



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÓMICO EN LINFOCITOS DE
PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN
TERAPIA DE HEMODIÁLISIS**

Tesis que presenta:

ADOLFO GONZÁLEZ SILVA

Como requisito parcial para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Director de tesis:

Dra. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICHOACÁN. AGOSTO, 2009

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

ÍNDICE

	Página
1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3. Marco teórico.	4
3.1 Anatomía y fisiología de los riñones.	4
3.2 La nefrona.	5
3.3 Enfermedades que afectan a los riñones.	6
3.4 Insuficiencia renal.	7
3.5 Insuficiencia renal aguda.	7
3.6 Insuficiencia renal crónica.	7
3.7 Clasificación de la insuficiencia renal crónica.	8
3.8 Morbilidad y mortalidad en México de la insuficiencia renal crónica.	9
3.9 Diagnóstico de la insuficiencia renal crónica.	9
3.10 Tratamiento para la insuficiencia renal crónica.	10
3.11 Diabetes y la insuficiencia renal crónica.	10
3.12 Hipertensión y la insuficiencia renal crónica.	11
3.13 Generalidades de la diálisis.	11
3.14 La hemodiálisis.	11
3.15 Los micronúcleos.	13
4. Antecedentes.	17
5. Justificación.	18
6. Hipótesis.	19
7. Objetivo general.	20
7.1 Objetivos particulares.	20
8. Materiales y métodos.	21
8.1 Colecta de las muestras de sangre.	22
8.2 Cultivo de linfocitos.	22
8.3 Cosecha celular.	22
8.4 Preparación de laminillas.	22
8.5 Criterios de selección de Fenech.	23
8.6 Pruebas estadísticas.	25
9. Resultados.	26
10. Discusión.	31
11. Conclusión.	34
12. Referencias.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomía de los riñones.	5
Figura 2. La nefrona.	6
Figura 3. Diagrama esquemático del circuito de hemodiálisis.	12
Figura 4. Formación de micronúcleos.	14
Figura 5. Micronúcleos del grupo control y grupo de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis.	26
Figura 6. Linfocitos binucleados del grupo control y de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis.	27
Figura 7. Linfocitos trinucleados del grupo control y de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis.	28
Figura 8. Linfocitos tetranucleados del grupo control y pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis.	29
Figura 9. Linfocitos multinucleados del grupo control y pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis.	28
Figura 10. Imágenes representativas de linfocitos de pacientes con IRC en diferentes estadios de mitosis y con micronúcleos.	30

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de la enfermedad renal crónica .	8
Tabla 2. Criterios para la selección de células binucleadas y de micronúcleos en cultivo de células humanas.	24
Tabla 3. Factores que modifican el número de micronúcleos en cultivo de células humanas.	24

ABREVIACIONES

MN	Micronúcleos
IR	Insuficiencia renal
IRA	Insuficiencia renal aguda
IRC	Insuficiencia renal crónica
GFR	Tasa de filtración glomerular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BiN	Binucleadas
TriN	Trinucleadas
TetraN	Tetranucleadas
MultiN	Multinucleadas

RESUMEN

MARCO TEÓRICO. La insuficiencia renal (IR) es un problema de Salud Pública, que en los últimos años ha ido aumentando hasta llegar a ser una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo. En México la IR crónica (IRC), constituye un problema de salud frecuente en la población, que genera un alto costo social y económico. Actualmente existe un incremento de pacientes con este padecimiento, se estima que cada año el Sistema Nacional de Salud atiende 35 mil pacientes, la prevalencia de la IRC es similar a la observada en los países industrializados. A pesar de ser una causa importante de morbi-mortalidad, que repercute en el individuo, la familia y la sociedad, no se cuenta con estadísticas precisas acerca de las causas desencadenantes de IRC a nivel nacional.

OBJETIVO. Evaluar el daño cromosómico en linfocitos de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se realizó un estudio con dos grupos: uno de pacientes sanos (61 muestras, grupo control), y otro de 19 muestras de pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a terapia de hemodiálisis durante un promedio 8.3 años. En este estudio se cuantificó el daño genómico y para ello se utilizó como indicador el conteo de micronúcleos en células con gran actividad mitótica, como son los linfocitos.

RESULTADOS. Los resultados de este estudio muestran que hay mayor daño genómico (expresado como un incremento en la frecuencia de micronúcleos) en linfocitos de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis con respecto a individuos sanos.

CONCLUSIONES. El tratamiento de hemodiálisis en pacientes con IRC produce daño genómico con respecto a individuos sanos en la región de Michoacán, México.

2. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal (IR) es un problema de Salud Pública, que en los últimos años ha ido aumentando hasta llegar a ser una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo (Schoolwerth *et al.*, 2006). Esta consiste en la incapacidad de los riñones para mantener el plasma libre de desechos nitrogenados y otras impurezas, así como para mantener la homeostasis del agua, los electrolitos y el equilibrio ácido-base del organismo en su conjunto. Se puede acompañar de disminución (oliguria o anuria) o de aumento (poliuria) de la excreción de agua y puede ser aguda o crónica. A diferencia de la insuficiencia renal aguda (IRA), la insuficiencia renal crónica (IRC) empeora lentamente y es la consecuencia de cualquier enfermedad que produzca una pérdida gradual de la función renal. Esta enfermedad oscila desde la disfunción leve hasta una insuficiencia renal severa y puede llevar a una IR terminal (Guyton y Hall., 2001). Se considera una enfermedad silenciosa que afecta principalmente a personas con diabetes e hipertensión, y presenta los primeros síntomas cuando se encuentra en etapas avanzadas (Ruggenenti *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2002). Para poder subsistir a esta enfermedad se recurre a la diálisis, por la cual se extraen las toxinas que el riñón no elimina mediante un mecanismo artificial de filtración (William y Henrich, 2001). En México la IRC, constituye un problema de salud frecuente en la población, que genera un alto costo social y económico. Actualmente existe un incremento de pacientes con este padecimiento, se estima que cada año el Sistema Nacional de Salud atiende 35 mil pacientes, la prevalencia de la IRC es similar a la observada en los países industrializados. A pesar de ser una causa importante de morbi-mortalidad, que repercute en el individuo, la familia y la sociedad, no se cuenta con estadísticas precisas acerca de las causas desencadenantes de IRC a nivel nacional. Al respecto sólo existen reportes de algunas regiones del país, por lo que es importante contar con estadísticas de dicha enfermedad y que con base en éstas, se lleven a cabo medidas preventivas para evitar su desarrollo. Además de la diabetes y la hipertensión hay otros factores que inducen la IRC como son el consumo de tabaco y de alcohol (Amato *et al.*, 2001)

El objetivo del presente trabajo consistió en medir el daño cromosómico en linfocitos de pacientes con IRC que se están sometiendo a un tratamiento de hemodiálisis. Para ello se utilizó como indicador de daño cromosómico el conteo de micronúcleos en células con gran actividad mitótica, como son los linfocitos (Fenech y Morley, 1993).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LOS RIÑONES

Los riñones son órganos excretorios de los vertebrados con forma de haba. En el ser humano cada uno tiene aproximadamente el tamaño de su puño cerrado. Están situados en la parte posterior del abdomen, uno en cada lado de la columna vertebral. El riñón derecho descansa justo debajo del hígado, y el izquierdo debajo del diafragma, adyacente al bazo. Sobre cada riñón hay una glándula suprarrenal. Están ubicados en el retroperitoneo lo que significa que descansan detrás del mismo, aproximadamente a la altura de las primeras vértebras lumbares. Las partes superiores están protegidas parcialmente por las costillas 11 y 12, y cada uno es rodeado por dos capas de grasa peri-renal y para-renal. Tienen un lado cóncavo mirando hacia dentro (intermedio), como se muestra en la Figura 1. En la parte intermedia de cada riñón hay una abertura llamada hilio, que admite la arteria renal, la vena renal, los nervios y el uréter (Latarjet y Ruiz, 2004). Los riñones filtran sangre del aparato circulatorio y permiten la excreción a través de la orina de diversos residuos metabólicos del organismo como urea, creatinina, potasio y fósforo, por medio de un sistema complejo que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y excreción. Cada día los riñones procesan unos 200 litros de sangre para producir aproximadamente, 2 litros de orina. El riñón también secreta tres hormonas importantes como son: la eritropoyetina, la renina y la vitamina D (Guyton y Hall, 2001).

