

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

JOSÉ MATÁIX VERDÚ

FACULTAD DE FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE GENOTOXICIDAD EN
NEONATOS MEDIANTE MÉTODOS DE
DIAGNOSTICO NO INVASIVO**

TESIS DOCTORAL

ENCARNACIÓN MARÍA ROMERO SÁNCHEZ

GRANADA 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Encarnación María Romero Sánchez
D.L.: GR 732-2013
ISBN: 978-84-9028-414-8

D^a María del Carmen Ramírez Tortosa. Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

D José Luis Quiles Morales. Catedrático de Fisiología de la Universidad de Granada.

D Sergio Granados Principal. Becario posdoctoral. Universidad de granada.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“DETERMINACIÓN DE GENOTOXICIDAD EN NEONATOS MEDIANTE MÉTODOS DE DIAGNOSTICO NO INVASIVO”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por la licenciada en Farmacia Encarnación M^a Romero Sánchez y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctora por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a diecinueve de septiembre de dos mil doce.

Dra. D^a María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. José Luis Quiles Morales

Dr. D. Sergio Granados Principal



MEMORIA QUE PRESENTA LA LDA. ENCARNACIÓN M^a ROMERO SÁNCHEZ
PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. Jose Luis Quiles Morales

Dr. D. Sergio Granados Principal

Lda. D^a. Encarnación M^a Romero Sánchez

Granada, 2012

Para los tres hombres que ocupan mi corazón:

EL amor quizá no haga girar al mundo, pero debo admitir que hace que el viaje merezca la pena. (SEAN CONNERY)

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Cuando me propuse este nuevo reto en mi vida “el doctorado”, jamás pensé que iba a estar en tan buenas manos, quiero agradecer en primer lugar la confianza puesta en mí desde el principio (sin conocerme), por parte de mis tutores; a quienes admiro y respeto no solo por su profesionalidad la cual avalan sus curriculum, sino también por su incalculable valor humano. Muy especialmente quiero además agradecer a Maica su comprensión como mujer y madre durante todo este tiempo. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio el que las horas pasadas en el mismo me hayan parecido segundos y los días de capa caída, al final acabasen con una sonrisa, a todos gracias.

No me puedo olvidar de los grandes protagonistas de este proyecto “mis neonatos”, sin los cuales este estudio no hubiese sido una realidad. Por supuesto muchísimas gracias a todos los profesionales que trabajan día a día en la unidad neonatal del hospital materno infantil Virgen de las Nieves de Granada, y muy especialmente agradecer su colaboración al jefe de la Unidad Don Jose Antonio Hurtado.

Como me recomendó Pepe he dejado para el final a mi familia. En primer lugar quiero dedicarle a mis padres un proverbio que leí hace poco, y que define una pequeña parte de lo maravillosos que son:

“La diferencia entre un soñador y un triunfador, es que el triunfador trabaja todos los días para conseguir su sueño”.

Sin duda ambos sois unos triunfadores y el mejor ejemplo a seguir en cada una de mis actuaciones cada día, a los dos os quiero, admiro y siempre estaré en deuda. A mis tres hermanos: José Francisco, Mónica e Inma y a mis cuñados Pili y Javi simplemente darles las gracias por ser además de hermanos mis mejores amigos, como me lo han demostrado en los momentos difíciles de mi vida.

Y a ti Miguel (mi marido) pedirte perdón por el tiempo robado y darte las gracias por aguantarme, por tu paciencia, por tu siempre saber estar..... ya sé que tienes el cielo ganado, pero yo también te

quiero: “Sabes, fui un estúpido cuando me casé contigo.....si querido, pero yo estaba enamorada y no lo note”. Espero seguir sin notarlo el resto de mis días.

Y por último a mis dos niños simplemente decirles que son la razón de mi existencia.

A TODOS GRACIAS

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNmt: ADN mitocondrial

ADP: Adenosín difosfato

AHA: (American Health Association) Asociación Sanitaria Americana

ARN: Ácido ribonucleico

AT: Ataxia Telangiectasia

ATP: Adenosín trifosfato

BER: Reparación de escisión de bases

C: Citosina

CAT: Catalasa

CoQ: Coenzima Q

COX: Citocromo oxidasa

Cu: Cobre

DHA: Ácido docosahexaenoico

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

EFCOSUM: (European Food Consumption Survey Method) Método de Encuesta de consumo de alimentos.

ERO: Especies reactivas del oxígeno

Fe: Hierro

G: Guanina

GGT: Gammaglutamiltranspeptidasa

GPX: Glutation peroxidasa

GSH: Glutation reducido

H de C: Hidratos de Carbono

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HDL: (High Density Lipoprotein) Lipoproteína de Alta Densidad

MBPN: Muy bajo peso al nacer.

MMPBN: Muy muy bajo peso al nacer

O₂⁻: Anión superóxido

O₂: Oxígeno

OH.: Radical hidroxilo

Pb: Pares de bases

PN: Normo peso

RMN: recién nacido macrosómico.

