- Sestili P., Alfieri R., Carnicelli D., Martinelli C., Barbieri I., Bonelli M., Petronini P.G. y Brigotti M. (2005). Shiga toxin1 and ricin inhibit repair of H₂O₂ induced DNA single strands breaks in cultured mammalian. *DNA repair* 4, 271-277.
- Stopper H., Hempel K., Reiners C., Vershenya S., Lorenz R., Vukicevic V., Heidland A. y Grawe J. (2005). Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring. *Toxicol. Lett.* 156, 351-360.
- Tourous D., Hall N., Murante F., Gleason S., Tometsko C. y Dertinger S. (2003). Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy. *Toxicol. Sci.* 74, 309-314.
- Valencia-Quintana R., Sánchez-Alarcón J., Gómez-Arroyo S. y Cortés-Eslava J., Waliszewski S.M., Fernández S., y Villalobos-Pietrini R. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29, 133-157.
- Witt K.L., Livanos E., Kissling G.E., Torous D.K., Caspary W., Tice R.R. y Recio L. (2008). Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals. *Mutat. Res.* 649, 101-113.
- Zalacain M., Sierrasesúmaga L. y Patiño A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28, 227-236.