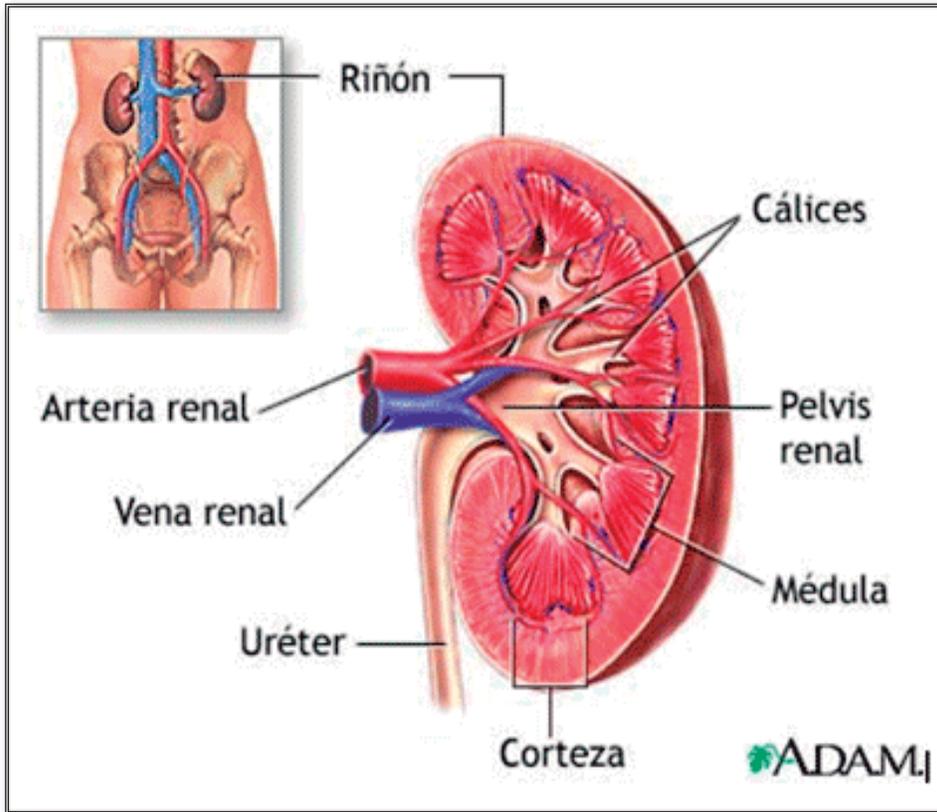


Figura 1. Ubicación anatómica de los riñones. Se indican las principales partes de salida y entrada de fluidos como la vena renal, la arteria renal, el uréter y otros componentes como cálices, pelvis renal, médula, corteza. (www.cancerinfo.es/img/riñon/.gif).

3.2 LA NEFRONA

La unidad básica funcional del riñón es la nefrona (Figura 2), de la que hay más de un millón dentro de la corteza y de la médula de cada riñón normal de un humano adulto. Las nefronas regulan en el cuerpo el agua y la materia insoluble (especialmente los electrolitos), al filtrar primero la sangre bajo presión, y enseguida reabsorbiendo algún líquido y moléculas necesarios nuevamente dentro de la sangre, mientras que secretan otras moléculas innecesarias. La reabsorción y la secreción son logradas con los mecanismos de cotransporte y contratransporte establecidos en las nefronas y conductos de recolección asociados. La filtración de la sangre ocurre en el glomérulo, un grupo de capilares que se encuentran dentro de la cápsula de Bowman del riñón (Drucker, 2005).

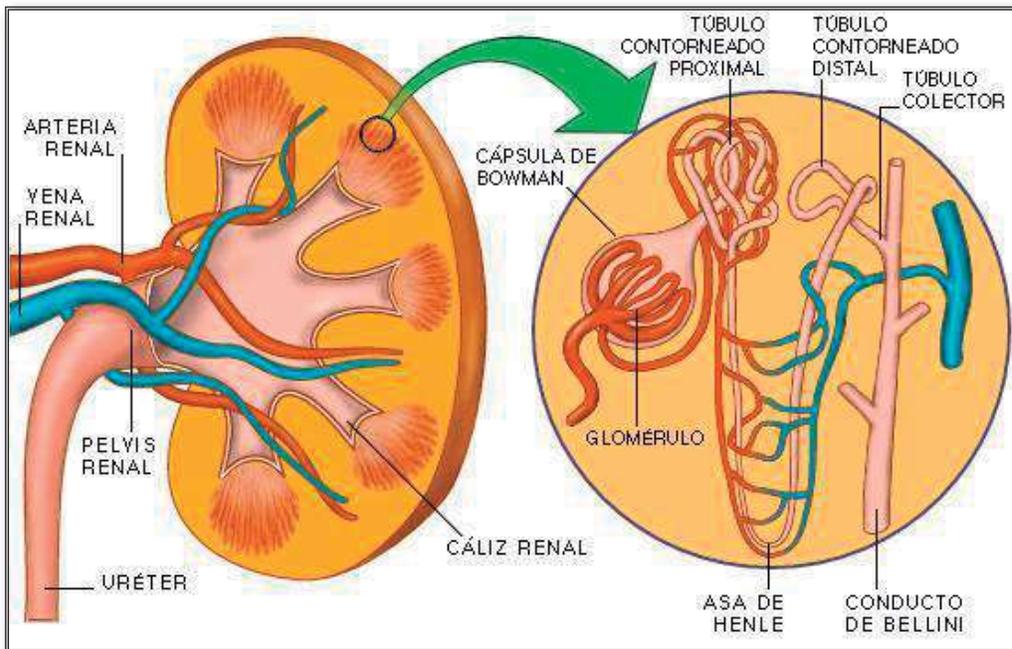


Figura 2. Ubicación de las nefronas en el riñón y cada una de sus partes: conducto de Bellini, túbulo colector, túbulo contorneado distal, asa de Henle, túbulo contorneado proximal, cápsula de Bowman y glomérulo. (www.recurso.cnecei.mec.es/.../riñonpntic2.jpg).

3.3 ENFERMEDADES QUE AFECTAN LOS RIÑONES

Casi todas las enfermedades de los riñones atacan a las nefronas y les hacen perder su capacidad de filtración. La lesión a las nefronas puede suceder rápidamente, a menudo como resultado de lesión o intoxicación. Las dos causas de enfermedad de los riñones más comunes son la diabetes y la hipertensión, en las cuales se va hacer énfasis posteriormente porque son causa de la insuficiencia renal crónica. Otras de las patologías que afectan a los riñones son la litiasis renal, la glomerulonefritis, enfermedades hereditarias y congénitas de los mismos (Avendaño, 2003).

3.4 INSUFICIENCIA RENAL

Se define como IR la pérdida de la función de los riñones, independientemente de la causa, y se clasifica en aguda o crónica en función de la forma de aparición (días, semanas, meses o años), y sobre todo en la recuperación o no de la lesión. Mientras que la IRA es reversible en la mayoría de los casos, la IRC presenta un curso progresivo. Esta evolución varía en función de la enfermedad causante, y dentro de la misma, de unos pacientes a otros (Guyton y Hall, 2001).

3.5 INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

La IRA se caracteriza por una pérdida repentina de la capacidad de los riñones para conservar y mantener el equilibrio de líquidos. En ocasiones los problemas renales agudos ocurren rápidamente, como en los casos en que un accidente lesiona los riñones, como la pérdida de mucha sangre, o por efecto de algunos medicamentos o sustancias venenosas. Si los riñones no sufren un daño grave, la función renal se puede recuperar. Generalmente la IRA es caracterizada por la oliguria, una producción disminuida de la orina, desequilibrios del agua y de fluidos corporales y desorden de electrolitos (Arakaki, 2003).

3.6 INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

La IRC se define como una pérdida lenta, progresiva e irreversible del filtrado glomerular. Cuando el filtrado glomerular de la sangre del riñón cae por debajo de 25 al 30% inicia un incremento en la urea y la creatinina. Generalmente cursa asintomática, hasta que desciende por debajo de 15 ml/min. Entonces aparecen las complicaciones propias del síndrome urémico, y se manifiesta mediante alteraciones digestivas, hematológicas, neurológicas, cardiovasculares y metabólicas (Gregor, 1997). La IRC puede ser causada por la diabetes o la presión arterial alta. La causa más frecuente es la diabetes *mellitus*, ya que se produce afectación renal a partir de los 10 años de evolución de la diabetes aunque se manifiesta clínicamente a los 20 años de haber aparecido la misma. Aparece la microalbuminuria (pérdida de albúmina por orina en cantidades mínimas), que

evolucionan hacia una proteinuria (pérdida de todo tipo de proteínas), con descenso progresivo de la función renal (Mogensen *et al.*, 1995). Influye en la evolución de la IRC el control de la diabetes y la aparición de patologías acompañantes como la hipertensión arterial. La hipertensión arterial produce una sobrecarga de presión en todo el árbol vascular, ante lo cual los vasos responden fortaleciendo su capa muscular. En el riñón se produce un engrosamiento de la pared de los vasos con disminución de su calibre, dando lugar a la isquemia renal, y, por otro lado, se produce un incremento en la presión glomerular en la que se somete a un excesivo trabajo al glomérulo. Clínicamente aparece como un deterioro progresivo de la función renal con aparición de proteinuria y microhematuria. El proceso se agrava con la edad (Ruggenti *et al.*, 2001).

3.7 CLASIFICACIÓN DE LA IRC

En la Tabla 1 se muestra la clasificación de la IRC, la cual consta de 5 etapas y considera la tasa de filtración glomerular (GFR), hasta la sustitución de la función renal por medio de una terapia de diálisis o en cualquiera, de sus modalidades o el trasplante renal (National Kidney Foundation, NKF-K/DOQI).