RN: Recién nacido

RNPR: Recién nacido prematuro

RNPT: Recién nacido posttermino

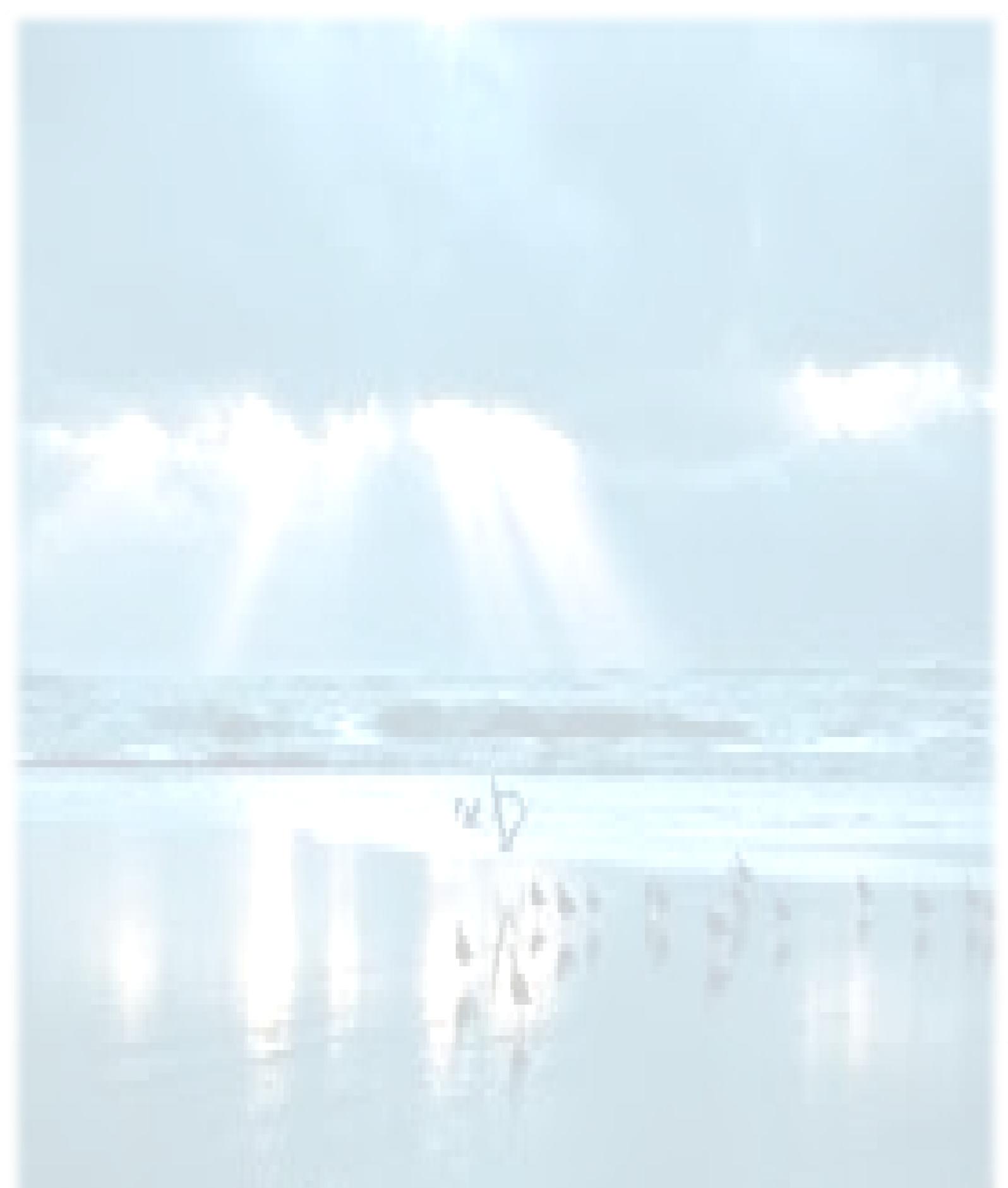
RNT: Recién nacido a término

Seg: Segundo

SOD: Superóxido dismutasa

T: Timina

WHO: (World Health Organization) Organización Mundial de la Salud.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE

<u>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO</u>	<u>25</u>
----------------------------------------------	-----------

<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>31</u>
---------------------	-----------

1. EL ADN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	33
1.1. ESTRUCTURA DEL ADN	33
1.2. FUNCIONAMIENTO DEL CÓDIGO GENÉTICO	39
1.2.1. PROCESO DE REPLICACIÓN DEL ADN	39
1.2.2. PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN DEL ADN	41
1.2.3. PROCESO DE TRADUCCIÓN DEL ADN	42
1.2.4. EL ADN, ALMACÉN DE INFORMACIÓN	43
2. MUTACIONES EN EL ADN	43
2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES	45
2.2. ETIOLOGÍA DE LAS MUTACIONES	47
2.2.1. MUTACIONES ESPONTÁNEAS	47
2.2.1.1. ERRORES EN LA REPLICACIÓN	48
2.2.1.2. DAÑOS FORTUITOS EN EL ADN	48
2.2.2. MUTAGÉNESIS INDUCIDA	50
2.3. MECANISMOS DE MUTAGÉNESIS	52

3. REPARACIÓN DEL ADN	54
3.1. SISTEMAS QUE EVITAN LOS ERRORES	56
3.2. REPARACIÓN DIRECTA DE LAS LESIONES	56
3.3. SISTEMAS DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN	57
3.4. REPARACIÓN POSTERIOR A LA REPLICACIÓN	57
4. RELACIÓN ENTRE DAÑO EN EL ADN Y ENFERMEDAD	58
4.1. MUTACIONES QUE AFECTAN A LA LÍNEA GERMINAL	63
4.2. MUTACIONES QUE AFECTAN A CÉLULAS SOMÁTICAS	66
5. RADICALES LIBRES Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	68
5.1. EL BALANCE OXIDATIVO	68
5.2. LOS RADICALES LIBRES	70
5.2.1. LA MITOCONDRIA COMO FUENTE DE ENERGÍA CELULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO	70
5.2.2. TIPOS DE RADICALES LIBRES	74
5.2.2.1. ANIÓN SUPERÓXIDO	75
5.2.2.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	75
5.2.2.3. RADICAL HIDROXILO	76
5.2.2.4. OTROS RADICALES LIBRES	77
5.3. DAÑOS CELULARES PRODUCIDOS POR LOS R. L.	78
5.3.1. EFECTOS SOBRE LOS LÍPIDOS	78
5.3.2. EFECTOS SOBRE LAS PROTEÍNAS	79
5.3.3. EFECTOS SOBRE LOS HIDRATOS DE CARBONO	79
5.3.4. EFECTOS SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO	80