Tabla 1. Clasificación de la enfermedad renal crónica

Etapa	Descripción	Tasa de filtración glomerular (GFR)(ml/min./1.73m²)
	Por el aumento de riesgo	≥90 (con factores de riesgo de enfermedad renal
1.	Daño renal normal o con ↑ GFR	≥90
2.	Daño renal con leve ↓ GFR	60-89
3.	Moderado ↓ GFR	30-59
4.	Grave ↓ GFR	15-29
5	Insuficiencia renal	≥15 (o diálisis)

3.8 MORBILIDAD Y MORTALIDAD EN MÉXICO DE LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

La prevalencia de la IRC en México es similar a la observada en los países industrializados. Solo 1 de cada 4 pacientes en el país tienen actualmente acceso a terapia de sustitución renal (Amato *et al.*, 2005). En México la insuficiencia renal es una de las principales causas de atención hospitalaria ocupando el 4º lugar en hombres con 55033 casos y el 10º lugar en mujeres con 50924 casos con una tasa de 115.0 y 101.5 por cada 100 000 habitantes, respectivamente. Asimismo, se reporta una mortalidad hospitalaria en los hombres del 10º lugar con 1972 casos y una tasa de 155.6 por cada 100 000 habitantes, mientras que en las mujeres ocupa el segundo lugar con 1743 casos con una tasa de 62.5 por cada 100 000 habitantes (Sector Público del Sistema Nacional de Salud, 2000). Estas estadísticas han sido generadas únicamente por el Sector Público del Sistema Nacional de Salud (2000), por lo que es posible que la mortalidad atribuida a la IRC sea aún mayor.

3.9 DIAGNÓSTICO DE LA IRC

Las primeras etapas de la enfermedad renal pueden ser detectadas mediante pruebas de laboratorio. La medición de la creatinina sérica y la estimación de la GFR pueden identificar a los pacientes con función renal reducida (Perrone *et al.*, 1999). El nivel de GFR es aceptado como la mejor medida de la cantidad total de la función renal en la salud y la enfermedad. Los marcadores de daño renal varían según el tipo de enfermedad renal y pueden incluir alteraciones en la composición de la sangre o normalidades en los estudios serológicos, la biopsia renal o imágenes del tracto urinario con ecografía o tomografía computarizada. La medición de la excreción urinaria de albúmina también puede marcar un daño (Rahman y Smith, 1998).

3.10 TRATAMIENTO PARA LA IRC

Es importante iniciar el tratamiento de la insuficiencia renal precozmente con el fin de evitar complicaciones, prever secuelas a largo plazo y evitar en la medida de lo posible la progresión de la enfermedad. Existen diferentes tratamientos sustitutivos de la función renal, y se eligen según el progreso de la enfermedad. Entre estos se encuentran la prediálisis, diálisis, hemodiálisis, los correctores electrolíticos como los quelantes del fósforo con aporte o no de calcio (Atsumi *et al.*, 1999) o los correctores hormonales como la vitamina D que ayudan a controlar el aumento de la hormona paratiroidea, y favorece la absorción de calcio y la mineralización ósea (Ho y Sprague, 2002).

3.11 DIABETES Y LA IRC

La diabetes *mellitus* es una enfermedad que se genera cuando el organismo no produce suficiente insulina o no puede utilizar la insulina que produce. La insulina es una hormona que controla la cantidad de glucosa en la sangre. Hay diabetes *mellitus* tipo 1 y 2. La tipo 1 es cuando el organismo no produce insulina y por lo tanto se tiene que suministrar para tener un control de la enfermedad. En la tipo 2 si se produce insulina pero no se puede utilizar adecuadamente. La diabetes *mellitus* tipo 2 es una enfermedad crónica, hereditaria de etiología múltiple y es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia (ADA, 2005). Cuando la diabetes no esta bien controlada se produce hiperglucemia que puede dañar muchos órganos como es el caso de los riñones, especialmente el daño en la nefrona por la glucosa no utilizada en la sangre se llama nefropatía diabética, la cual se caracteriza por una complicación microvascular (ADA, 2003). Las principales intervenciones para prevenir o reducir la nefropatía diabética es el control de la glucosa en la sangre, o el control de la presión arterial (Agarwal, 2002).

3.12 HIPERTENSIÓN Y LA IRC

La hipertensión (o tensión arterial alta) es una enfermedad muy común en todo el mundo que afecta a más del 20% de los adultos entre 40 y 65 años y casi al 50% en las personas de más de 65 años (Chobanian *et al.*, 2003). El vínculo entre la hipertensión y la insuficiencia renal se identificó desde los trabajos iniciales de Richard Bright en 1836. Con el tiempo, la hipertensión puede dañar a los vasos sanguíneos. Esto puede reducir el suministro de sangre en órganos importantes como los riñones. En consecuencia, los riñones pueden dejar de eliminar los desechos y líquidos extras en la sangre, lo que puede aumentar aun más la presión arterial. La hipertensión puede ser también una complicación que influye en la progresión de la IRC y su control es fundamental en dicha progresión (Locatelli, 1996). Diferentes estudios epidemiológicos y ensayos clínicos demuestran que la hipertensión es un factor independiente que favorece el deterioro renal (National Kidney Foundation, NKF-K/DOQI).

3.13 GENERALIDADES DE LA DIÁLISIS

La diálisis es un procedimiento que se realiza para retirar los elementos tóxicos (impurezas o desechos) de la sangre cuando los riñones no pueden hacerlo. La diálisis es mucho más frecuente en pacientes con insuficiencia renal aunque también se puede usar para remover con rapidez drogas o sustancias tóxicas en situaciones agudas (The Kidney Dialysis Foundation, KDF).

3.14 LA HEMODIÁLISIS

La hemodiálisis se realiza al hacer circular la sangre a través de una membrana semipermeable (dializador o filtro), junto con soluciones que ayudan a eliminar las toxinas. Esta requiere de un flujo de sangre de 400 a 500 mililitros por minuto. Una sonda intravenosa en un brazo o pierna no soporta ese volumen de flujo sanguíneo, por lo que la diálisis utiliza formas especiales para la circulación de la sangre. El acceso puede ser temporal o permanente. El primero toma la forma de catéteres para diálisis, que son de gran tamaño (tubos huecos de uso médico), colocados en las venas grandes, que pueden soportar flujos de sangre

considerables. La mayoría de los catéteres se utilizan en situaciones de emergencia durante cortos periodos de tiempo. Sin embargo, los catéteres en forma de túnel se pueden usar durante periodos prolongados, semanas o meses (William y Henrich, 2001).

En la hemodiálisis la sangre se desvía desde el punto de acceso del cuerpo del paciente a una máquina de diálisis (Figura 4). La sangre es tomada de la arteria mediante una bomba circulando por un circuito extracorpóreo hasta llegar a un filtro llamado dializador, el cual tiene unos compartimentos donde circula la sangre que están separados por una membrana semipermeable, por lo que por medio de la difusión de solutos se desechan las sustancias elevadas y se corrigen los desequilibrios. Finalmente, la sangre es retornada al cuerpo después de varias veces de recirculación según la concentración de sustancias acumuladas por la IRC. Clásicamente, la mayoría de los pacientes se somete a hemodiálisis durante 3 secciones cada semana y cada sección dura de 3 a 4 horas (William y Henrich, 2001)

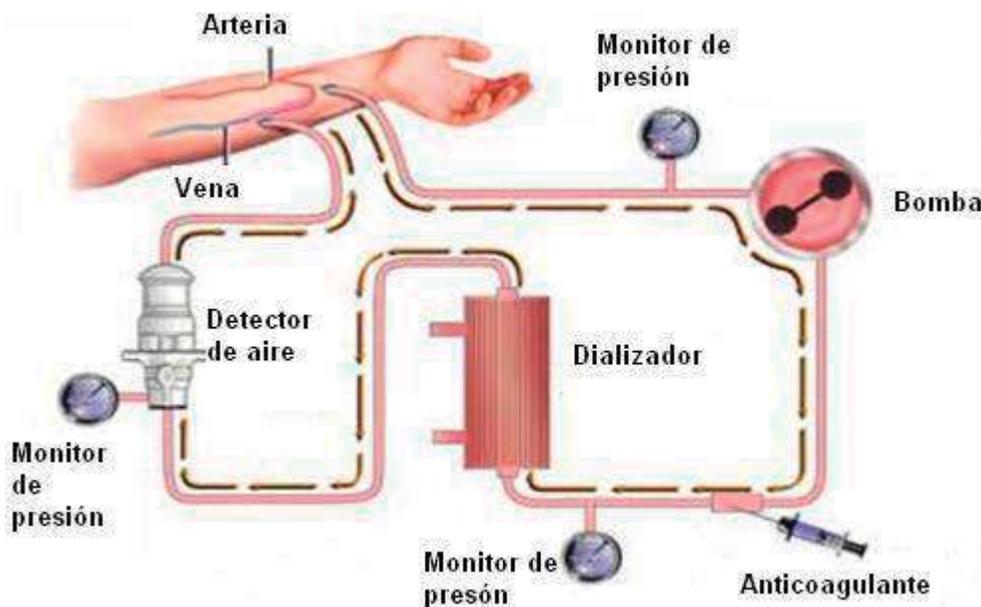


Figura 3. Diagrama esquemático de un circuito de hemodiálisis. Fistula arteriovenosa conectada al equipo de hemodiálisis, la sangre sale por la arteria llegando al dializador y regresa por la vena. (www.butler.org/.../images/si55551793_ma.jpg).