5.4. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS	80
5.4.1. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	81
5.4.2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	82
5.4.2.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)	82
5.4.2.2. CATALASA (CAT)	83
5.4.2.3. GLUTATION PEROXIDASAS	83
5.4.2.4. VITAMINA E	84
5.4.2.5. COENZIMA Q	85
5.4.3. ANTIOXIDANTES EN EL ENVEJECIMIENTO Y EN PATOLOGÍAS	86
6. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON FACTORES NUTRICIONALES	88
7. MÉTODOS PARA LA VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN	95
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	99
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	101
1.1. SELECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	101
1.2. MATERIAL	102
2. MÉTODOS ANALÍTICOS	103
2.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	103
2.2. BIOQUÍMICA CLÍNICA	105
2.3. ENSAYO COMET ALCALINO (LINFOCITOS SANGRE PERIFÉRICA)	105
2.4. ENSAYO COMET ALCALINO (CÉLULAS DE LA MUCOSA BUCAL)	115
3. DISEÑO ESTADÍSTICO	121

RESULTADOS 123

1. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN SEXO	126
2. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN PESO AL NACER	127
3. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN PATOLOGÍA GESTACIONAL	129
4. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN EDAD GESTACIONAL	131
5. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN PRUEBA DE APGAR REALIZADA AL MINUTO DE NACER Y A LOS CINCO MINUTOS	133
6. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN REANIMACIÓN	135
7. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN OXIGENOTERAPIA	137
8. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN FOTOTERAPIA	139
9. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN ANTIBIOTERAPIA	141
10. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN TIPO DE NUTRICIÓN	143
11. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN TIPO DE PARTO	145

12. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN HEMATOLOGÍA REALIZADA	147
13. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN BIOQUÍMICA CLÍNICA REALIZADA	148
13.1. ÁCIDO ÚRICO	148
13.2. ALBÚMINA	149
13.3. BILIRRUBINA	151
13.4. CALCIO	155
13.5. CREATININA	156
13.6. FERRITINA	157
13.7. FOSFORO	158
13.8. GGT	159
13.9. GOT	160
13.10. GLUCEMIA	161
13.11. HIERRO	162
13.12. POTASIO163	
13.13. PROTEINA TOTAL	165
13.14. SODIO	166
13.15. UREA	167
14. ENSAYO COMET EN CÉLULAS DE LA MUCOSA ORAL Y LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	168
15. COMPARACIÓN DEL ENSAYO COMET EN DIFERENTES TRATAMIENTOS	172

15.1. OXIGENOTERAPIA	172
15.2. ANTIBIOTERAPIA	174
15.3. FOTOTERAPIA	175
16. ENSAYO COMET EN FUNCIÓN DEL TIPO DE NUTRICIÓN RECIBIDA	177
<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSINES</u>	<u>179</u>
DICUSIÓN	181
CONCLUSIONES	194
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>197</u>



JUSTIFICACIÓN Y
OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Existen multitud de patologías y situaciones adversas capaces de generar un daño irreversible en el ADN cromosómico provocando lo que se conoce como genotoxicidad (Blasiak *et al.*, 2004). Este hecho es consecuencia de una alteración en el equilibrio entre los mecanismos antioxidantes (que forman parte del sistema protector de nuestro organismo), y los mecanismos oxidantes (sistema lesivo, formado principalmente por RADICALES LIBRES).

Esta alteración en la balanza, ya sea por exceso de los mecanismos lesivos o por defecto de los mecanismos protectores, da lugar a una fragilidad aumentada del ADN y por tanto a una mayor susceptibilidad a la mutagénesis de las células.

Se ha demostrado daño en el ADN de pacientes adultos con diabetes méllitus tipo I (Migliore *et al.*, 2002), con enfermedad de Parkinson (Menéndez *et al.*, 2001), con asma o con síndrome de Down (Maluf *et al.*, 2001), entre otras alteraciones, pero existen muy pocos estudios realizados en pacientes pediátricos, entre ellos cabe destacar el estudio de determinación del daño en el ADN de niños con ataxia- telangiectasia (Moreno Galarraga L. *et al.*, 2008).

Se conocen múltiples procesos y sustancias que por su capacidad para generar radicales libres o por disminuir las sustancias antioxidantes, son capaces de generar un daño a nivel del ADN celular, es decir son genotóxicas, por ejemplo:

- Los procesos inflamatorios crónicos (Hiroshi y Kazuaki *et al.*, 2006; Forcet *et al.*, 2002).
- Las radiaciones ionizantes (Garaj-Vrhovac *et al.*, 2003).

- Algunos fármacos (Dundaroz *et al.*, 2002).
- La fototerapia en niños hiperbilirrubinemicos (Tatlí MM *et al.*, 2.008).
- La oxigenoterapia (Vento M. *et al.*, 2009)

Por otra parte, existen sustancias capaces de disminuir el daño del ADN celular, como los antioxidantes de la dieta. El déficit de estas sustancias antioxidantes en la dieta es lesivo para nuestro organismo, aumentando el número de fracturas en el ADN (Courtemanche *et al.*, 2004). Existen estudios similares en niños, donde se compara lactantes alimentados con fórmula artificial, con lactantes alimentados con lactancia materna y se ha encontrado un mayor número de roturas en el ADN en los lactantes con fórmula artificial (Dundaroz *et al.*, 2003).

El daño en el ADN se puede medir mediante distintos métodos: HPLC (Gedik *et al.*, 2002), Citometría de flujo (Wilkins *et al.*, 2002), microscopía electrónica (Yasuhara *et al.*, 2003), estudio de micronúcleos (Palyvoda *et al.*, 2003) y **electroforesis de ADN en medio alcalino.**

De estos métodos, la electroforesis en gel de células individuales, también conocida como "comet test", o "comet assay" es una técnica simple, visual y sensible para medir y analizar el daño de ADN en células (McIelvey-Martin *et al.*, 1993). El ADN sometido a electroforesis, al ser observado a microscopía da como resultado un núcleo central y una cola de fragmentos de ADN, esta morfología en forma de cometa es lo que da su nombre a la prueba.

En el trabajo de investigación que se presenta, el ensayo ó test comet, es la técnica que se utiliza para valorar y cuantificar el daño en el ADN de linfocitos de sangre periférica. Pero ante la necesidad de evitar la utilización de métodos invasivos se ha cuestionado la

utilización de células de la mucosa. ***Por todo lo descrito anteriormente, el objetivo principal de nuestro estudio es crear un modelo de ensayo comet en células de la mucosa bucal (comparado con los linfocitos de sangre periférica) para valorar y cuantificar el daño en el ADN con una mínima invasión en neonatos.***

Para ello se ha realizado el ensayo comet tanto en linfocitos de sangre periférica como en mucosa oral a 105 neonatos ingresados en la Unidad Neonatal del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL ADN, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El ADN fue identificado inicialmente en 1868 por Friedrich Miescher, en los núcleos de las células del pus y en el espermatozoides del salmón. Él llamó a la sustancia nucleína, por su localización en el núcleo, aunque no fue verdaderamente reconocida hasta 1943 gracias al experimento realizado por Oswald Avery con cepas de bacterias, donde demostró que el ácido desoxirribonucleico (ADN) era el que desempeñaba la función de transmitir la información genética.

En 1953, James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick establecieron el modelo de doble hélice y descifraron así la compleja estructura del ADN. (El artículo: *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid* fue publicado el 25 de abril de 1953 en Nature y dejaba claro el modo en que el ADN se podía "desenrollar" para que fuera posible su lectura o copia). El modelo de la doble hélice de Watson y Crick supuso un hito en la historia de la Biología.



1.1. ESTRUCTURA DEL ADN

El ADN o ácido desoxirribonucleico es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que los

genes están formados, es el "almacén de información" que cada individuo posee y que necesita para llevar a cabo todas sus funciones vitales.

La mayoría de las moléculas de las que están constituidos los seres vivos están compuestas de átomos de Carbono unidos covalentemente entre ellos y átomos de Hidrógeno, Oxígeno y Nitrógeno. Las moléculas orgánicas de tamaño pequeño como los aminoácidos, los nucleótidos y los monosacáridos sirven como las unidades monoméricas para generar las macromoléculas en este caso proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos respectivamente. Así pues un ácido nucleído está constituido por millones de nucleótidos, generando una macromolécula de carácter ácido que contiene ácido fosfórico, azúcar y bases nitrogenadas.

En las bacterias el ADN se encuentra en el citoplasma mientras que en organismos más complejos y evolucionados, tales como plantas, animales y otros organismos multicelulares, la mayoría del ADN reside en el núcleo celular, empaquetado a distintos niveles, formando los cromosomas.

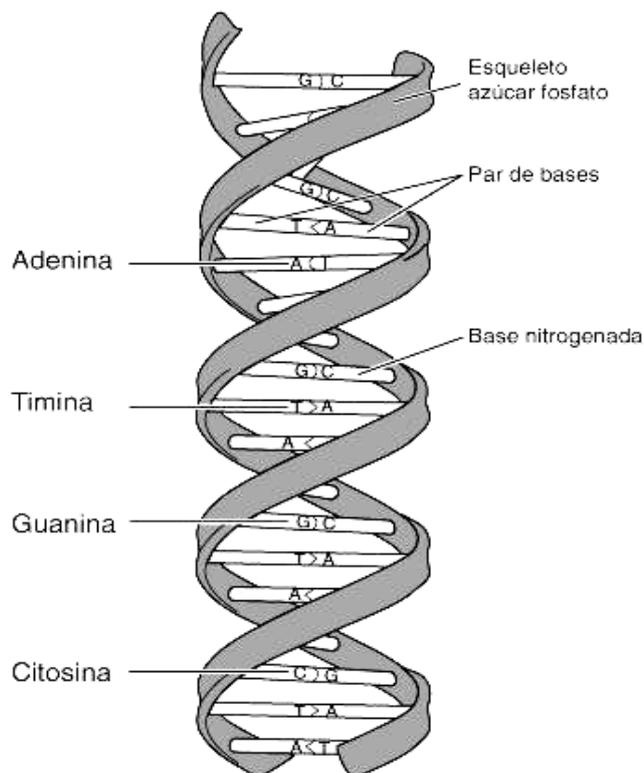
La molécula de ADN está formada por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una estructura en doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí por enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas.

Los componentes del ADN (polímero) son los nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está formado por un grupo de fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro bases: dos purínicas (o púricas) denominadas adenina (A)

y guanina (G) y dos pirimidínicas (o pirimídicas) denominadas citosina (C) y timina (T).

La estructura en doble hélice del ADN, con el apareamiento de bases limitado (Adenina con Timina y Guanina con Citosina), implica que el orden o secuencia de bases de una de las cadenas delimita automáticamente el orden de la otra, por eso se dice que las cadenas son complementarias.

Imagen 1.1: estructura básica del ADN.