3.15 LOS MICRONÚCLEOS

Son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, durante la división celular el material genético (DNA) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a: 1) errores durante la replicación y posterior división del DNA, 2) a roturas cromosómicas, y 3) al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado “micronúcleo” (MN), visible fácilmente al microscopio óptico (figura 4) (Fenech *et al.*, 1999). El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante el anafase de la mitosis.

El recuento de micronúcleos es una técnica citogenética que se utiliza como una medida de daño cromosómico en cultivos de células con una alta tasa de división, como son los linfocitos de la sangre periférica, las células epiteliales y los fibroblastos entre otros. Esta técnica fue propuesta inicialmente por Countryman y Heddle (1976) como un ensayo de genotoxicidad de tipos celulares con gran actividad mitótica. Más tarde, este ensayo fue mejorado por Fenech y Morley (1985), consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: *cytokinesis-blockmicronucleus*), cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B, el cual impide la citocinesis celular. La citocalasina-B es una molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis al imposibilitar la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular en telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo.

Así, las células que han llevado a cabo un solo ciclo de división son identificadas por su aspecto binucleado.

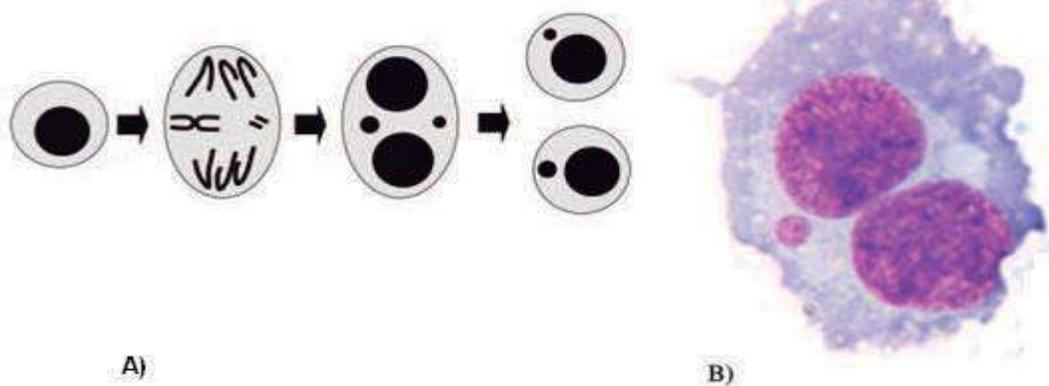


Figura 4. Formación de micronúcleos. A) Pérdida o ruptura cromosómica, se originan células nuevas con MN después de la mitosis. B) Se muestra una célula binucleada con un micronúcleo. (Adaptada de Fenech. 1999).

El ensayo de los micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos humanos es uno de los métodos más comúnmente utilizados para medir daño al DNA debido a que es relativamente más fácil registrar micronúcleos que aberraciones cromosómicas. Además de que esta determinación se ha considerado como un biomarcador efectivo de enfermedad en procesos asociados con inducción de daño al DNA. La simplicidad de esta prueba ha permitido su inclusión tanto para ensayos de genotoxicidad *in vitro* como para estudios de monitoreo de poblaciones humanas (Bonassi *et al.*, 2001). También es útil para la evaluación de la radiosensibilidad celular intrínseca en células tumorales y linfocitos, y ha sido utilizada en estudios *in vitro* en linfocitos de pacientes sometidos a radioterapia con el objeto de evaluar el efecto clastogénico inducido por el tratamiento (Thierens *et al.*, 1995). En el área de Nefrología Clínica ha tenido una gran aplicación en la evaluación del daño genómico en pacientes en diálisis y hemodiálisis.

Diversos estudios se han centrado en evaluar drogas citostáticas utilizadas en los protocolos antitumorales en pacientes con cáncer, cuya acción está dirigida a frenar la proliferación celular. La exposición reiterada a agentes citostáticos puede

causar efectos adversos tales como mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer, debido a que pueden provocar daños genéticos y alterar los mecanismos de división en células que se multiplican rápidamente. El resultado de estos trabajos demostró que los complejos químicos utilizados incrementan de modo significativo el número de MN (Migliore *et al.*, 1991; Jagetia *et al.*, 2001).

También se ha demostrado que los trabajadores en zonas hospitalarias o de fábricas cuya labor diaria les hace estar sometidos a la exposición de agentes tóxicos, presentan un mayor número de MN (Yager *et al.*, 1998). El ensayo de MN también ha sido aplicado para conocer el efecto de determinados pesticidas y plaguicidas, productos químicos considerados de riesgo para los seres vivos; existen estudios tanto con ratones como con humanos, donde se demuestra el efecto potenciador de estos productos sobre el índice de micronúcleos (Pastor *et al.*, 2000; Siu *et al.*, 2004).

Con respecto al efecto de los metabolitos tóxicos del tabaco medido mediante el ensayo de MN existe una gran controversia, ya que varios trabajos han demostrado que el hábito de fumar no se veía reflejado en la frecuencia de MN frente a grupos controles no fumadores (Bolognesi *et al.*, 2002; Barale *et al.*, 1998). Al contrario, varias investigaciones han detectado diferencias entre grupos de fumadores y no fumadores; en un estudio realizado en personas expuestas a bajas dosis de radiación por su actividad laboral se observaron frecuencias de MN significativamente incrementadas en el grupo de personas expuestas a radiación que fumaban frente a los no fumadores expuestos (Maffei *et al.*, 2002).

En otro estudio se observó un ligero aumento en el número de MN del grupo fumador frente al no fumador y una clara asociación entre años de consumo de tabaco e incremento de la frecuencia de MN (Au *et al.*, 1991). En el mismo año se realizó otro estudio donde se concluyó que la frecuencia de células micronucleadas en el grupo de fumadores era 70% más alta que el observado en el grupo de no fumadores (Tomanin *et al.*, 1991). El mismo resultado fue observado por otros autores quienes concluyeron que el consumo de alcohol sumado al hecho de ser fumador activo incrementaba significativamente el número

de MN, y además el consumo de té disminuía el número de MN producidos por el hábito fumador (Xue *et al.*, 1992).

Dos estudios en años consecutivos volvieron a demostrar el incremento de la frecuencia de MN en los grupos fumadores siendo el índice de MN 25% mayor que el de los grupos no fumadores (Bonassi *et al.*, 2003; Giorgio *et al.*, 1994).

4. ANTECEDENTES

UTILIDAD DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS COMO MEDIDA DE INESTABILIDAD GENÉTICA INDUCIDA POR LA HEMODIÁLISIS

Un estudio de Stopper *et al.*, (1999) evaluó el daño genómico por medio de la frecuencia de MN. Se trabajó con un grupo control de 23 pacientes sanos, con un grupo de 19 pacientes con IRC grave no dializados y otro grupo de 16 pacientes en terapia de hemodiálisis durante un periodo de 10 años promedio.

La principal conclusión de este estudio fue que se presentó una mayor frecuencia de micronúcleos en los pacientes que habían sido sometidos a terapia de hemodiálisis a largo plazo, sugiriendo que este tipo de terapias generan un mayor daño genómico.

5. JUSTIFICACIÓN

La IRC es una de las enfermedades que generan altos costos económicos y sociales para cualquier sociedad, incluyendo las más desarrolladas. En México, la prevalencia de la IRC es muy elevada. Se ha calculado que cada año hay 35 mil pacientes con IRC en el Sistema Nacional de Salud. Reportes previos han señalado que pacientes con daño renal sometidos a hemodiálisis por un periodo de 10 años, presentan mayor daño genómico que pacientes con IRC no dializados o que el grupo control (Stopper *et al.*, 1999); sin embargo, este tipo de estudios no se han realizado en pacientes con IRC bajo terapia de hemodiálisis en México, por lo que los datos generados de este trabajo permitirán conocer el daño genómico de pacientes en terapia de hemodiálisis en la región de Michoacán, México.

6. HIPÓTESIS

Los pacientes en terapia de hemodiálisis en la región de Michoacán, México, presentan un daño cromosómico expresado en un mayor número de micronúcleos en comparación con un grupo control.