Para hacer una copia nueva e idéntica de la molécula de ADN, sólo se necesita que las dos cadenas se extiendan y se separen por sus bases (que están unidas de forma débil); gracias a la presencia en la célula de más nucleótidos, se pueden

unir a cada cadena separada bases complementarias nuevas, formando dos dobles hélices. Si la secuencia de bases que existía en una cadena era AGATC, la nueva contendría la secuencia complementaria, o "imagen especular", TCTAG. (Watson, Crick, *et al.*, 1953.)

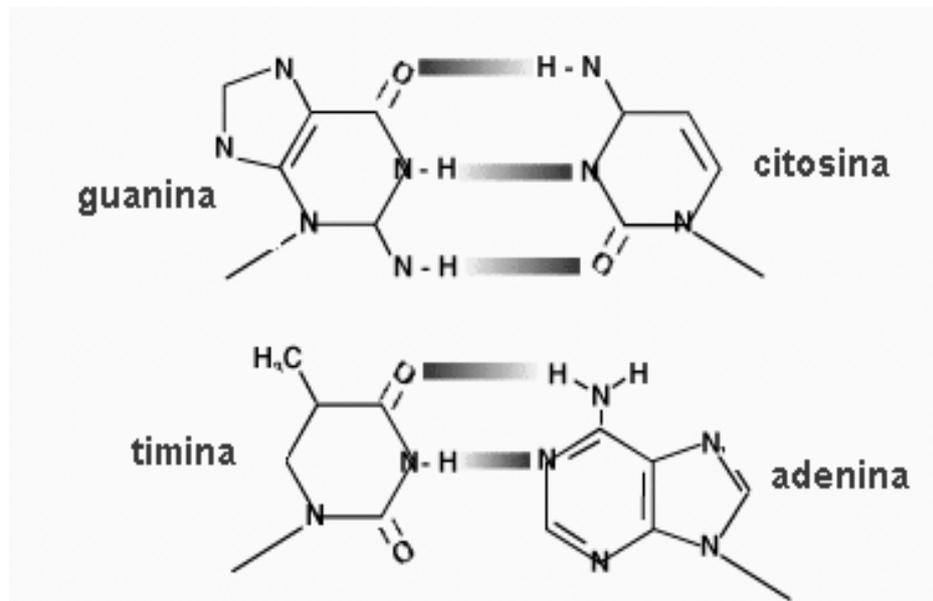
La estructura del ADN se halla muy condensada. Este empaquetamiento se basa en nucleosomas.

El ADN está enrollado alrededor de cada nucleosoma formando una estructura en forma de rosario. Entonces la estructura se repliega aún más, de manera que las cuentas se asocian en espirales regulares.

Una larga hebra de ácido nucleico está enrollada alrededor de otra hebra formando un par entrelazado. Dicha hélice mide 3,4 nm de paso de rosca y 2,37 nm de diámetro, y está formada, en cada vuelta, por 10,4 pares de nucleótidos enfrentados entre sí por sus bases nitrogenadas.

El rasgo fundamental es que cada base nitrogenada de una hebra se une de manera selectiva con la base de la otra, en el sentido de que la adenina siempre se enfrenta a la timina (lo que se denomina A-T) y la guanina siempre a la citosina (G-C). La adenina se une a la timina mediante dos puentes de hidrógeno, mientras que la guanina y la citosina lo hacen mediante tres puentes de hidrógeno; de ahí que una cadena de ADN que posea un mayor número de parejas de C-G sea más estable.

Imagen 1.2: Unión de las bases nitrogenadas en el ADN.



Fue Erwin Chargaff (1905-2002) quien en sus investigaciones describió como la cantidad de adenina es siempre la misma que la timina, e igualmente con la guanina y la citosina. La cantidad de purinas (A+G) es siempre igual a la cantidad de pirimidinas (T+C). Así una purina (adenina y guanina), de mayor tamaño, está siempre emparejada con una pirimidina (timina y citosina), más pequeña, siendo de este modo uniforme la doble hélice.

La adhesión de las dos hebras de ácido nucleico se debe a un tipo especial de unión química conocido como enlace de hidrógeno o puente de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno son uniones más débiles que los típicos enlaces químicos, tales como interacciones hidrófobas, enlaces de Van der Waals, etc. Esto significa que las dos hebras de la hélice pueden separarse con

relativa facilidad, quedando intactas facilitando así el copiado de las hebras.

Dentro de todo nuestro genoma, no todo es activo, es decir no todas las secuencias contienen información activa, sólo una pequeña fracción del total del genoma codifica proteínas.

La función del resto por ahora no está del todo definida, es conocido que algunas secuencias tienen afinidad hacia proteínas especiales que tienen la capacidad de unirse al ADN que tienen un papel importante en el control de los mecanismos de transcripción y replicación. Estas secuencias se llaman frecuentemente secuencias reguladoras.

El llamado ADN basura representa secuencias que no parecen contener genes o tener alguna función; la presencia de tanto ADN no codificante en genomas eucarióticos y las diferencias en tamaño del genoma representan un misterio que es conocido como el enigma del valor de C. Algunas secuencias de ADN juegan un papel estructural en los cromosomas: los telómeros y centrómeros contienen pocos o ningún gen codificante de proteínas, pero son importantes para estabilizar la estructura de los cromosomas.

Durante la transcripción, los intrones son copiados en el ARN junto con las secuencias codificadas, originando una molécula de ARN extra larga. En el núcleo, las secuencias que corresponden a los intrones son eliminadas del ARN por unas enzimas especiales para formar el ARNm, que se exporta al citoplasma.