7. OBJETIVO GENERAL

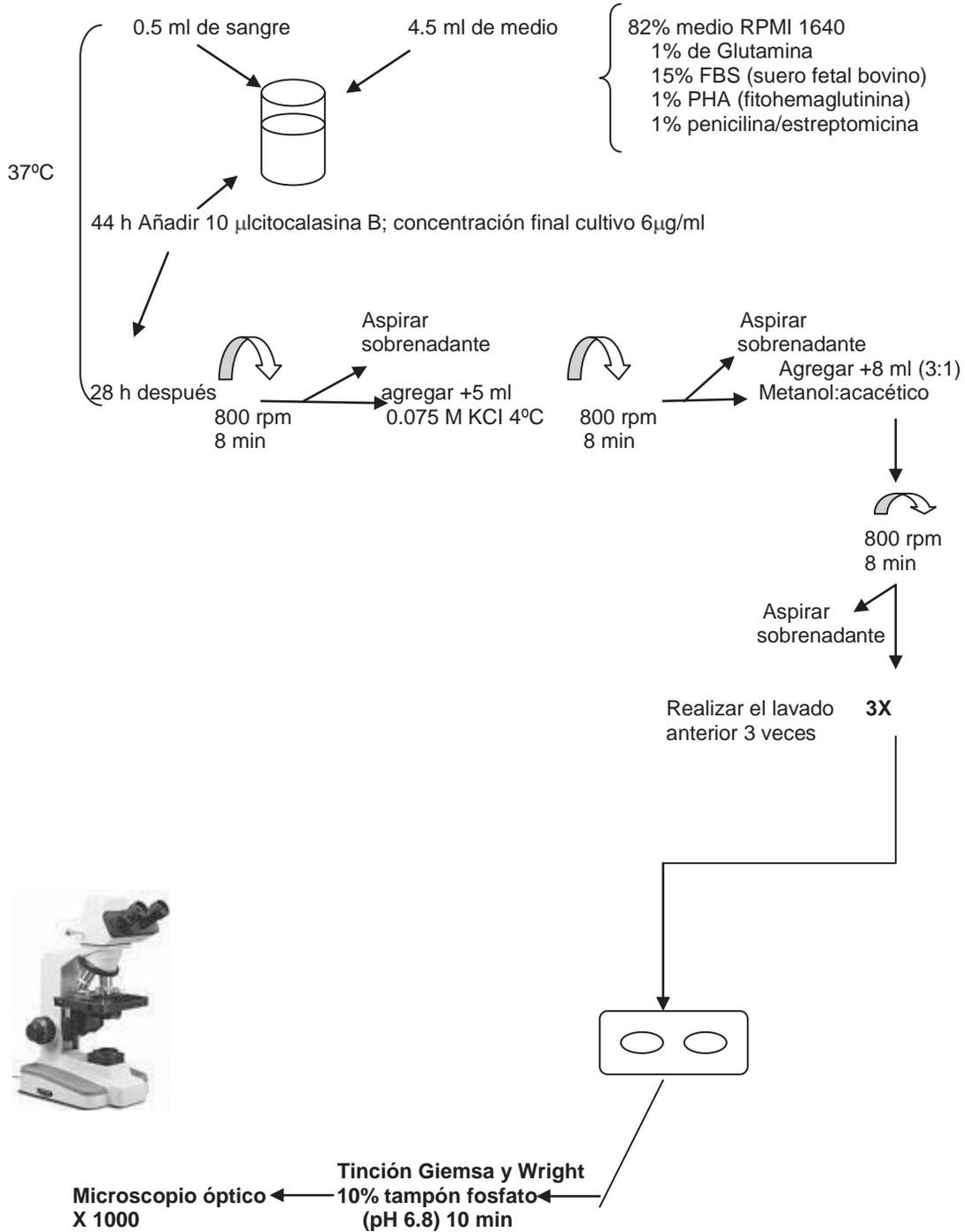
Evaluar el daño cromosómico en linfocitos de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener linfocitos de sangre periférica de pacientes de un grupo control y un grupo experimental con IRC en terapia de hemodiálisis.
2. Determinar la frecuencia de micronúcleos en cada uno de los pacientes del grupo control y del grupo experimental con IRC en terapia de hemodiálisis.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

En condiciones de esterilidad se obtuvo la sangre venosa de pacientes (en tubos para biometría hemática, BH) de un grupo control y de pacientes sometidos a terapia de hemodiálisis durante un promedio de 8.3 años, en el Hospital General Regional # 1 IMSS de Morelia, Michoacán, México.

8.2 CULTIVO DE LINFOCITOS

A partir de los tubos de BH con sangre total se realizó el cultivo de linfocitos. En una campana de flujo laminar se tomó (por duplicado) 0.5 ml de sangre periférica y se colocó en un tubo falcón de 15 ml estéril que contenía 4.5 ml de medio preparado comercialmente (PB MAX, kariotyping medium, para cultivo de linfocitos de sangre total, adicionado con suero fetal bovino, L-glutamina y fitohemaglutinina) y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ (5%) en posición casi horizontal. Todos los reactivos para cultivo se obtuvieron de Gibco. Después de 44 h de incubación se adicionó a los cultivos citocalasina-B (Sigma) a una concentración de 6 µg/ml y se continuó la incubación por 28 h más.

8.3 COSECHA DE LAS CÉLULAS

Al cabo de 72 h se centrifugaron los cultivos a 3500 rpm durante 8 min y se eliminó el sobrenadante. Se agregó una solución hipotónica de KCl 0.075 M, previamente a 37°C, hasta doblar aproximadamente el tamaño de la pastilla. A continuación, se resuspendió la pastilla cuidadosamente sin burbujear y se incubó a 37°C por 45 min. Se centrifugó durante 8 min a 3500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 8 ml de la solución fijadora (MeOH/Ac, acético 3:1), se resuspendió y se realizaron tres series de lavados-resuspensión-centrifugación con solución fijadora.

8.4 PREPARACIÓN DE LAS LAMINILLAS

La suspensión anterior se goteó sobre portaobjetos limpios y mantenidos a 4°C. Se colocaron tres gotas distribuidas en el portaobjetos, se inclinó la laminilla sobre la flama de un mechero. Un día después se tiñeron las laminillas con solución

Wright al 4% en buffer de fosfatos (0.01 M, pH 6.8), durante 5 min. Se contratiñeron con Giemsa al 4% en buffer de fosfatos, durante 5 min. Las laminillas se visualizaron al microscopio de luz (objetivo 100 X) y se realizó el recuento de MN. Para ello en cada laminilla se registró un mínimo de 500 a 1000 células binucleadas con citoplasma bien conservado, por cultivo y por individuo. La identificación se realizó de acuerdo a los criterios de Fenech los cuales se mencionan posteriormente, éstos proporcionan datos de la cinética de proliferación, y se determinó la frecuencia de las células bi-, tri-, tetra- y multinucleadas.

8.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE FENECH

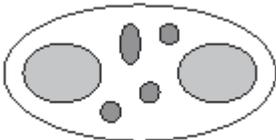
Se han descrito criterios de selección de los MN que presentan las características necesarias para ser reconocidos como tales, con el propósito de que el recuento realizado sea fiable y objetivo. Los criterios de selección de las células binucleadas (BN) y MN se describen en forma resumida en la Tabla 2. Aunque en teoría los linfocitos en cultivo se dividen en forma sincronizada, en la práctica no ocurre de forma idéntica en todas las células del cultivo, de manera que se pueden encontrar en un mismo cultivo células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas y multinucleadas, en vías de apoptosis y necrosis, por lo que es necesario reconocer las características de estas últimas para que sean eliminadas del recuento, ya que solo deben incluirse células viables. Las células en vías de apoptosis se caracterizan por la cromatina condensada que en etapas tempranas puede manifestarse como cromatina marginal y que más tarde culmina en la fragmentación del material nuclear, quedando éste disperso en el citoplasma y reflejándose en una tinción más oscura con respecto a la habitual. En el caso de los fenómenos necróticos, las células muestran citoplasmas pálidos, presencia de vacuolas que se localizan principalmente en el citoplasma, daño evidente en la membrana citoplasmática con núcleos intactos en etapas tempranas de necrosis; pérdida del citoplasma y daño irregular en la membrana nuclear, con solo una parte de la estructura nuclear intacta. En la Tabla 3, se describen algunos de los factores que incrementan el

número de MN en cultivos de células humanas (<http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/projects/lymphocytes/variability>).

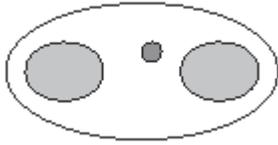
Tabla 2. Criterios definidos de Fenech para la selección de células binucleadas y de micronúcleos en cultivo de células humanas.

Criterios para células binucleadas	Criterios para micronúcleos
El citoplasma debe distinguirse claramente.	El diámetro oscila ente 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal.
Membranas citoplasmática y nuclear intacta.	No refractarios.
Núcleos con similar grado de condensación de la cromatina.	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior.
Igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de tinción.	Forma similar a los núcleos de la célula binucleadas.
Pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos.	No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada
Puede tocarse pero no solaparse.	Pueden tocar núcleos de la célula binucleadas pero no solaparse con ellos.
Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis.	

Tabla 3. Factores que modifican el número de micronúcleos en cultivo de células de humanos.

<p>Incrementa el número de micronúcleos.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Edad • Presencia de homocisteína plasmática • Déficit de folato y vitamina B12 • Procesos fisiológicos (menopausia y osteoporosis) • Drogas citostáticas (tratamientos antitumorales) • Alcohol • Exposición a agentes tóxicos a diario
--	--

Reducen el número de micronúcleos.