Los estudios directos del ADN han demostrado también que en los organismos superiores ciertas secuencias de nucleótidos se repiten muchas veces en todo el material

genético. Algunas de estas secuencias repetidas representan copias múltiples de genes que codifican polipéptidos, o de genes que codifican ARNs especiales, casi siempre existen muchas copias de genes que producen el ARN de los ribosomas (Klug *et al.*, 2006; Hartwell *et al.*, 2006).

1.2. FUNCIONAMIENTO DEL CÓDIGO GENÉTICO

Existen tres procesos fundamentales en el ADN para conseguir la transferencia de información genética de generación en generación y hacer uso de ella. Estos procesos incluyen:

- La replicación (paso de ADN a ADN)
- La transcripción (paso de ADN a ARN)
- La traducción (paso de ADN a proteínas).

1.2.1. PROCESO DE REPLICACIÓN DEL ADN

La replicación es la capacidad que tiene el ADN de hacer copias o réplicas de su molécula. Este proceso es fundamental para la transferencia de la información a las sucesivas generaciones. (Hartwell *et al.*, 2006).

Es un proceso mediante el cual se sintetizan dos moléculas hijas de ADN de doble hélice a partir de un ADN progenitor, que actúa como molde. También se denomina duplicación del ADN. Ocurre una vez en cada generación celular durante la fase S (de síntesis) del ciclo celular. En la mayoría de las células eucariotas la replicación del ADN lleva finalmente a la mitosis, pero en las células reproductoras (espermatoцитos y oocitos primarios) lleva a la meiosis. Existen varios tipos de replicación: conservadora, semi-conservadora y dispersora.

Replicación conservadora es en la que cada una de las hebras del ADN progenitor se duplica o replica, produciendo dos moléculas de ADN hijas, una de las cuáles es la molécula de ADN progenitora intacta y la otra una molécula de ADN cuyas dos hebras son nuevas.

Replicación dispersora es en la que las cadenas de ADN progenitoras se rompen a intervalos, y las dos moléculas de ADN de doble cadena resultantes (moléculas hijas) presentan fragmentos del ADN progenitor combinados con nuevos fragmentos.

Replicación semi-conservadora es cuando el ADN de doble hélice progenitor separa sus cadenas complementarias y cada una de ellas se replica sirviendo como molde para la síntesis de una cadena nueva complementaria, obteniéndose así dos moléculas de ADN hijas de doble cadena, y cada molécula hija tiene una de las cadenas que es la del ADN progenitor y la otra nueva, que ha sido sintetizada utilizando como molde la del progenitor.

La replicación del ADN se lleva a cabo por una serie de mecanismos enzimáticos. Existen varias enzimas implicadas en el proceso de la replicación con propiedades catalíticas como son la DNA-polimerasa I, la DNA-polimerasa II y la DNA-polimerasa III. La DNA-polimerasa III es la enzima principal implicada en el proceso de replicación. La DNA-polimerasa I también participa en dicho proceso pero desempeña otra función, que es la de reparación del ADN.

1.2.2. PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN DEL ADN

La transcripción es la formación de una cadena de ARN mensajero a partir de una secuencia de ADN.

Parte del ADN se desenrolla de su empaquetamiento cromosómico, y las dos cadenas se separan en una porción de su longitud. Una de ellas actúa como plantilla sobre la que se forma el ARNm con la ayuda de la enzima denominada ARN polimerasa. El proceso es muy similar a la formación de una cadena complementaria de ADN durante la división de la doble hélice, salvo que el ARN contiene uracilo (U) en lugar de timina como una de sus cuatro bases nucleótidas, y el uracilo (similar a la timina) se une a la adenina en la formación de pares complementarios.

Por esta razón, una secuencia de adenina-guanina-adenina-timina-citosina (AGATC) en la cadena codificada de ADN, origina una secuencia de uracilo-citosina-uracilo-adenina-guanina (UAUAG) en el ARNm.

Antes de que termine la transcripción, el ARNm comienza a desprenderse del ADN. Finalmente un extremo de la molécula nueva de ARNm, que ahora es una cadena larga y delgada, se inserta en un ribosoma, al tiempo que el ribosoma se desplaza a lo largo del filamento de ARNm, su extremo se puede insertar en un segundo ribosoma, y así sucesivamente. Los ribosomas están formados por una proteína y ARN. El grupo de ribosomas unidos a un ARNm recibe el nombre de polirribosoma o polisoma. En los ribosomas se da paso al siguiente proceso la traducción del código genético.

1.2.3. PROCESO DE TRADUCCIÓN DEL ADN

Es el paso de ARN a proteínas, la lectura del código.

La lectura, tiene lugar gracias al ARN de transferencia (ARNt), que se origina sobre otro segmento del ADN. Sobre un lado de la molécula de ARNt hay un triplete de nucleótidos y al otro lado una región a la que puede unirse un aminoácido específico (con la ayuda de una enzima específica). El triplete de cada ARNt es complementario de una secuencia determinada de tres nucleótidos —el codón— en la cadena de ARNm. Debido a esta complementariedad, el triplete es capaz de "reconocer" y adherirse al codón. El triplete del ARNt recibe el nombre de anticodón. Como las moléculas de ARNt se desplazan a lo largo de la cadena de ARNm en los ribosomas, cada uno soporta un aminoácido. La secuencia de codones en el ARNm determina, por tanto, el orden en que los aminoácidos son transportados por el ARNt al ribosoma. En asociación con el ribosoma, se establecen enlaces químicos entre los aminoácidos en una cadena formando un polipéptido. La nueva cadena de polipéptidos se desprende del ribosoma y se repliega con una forma característica determinada por la secuencia de aminoácidos.