- Agentes antioxidantes
- Vitamina E y C
- β - caroteno
- Infusiones de ginseng y té

8.6 PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Se realizó la prueba T de student para muestras no pareadas de 2 colas. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.01$.

9. RESULTADOS

Se obtuvieron 61 muestras de linfocitos de individuos sanos, y 19 muestras de pacientes con IRC sometidos a terapia de hemodiálisis durante un periodo promedio de 8.3 años, con una TFG menor a 15 ml/min, las cuales se procesaron para determinar la frecuencia de micronúcleos. En la Figura 5 se muestra la media de la frecuencia de MN obtenidos a partir del conteo de ~500 células binucleadas en cada grupo, en los pacientes sanos se observó una media de 24.5 células que presentaba MN. Los pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis presentaron un incremento en las células con MN (38), se puede apreciar que hay un mayor número de células con MN (13.5) en los pacientes sometidos a hemodiálisis respecto al grupo control.

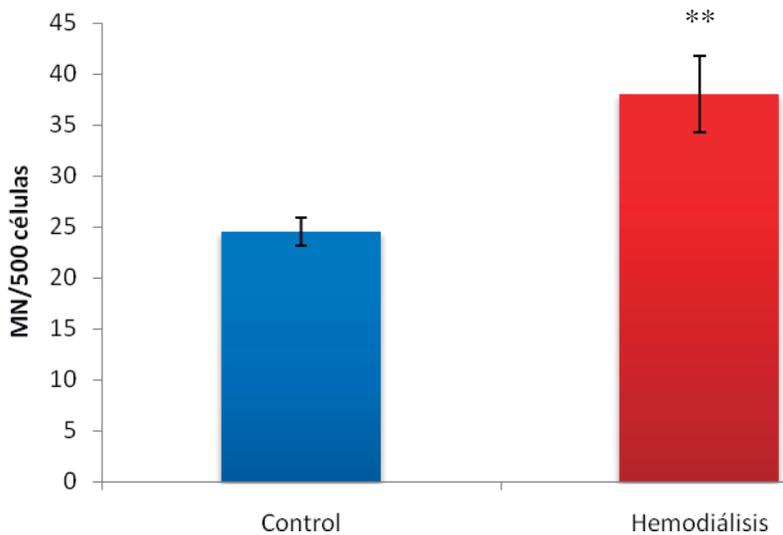


Figura 5. Micronúcleos del grupo control y grupo de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis. (**Significativo cuando $P < 0.01$, con respecto al grupo control).

La Figura 6 muestra la frecuencia de linfocitos binucleados en cada uno de los grupos, la media del grupo control fue de 482.8, en tanto los pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis presentaron una media de 490.8; como se puede apreciar no hubo una diferencia significativa entre los 2 grupos, por lo tanto la IRC y la terapia de hemodiálisis no afecta el índice de replicación de los linfocitos.

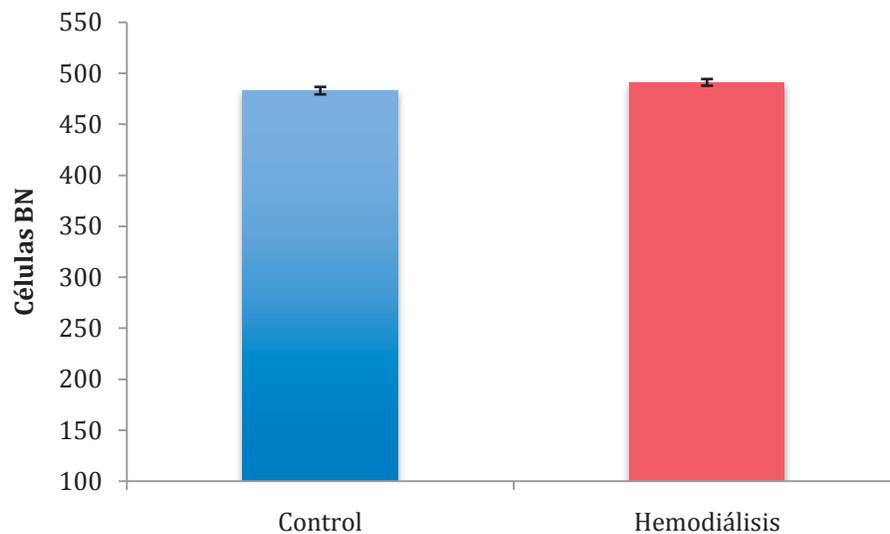


Figura 6. Linfocitos binucleados del grupo control y grupo de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis. (**Significativo cuando $P < 0.01$, con respecto al grupo control).

En el presente trabajo el protocolo se diseñó para que la mitosis se llevara a cabo una sola vez, para ello se inhibió la proliferación con citocalasina-B. Sin embargo, se conoce que algunas células (ej. Irradiadas) pueden dividirse en más ocasiones, estas células también pueden ser un parámetro para medir el daño por lo que se tomaron en cuenta y enseguida se mencionan. Con respecto a la frecuencia de células trinucleadas (Figura 7), la media del grupo control fue de 10.6, en tanto en los pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis se observaron

2.8; se puede apreciar que este grupo presenta una menor frecuencia que el grupo control.

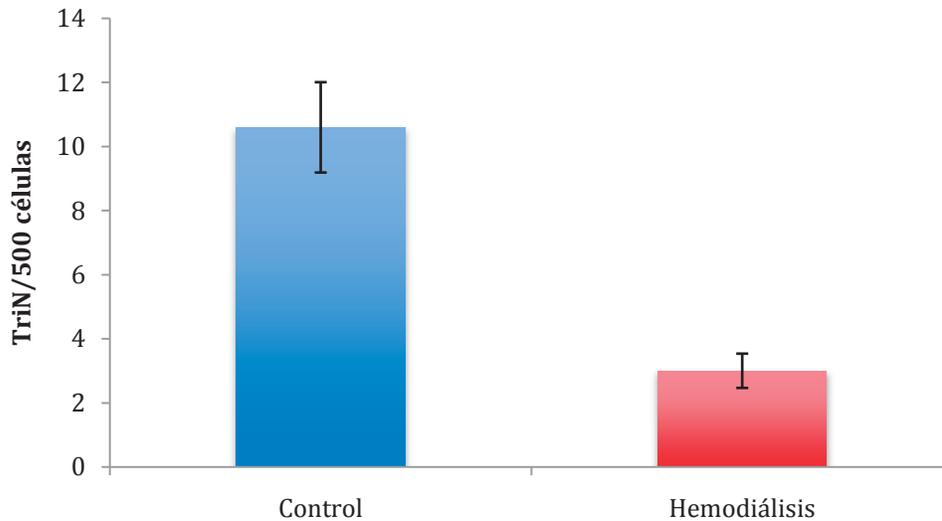


Figura 7. Linfocitos trinucleados del grupo control y grupo de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis. (**Significativo cuando $P < 0.01$, con respecto al grupo control).

Este mismo comportamiento se observó para la frecuencia de células tetranucleadas (Figura 8), el grupo control presentó una mayor frecuencia de este tipo de células (5.6) en relación a los pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis (0.8). Con respecto a la frecuencia de células multinucleadas (Figura 9), en el grupo de pacientes sometidos a terapia de hemodiálisis no se encontraron este tipo de células; no obstante, el grupo control presentó un 1% de este tipo de células.

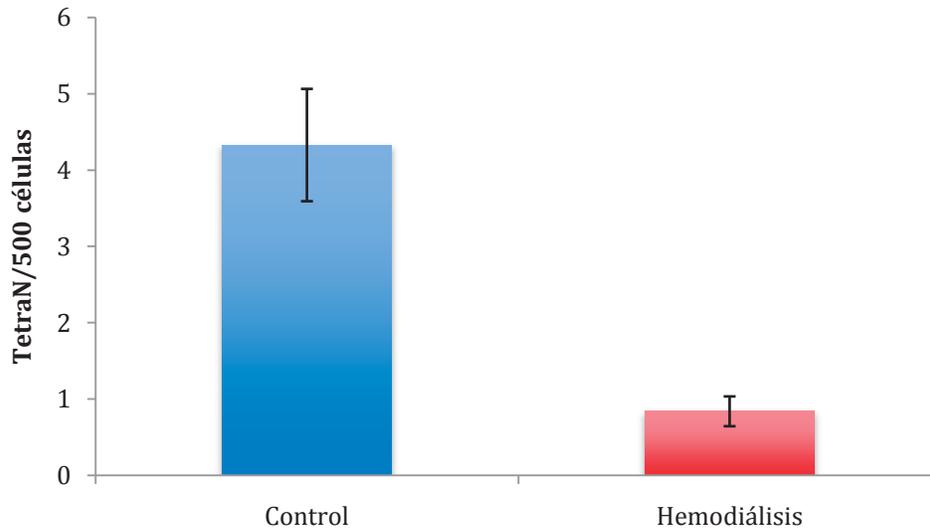


Figura 8. Linfocitos tetranucleados del grupo control y grupo de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis. (**Significativo cuando $P < 0.01$, con respecto al grupo control).

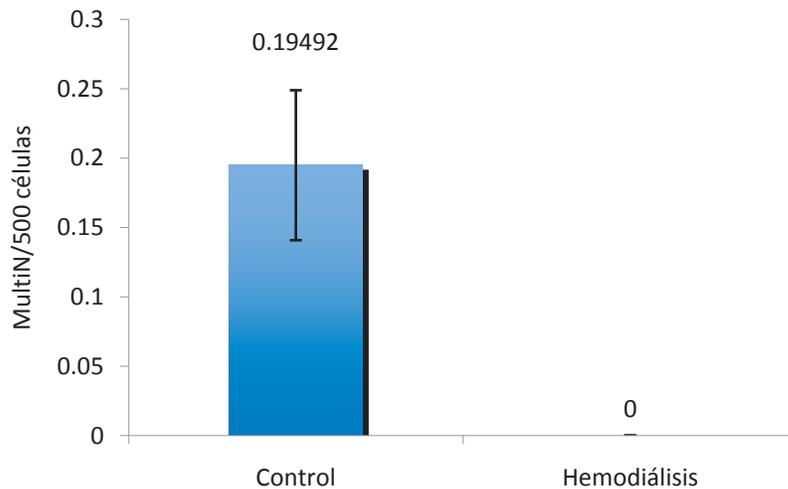


Figura 9. Linfocitos multinucleados del grupo control y grupo de pacientes con IRC en terapia de hemodiálisis. (**Significativo cuando $P < 0.01$, con respecto al grupo control).

En la Figura 10 se presentan fotografías representativas de los diferentes estadios de la mitosis de células encontradas en el grupo de pacientes con IRC sometidos a terapia de hemodiálisis.

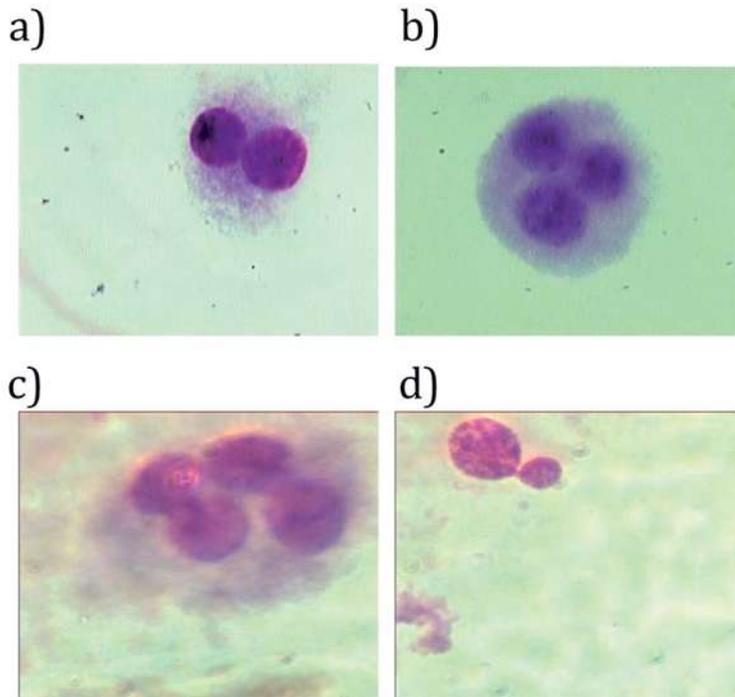


Figura 10. Imágenes representativas de linfocitos de pacientes con IRC tomadas con microscopio de luz con el objetivo de 100X. a) Linfocitos binucleados. b) Linfocitos trinucleados. c) Linfocitos tetranucleados. d) Linfocitos con micronúcleos.

10. DISCUSIÓN

En pacientes con IRC se ha observado un incremento en el daño genómico respecto a la población sana. Se presume que el aumento de la inestabilidad genética podría estar relacionada con la incidencia de patología neoplásica y cardiovascular observada en este tipo de pacientes (Buemi *et al.*, 1999; Herzong *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permiten comprobar nuestra hipótesis de que el paciente con IRC terminal sometido a tratamiento sustitutivo de la función renal en hemodiálisis genera mayor daño genómico en comparación con la población sana. Para poder cumplir este objetivo se cuantificó el número de micronúcleos de células binucleadas del grupo de pacientes con IRC, y se comparó con un grupo control de individuos sanos. Paralelamente se cuantificó el número de células bi, tri, tetra y multinucleadas. El conteo de micronúcleos como indicador de daño genético se fundamenta en que durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado "micronúcleo (Fenech *et al.*, 1999)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que en las 61 muestras de linfocitos de individuos sanos se obtuvo una media de 24.5 células con micronúcleos de una población de 500 células binucleadas por individuo (Figura 6); mientras que en el grupo de 19 pacientes con IRC sometidos a hemodiálisis, se obtuvo una media de 38 células con micronúcleos de una población de 500 células binucleadas por individuo. Este daño se puede atribuir a los agentes genotóxicos que se generan por la terapia de hemodiálisis asociados con un deficiente mecanismo de reparación del daño al ADN. Según el grupo de Stopper *et al.*, (2004), la terapia de hemodiálisis está asociada a una alta

incidencia de producción de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de las frecuentes infecciones crónicas y/o a la compatibilidad con las membranas de diálisis. Además, los pacientes sometidos a hemodiálisis presentan una reducida respuesta con antioxidantes. Los resultados aquí mostrados corresponden a un grupo de pacientes sometidos a hemodiálisis en un periodo promedio de 8.3 años, lo cual se consideraba como poco tiempo para desarrollar daño genómico con base a los reportes que demuestran daño genómico en terapias a largo plazo (más de diez años, Stopper *et al.*, 1999; Fragedaki *et al.*, 2005). Además, hasta el momento en México no se han hecho estudios de este tipo por lo que los resultados aquí mostrados representan nuevos datos relacionados con el daño ocasionado por la hemodiálisis.

Por otra parte, los datos mostrados en la Figura 7, demuestran un número similar de células binucleadas tanto en el grupo control, como en el grupo de pacientes con IRC sometido a hemodiálisis. Este resultado además de coincidir con reportes previos (Stopper *et al.*, 1999), indica que la IRC no afecta la capacidad de replicación de los linfocitos periféricos *in vitro*.

Según un estudio de Müller y Rode (2002), linfocitos irradiados muestran una relación mayor de células tri-tetranucleadas, de 1:1 llega hasta 50:1 dependiendo de la intensidad de la radiación. Este también puede ser un parámetro para determinar daño genómico. En este trabajo se encontró una relación de linfocitos tri-tetranucleados de 2.44 en el grupo control y de 3.56 en el grupo de pacientes con IRC sometidos a hemodiálisis (Figuras 8 y 9). A pesar de que la relación es mayor en el grupo de pacientes con IRC, no existe ningún tipo de estudio similar a éste con el cual se puedan comparar estos datos. Finalmente, la presencia de células multinucleadas es muy baja en ambos grupos (Figura 10), por lo que no puede considerarse como un indicador de daño genómico.

En las últimas décadas, el daño cardiovascular en los pacientes nefrópatas se ha documentado consistentemente. Sin embargo, los estudios realizados sobre la influencia del daño genómico con el desarrollo del cáncer en pacientes prevalentes en diálisis no son concluyentes. La tendencia actual es establecer una asociación relacionada en el daño oxidativo. Se conocen numerosos factores que

influyen en los mecanismos relacionados en este fenómeno. Dentro de estas, de importancia fundamental son la anemia, la microinflamación, el estrés oxidativo y carbonilo (Viek *et al.*, 2007).

La anemia se caracteriza por alteraciones funcionales que resulta de la insuficiencia renal, disminuyendo la capacidad de remover solutos orgánicos (elementos azoados). Estas toxinas generadas provoca la producción de citocinas inflamatorias (IL-6,IL-1B,TNF- α) que propician la secreción de factores de inflamación (Descamps *et al.*, 2007). Además, se ha observado en la uremia, una acumulación de compuestos orgánicos y elementos traza como el aluminio, cobalto, hierro y el zinc, los cuales tienen implicaciones clínicas asociadas a la enfermedad cardiovascular, deficiencia inmunológica, anemia, alteración de la función renal y enfermedad ósea (Vanholder *et al.*, 2002)

En 1996 Witko-Sarsat *et al.*, investigaron el estrés oxidativo asociado a la diálisis y caracterizaron en el plasma de pacientes en diálisis productos de proteínas con oxidación avanzada (AOPPs) resultados de la oxidación de residuos de aminoácidos como la tirosina (Witko-Sarsat. *et al.*, 1996); a los AOPPs en los pacientes urémicos se les ha considerado como posibles mediadores pro-inflamatorios teniendo como célula blanco los monocitos (Witko-Sarsat *et al.*, 1998). Adicionalmente, los pacientes urémicos tienden aumentar los productos avanzados de glicosilación (AGEs). Ambos pueden reaccionar con el ADN formando enlaces covalentes y como resultado daño genómico (Sebekoba *et al.*,1999; Fragedaki *et al.*, 2005).

Una limitación de nuestro estudio es no haber medido marcadores de estrés oxidativo en la población estudiada, que deberá realizarse en un estudio posterior y ver si existe relación entre este y el daño genómico, así como su posible asociación con el daño cardiovascular en esta población.