La forma de un polipéptido y sus propiedades eléctricas, que están también determinadas por la secuencia de aminoácidos, dictarán si el polipéptido permanece aislado o se une a otros polipéptidos, así como qué tipo de función química desempeñará después en el organismo. (Guyton C A, Hall J E, *et al.*, 1996).

1.2.4. EL ADN, ALMACÉN DE INFORMACIÓN

EL ADN se puede considerar como un almacén de información, que se transmite de generación en generación, conteniendo toda la información necesaria para construir y sostener el organismo en el que reside.

La estructura de un determinado ADN está definida por la secuencia de las bases nitrogenadas en la cadena de nucleótidos, residiendo precisamente en esta secuencia de bases toda la información genética que porta el ADN. La alteración en el ADN modifica la información en él guardada, dando lugar a la creación de proteínas anómalas.

Estos cambios en la información del ADN se denominan mutaciones.

2. MUTACIONES EN EL ADN

Se entiende por mutación a cualquier cambio que afecte a las secuencia de los nucleótidos en el genoma. Aunque la replicación del ADN es muy precisa, no es perfecta y se producen errores, y el ADN nuevo contiene uno o más nucleótidos cambiados. Un error de este tipo, puede tener lugar en cualquier zona del ADN. Si esto se produce en la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido particular, éste puede presentar un aminoácido cambiado en la cadena polipeptídica. Esta modificación puede alterar seriamente las propiedades de la proteína resultante.

Cualquier modificación por alteración o daño del genoma, es una mutación que puede afectar más o menos al individuo, en algunos casos, puede tratarse de un hecho irrelevante para la

vida pero que, en otros muchos, puede representar la aparición de una determinada anomalía o enfermedad más o menos grave. El ejemplo más claro de una alteración del genoma que genera una enfermedad grave es el que origina los procesos neoplásicos, al alterarse el control del crecimiento y división celular originando un proceso tumoral.

Otra mutación importante es la que afecta a aquellos genes que dan lugar a las proteínas encargadas de controlar y reparar cuando es necesario el genoma. Si se afectan las proteínas reparadoras se aumenta la susceptibilidad del individuo a padecer mutaciones en su ADN generando una seria inestabilidad genómica y múltiples patologías.

Generalmente las mutaciones son perjudiciales para el organismo que las porta, ya que una modificación aleatoria es más fácil que deteriore a que mejore la función de un sistema complejo, como el de una proteína. Por esta razón, en cualquier momento, el número de sujetos que portan un gen mutante determinado se debe a dos fuerzas opuestas: la tendencia a aumentar debido a la propagación de individuos mutantes nuevos en una población, y la tendencia a disminuir debido a que los individuos mutantes no sobreviven o se reproducen menos que sus semejantes.

La sustitución de un nucleótido por otro no es el único tipo posible de mutación. Algunas veces se puede ganar o perder por completo un nucleótido. Además, es posible que se produzcan modificaciones más obvias o graves, o que se altere la propia forma y el número de los cromosomas. Una parte del cromosoma se puede separar, invertir y después unirse de nuevo al cromosoma en el mismo lugar. A esto se le llama inversión. Si el fragmento separado se une a un cromosoma

distinto, o a un fragmento diferente del cromosoma original, el fenómeno se denomina translocación. Algunas veces se pierde un fragmento de un cromosoma que forma parte de una pareja de cromosomas homólogos, y este fragmento es adquirido por el otro. Entonces, se dice que uno presenta una deficiencia y el otro una duplicación. Por lo general los déficits son letales en la condición homocigótica, y con frecuencia las duplicaciones también lo son. Las inversiones y las traslocaciones suelen ser más viables, aunque pueden asociarse con mutaciones en los genes cerca de los puntos donde los cromosomas se han roto. Es probable que la mayoría de estos reordenamientos cromosómicos sean la consecuencia de errores en el proceso de sobrecruzamiento.

Otro tipo de mutaciones se producen cuando en la meiosis fracasa la separación de una pareja de cromosomas homólogos. Produciéndose entonces trisomías de determinados pares de cromosomas, como sucede por ejemplo en el Síndrome de Down donde existe una trisomía del cromosoma 21 (Klug *et al.*, 2006; Hartwell *et al.*, 2006).

2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES

Es difícil hacer una clasificación general de las mutaciones ya que forman un grupo muy amplio y heterogéneo. Para intentar simplificar esta clasificación dividiremos en este trabajo las mutaciones según el lugar en el que ocurran, según la cantidad de material genético afectado y según la etiología que las produzca.

Según la localización de la mutación

La mutación somática es aquella que afecta a las células somáticas del individuo, apareciendo individuos mosaico que poseen dos líneas celulares diferentes con distinto genotipo. Una vez que una célula sufre una mutación, todas las células que derivan de ella por divisiones mitóticas heredarán la mutación (herencia celular). Un individuo mosaico originado por una mutación somática posee un grupo de células con un genotipo diferente al resto, cuanto antes se haya dado la mutación en el desarrollo del individuo mayor será la proporción de células con distinto genotipo. Las mutaciones que afectan solamente a las células de la línea somática no se transmiten a la siguiente generación. Las mutaciones en la línea germinal afectan a las células productoras de gametos apareciendo gametos con mutaciones. Estas mutaciones se transmiten a la siguiente generación y tienen por tanto una mayor importancia desde el punto de vista evolutivo.

Según la cantidad de material genético afectado:

Mutación génica: mutación que afecta a un solo gen. Este tipo de mutación incluye las Sustituciones de bases: ya sea Transiciones: cambio de una purina (Pu) por otra purina, o bien cambio de una pirimidina (Pi) por otra pirimidina o Transversiones: cambio de una purina (Pu) por una pirimidina (Pi) o a la inversa. También incluye las inserciones o adiciones y las deleciones de nucleótidos, las duplicaciones (consiste en la repetición de un segmento de ADN del interior de un gen.) las inversiones (un segmento de ADN del interior de un gen se

invierte), y las transposiciones (un segmento de un gen cambia de posición).