Se deberá estudiar el daño genómico en pacientes con otra variedad de manejo dialítico, y en prediálisis, en busca de una asociación con el daño cardiovascular para buscar estrategias farmacológicas que modifiquen esta asociación.

11. CONCLUSIÓN

El tratamiento de hemodiálisis en pacientes con IRC produce daño genómico con respecto a individuos sanos en la región de Michoacán, México.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal DK. (2002) Diabetic nephropathy-prevention and treatment. *J Indian Med Assoc.* 100: 150-160.
- Amato D, Álvarez-Aguilar C, Castañeda- limones R, Rodríguez E, Ávila Díaz M, Arreola F, Gómez A, Ballesteros H, Becerril R, Paniagua R. (2005) Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int* 68 (suppl 97): S11- S17.
- Amato MJD, Paniagua SJR, Álvarez AC. Garcia PMC, Reyes MH, Viniegra VL. (2001). Prevalencia de la insuficiencia renal crónica en la población derechohabiente del instituto mexicano del seguro social en: Las múltiples facetas de la investigación de salud; proyectos estratégicos del instituto mexicano del seguro social. IMSS, México, D.F.
- American Diabetes Association. (2005) Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 28: S37-S32.
- American Diabetes Association. (2003) Diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 26: S94-S98.
- Arakaki M. (2003) Insuficiencia renal aguda. *Med Hered* 14: 36-43.
- Atsumi K, Kushida K, Yamazaki K, Shimizu S, Ohmura A, Inoue T. (1999) Risk factors for vertebral fractures in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 33: 287-293.
- Au WW, Walker DM, Ward JB, Whorton E, Legator MS, Singh V. (1991) Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutat Res.* 260: 137-144.
- Avendaño IH. (2003) Nefrología clínica. 2ª edición. Madrid España: Editorial Médica Panamericana S.A. P 105-149.
- Barale R, Chelotti L, Davini T, Andreassi MG, Ballardín M. (1998) Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: contribution of sex age and lifestyle. *Environ Mol Mutagen.* 31: 228-242.
- Bolognesi C, Perrone E, Landini E. (2002) Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis.* 17: 391-397.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP. (2001) Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of

- laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 37: 31-45.
- Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP. (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes results from the human micronucleus project. *Mutat Res.* 443: 155-166.
- Buemi M, Floccari, Costa C, Caccamo C, Belghity N, Campo S, Pernice F, Bonvissuto G, Coppolino A, Barilla M, Criseo E, Crasci L, Nostro A. (1999) Advanced renal failure associated with an increased risk for developing cancer. *Lancet* 354: 93-99
- Chobanian AV, Barkris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ. (2003) The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: The JNC 7 report *JAMA* 289: 2560-2572.
- Countryman PI, Heddle JA. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41: 321-332.
- Descamps B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux P, Zingraff J, Moynot A, Verger C, Dahmane D, Groote D, Jungers P. (1995) Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis, relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J Immunol.* 154: 882-892
- Drucker Colín R. (2005) *Fisiología médica*. México. Editorial manual moderno. p 156-178.
- Fenech M, Morley A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 148: 29-36.
- Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique and application to genotoxicity studies un human population. *Environ Health Perspectives.* (suppl.3) 101: 101-107.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. (1999) The human micronucleus project an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 428: 271-283.
- Fragedaki E, Nebel M, Schupp N, Sebekova K, Volkel W, Klassen A, Pischetsrieder M, Frischmann M, Niwa T, Vienken J, Heidland A, Stopper H. (2005) Genomic damage and circulating AGE levels in patients undergoing daily versus standard haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 20: 1936-1943.

- Guyton, A.C. Y. Hall, JE. (2001) Tratado de fisiología médica, México, D. F.: McGraw-Hill Interamericana. P 449-461.
- Herzong C, Ma J Collins A. (1998) Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med.* 339: 799-805.
- Ho LT, Sprague SM. (2002) Renal osteodystrophy in chronic renal failure. *Semin Nephrol.* 22: 448-489.
- Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernández D, Vidyasagar MS. (2001) Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res.* 491: 9-16.
- Locatelli F, Marcelli O, Comelli M. (1996) Proteinuria and blood pressure as causal components of progression to end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 11:461-647.
- Giorgio C, Meo MP, Laget M, Guiraud H, Botta A, Dumenil G. (1994) The micronucleus assay in human lymphocytes screening for interindividual variability and application to biomonitoring. *Carcinogenesis.* 15: 313-317.
- Gregor JM. (1997) Insuficiencia renal crónica. *Med. Int. Mex* 3: 2-22.
- Latarjet M, Ruiz AL. (2004) Anatomía humana, Buenos Aires, Argentina 4ª edición: Editorial medica panamericana S.A.
- Maffei F, Angelini S, Forti GC, Lodi V, Violante FS, Mattioli S. (2002) Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation influence of smoking status and other factor. *Mutagenesis.* 17:405-409.
- Migliore L, Guidotti P, Favre C, Nardi M, Sessa MR, Brunori E. (1991) Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat Res.* 263: 243-248.
- Mogensen CE, Keane WF, Bennett PH, Jerums G, Parving H-H, Passa P, Steffes MW, Striker GE, Viberti GC. (1995) Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet.* 346: 1080- 1084.
- MullerW-U, Rode A. (2002) The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15 Gy). *Mut Res.* 502: 47-51.
- Pastor S, Suárez S, Durbán R, Gómez C, Parroni T. (2000) Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res.* 462: 255-262.

- Perrone RD, Steinman TI, Beck GJ, Skibinski CI, Royal HD, Lawlor M, Hunsicker LG. (1999) Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: simultaneous comparison of ¹²⁵I-iothalamate, ¹⁶⁹Yb-DTPA, ^{99m}Tc-DTPA, and insulin in the modification of diet in renal disease study. *Am J Kidney Dis.* 16: 224-235.
- Rahman M, Smith MC. (1998) Chronic renal insufficiency: a diagnostic and therapeutic approach. *Arch Intern Med.* 158 (6): 1743- 1152.
- Ruggenti PM, Schieppati A, Remuzzi G. (2001) Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet.* 375: 1601-1608.
- Scholowwerth AC, Engelgau, MM, Hostetter, TH, Rufo KH, Chianchiano D, McClellan WM. (2006) Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan. *Prev Chronic Dis.* 32: 432- 446.
- Sebekoba K, Wagner Z, Schupp N, Boor P. (1999) Genomic damage and malignancy in end stage renal failure do advanced glycation end products contribute. *Biophys Rev Commun* 294: 544-549.
- Sistema Nacional de Salud. (2000) Estadísticas de egresos hospitalarios del Sector Público Nacional de Salud. *Salud Pública México* 44: 158-187.
- Siu WH, Mak E, Cao J, Abbott SB, Lam PK. (2004) Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ Toxicol Chem.* 23: 1317-1325.
- Stopper H, Meysen T, Bockenforde A, Bahner UMD, Heidland AMD, Vamvakas SMD. (1999) Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis.* 34: 433-437.
- Stopper H, Schupp N, Bahner U, Sebekoba K, Klassen A, Heidland A. (2004) Genomic damage in end-stage renal failure: potential involvement of advanced glycation and products and carbonyl stress. *Semin Nephrol.* Sep; 24(5): 474-8.
- Thierens H, Vral A, Van EM, Speleman F. (1995) Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease. *Int J Radiat Biol.* 67: 529-539.
- Tomanin R, Ballarin C, Nardini B, Mastrangelo G, Sarto F. (1991) Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis.* 6: 123-126.
- Vanholder R, Comelis R, Dhondt A, Lamiere N. (2002) The role of trace elements in uraemic toxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 17: (suppl 2) 2-8.

Viek A, Van Der Graaf, Spiering W, Algra A, Visseren F. (2007) Cardiovascular events and all-cause mortality by albuminuria and decreased glomerular filtration rate in patients with vascular disease. *Annu Rev Med.* 58: 123-139.

William L Henrich MD. (2001) *Diálisis* 2ª edición editorial Mc Graww-Hill interamericana. P 24-127.

Wright JT Jr, Bakris G, Greene T, Agodoa LY, Appel LJ, Charleston J. (2002) Effect of blood pressure lowering and antihypertensive drug class on progression of hypertensive kidney disease: results from the ASSK trial. *JAMA.* 288: 2421-2431.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen KT, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Deamps-lastcha B. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49: 1304-1313.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, Capeilleri BC, Nguyen AT, Dayer JM, Jungers P, Druke T, Deamps-lastcha B. (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 161: 2524- 2532.

Xue KX, Wang S, Ma GJ, Zhou P, Wu PQ, Zhang RF. (1992) Micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol and tea-drinking habits. *Int J Cancer.* 50: 702-705.

Yager JW, Sorsa M, Selvin S. (1998) Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. *IARC Sci Publ.* 89: 213-216.

www.recursos.cneci.mec.es/.../riñonpntic2.jpg

<http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/>

[www.butler.org/.../images/si55551793 ma.jpg](http://www.butler.org/.../images/si55551793_ma.jpg)

www.cancerino.es/img/riñon/gif