Mutación cromosómica: mutación que afecta a un segmento cromosómico que incluye varios genes.

Mutación genómica: mutación que afecta a cromosomas completos (por exceso o por defecto) o a juegos cromosómicos completos.

Según la naturaleza de la lesión

Mutación espontánea: la que se produce de forma natural o normal en los individuos.

Mutación inducida: la que se produce como consecuencia de la exposición a agentes genotóxicos químicos o físicos.

2.2. ETIOLOGIA DE LAS MUTACIONES

La etiología de las mutaciones depende, de si son mutaciones espontáneas o mutaciones inducidas por agentes genotóxicos.

2.2.1. MUTACIONES ESPONTÁNEAS

Las principales causas de las mutaciones que se producen de forma natural o normal en las poblaciones son dos:

- Errores durante la replicación.
- Lesiones o daños fortuitos en el ADN.

2.2.1.1. ERRORES EN LA REPLICACIÓN

La tautomería: las bases nitrogenadas se encuentran habitualmente en su forma cetónica y con menos frecuencia aparecen en su forma tautomérica enólica o imino. Las formas tautoméricas o enólicas de las bases nitrogenadas muestran relaciones de apareamiento distintas. El cambio de la forma normal cetónica a la forma enólica produce transiciones.

Las mutaciones de cambio de fase o pauta de lectura: se trata de inserciones o deleciones de uno o muy pocos nucleótidos. Según un modelo propuesto por Streisinger, estas mutaciones se producen con frecuencia en regiones con secuencias repetidas, dando lugar al "apareamiento erróneo deslizado". El deslizamiento de la hélice de nueva síntesis da lugar a una adición, mientras que el deslizamiento de la hélice molde origina una deleción.

Deleciones y duplicaciones grandes: las deleciones y duplicaciones de regiones relativamente grandes también se han detectado con bastante frecuencia en regiones con secuencias repetidas. Se cree que estas mutaciones podrían producirse por un sistema semejante al propuesto por Streisinger ("Apareamiento erróneo deslizado") o bien por sobrecruzamiento desigual.

2.2.1.2. LESIONES O DAÑOS FORTUITOS EN EL ADN

Pueden darse tres tipos de daños fortuitos en el ADN:

Despurinización: rotura del enlace glucosídico entre la base nitrogenada y el azúcar al que está unida con pérdida de

una Adenina (A) o de una Guanina (G). Como consecuencia aparecen sedes Apurínicas. Existe un sistema de reparación de este tipo de lesiones en el ADN. Este tipo de lesión es la más recurrente o frecuente, se estima que se produce una pérdida de 10.000 bases cada 20 horas a una temperatura media de 37°C.

Desaminación: consiste en la pérdida de grupos amino. La Citosina (C) por desaminación se convierte en Uracilo (U) y el Uracilo empareja con Adenina (A) produciéndose transiciones: GC→AT. El Uracilo (U) no forma parte del ADN, existiendo una enzima llamada glucosidasa de uracilo encargada de detectar la presencia de U en el ADN y retirarlo. Al retirar el Uracilo (U) se produce una sede apirimidínica. La 5-Metil-Citosina (5-Me-C) por desaminación se convierte en Timina (T). La Timina (T) es una base normal en el ADN y no se retira, por tanto estos errores no se reparan. Este tipo de mutación también genera transiciones.

Daños oxidativos en el ADN: El metabolismo aeróbico produce radicales superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 e hidroxilo. Estos radicales producen daños en el ADN, y una de las principales alteraciones que originan es la transformación de la Guanina (G) en 8-oxo-7,8-dihidro-desoxiguanina que aparea con la Adenina (A). La 8-oxo-7,8-dihidro-desoxiguanina recibe el nombre abreviado de 8-oxo-G. Esta alteración del ADN produce transversiones: GC→TA. La Timidina se convierte en Glicol de timidina.

El correcto balance en el organismo entre agentes oxidantes y antioxidantes es por tanto fundamental para el daño a nivel celular. Cualquier situación que afecte a este delicado equilibrio ya sea aumentando los agentes oxidantes o bien

disminuyendo los antioxidantes generará situaciones de daño celular aumentado.

2.2.2. MUTAGÉNESIS INDUCIDA

Existen múltiples y diferentes agentes físicos y químicos que producen mutaciones en el ADN, estos agentes son también conocidos con el nombre de agentes genotóxicos. (Blasiak *et al.*, 2004). Estos agentes por su capacidad para generar radicales libres o por disminuir las sustancias antioxidantes, son capaces de generar un daño a nivel del ADN celular, por ejemplo: (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

- Los procesos inflamatorios crónicos ocasionan acumulación de radicales libres y aumentan consiguientemente el estrés celular.

- La exposición a las radiaciones ionizantes da lugar a un daño celular en los leucocitos de sangre periférica, que pone de manifiesto la fragilidad del ADN, relacionada con la carcinogénesis atribuida a los agentes ionizantes (Garaj-Vrhovac *et al.*, 2003; Dantas *et al.*, 2001). Las radiaciones ionizantes están implicadas claramente en el daño celular y se relacionan con múltiples patologías. Las radiaciones ionizantes producen los siguientes efectos a nivel celular:

- Efectos genéticos: alteraciones en los genes.
- Efectos citogenéticos: alteraciones en los cromosomas: roturas cromosómicas y translocaciones.
- Efectos fisiológicos: alteraciones en las enzimas y hormonas.

- Algunos fármacos también se relacionan con daño en el ADN (Dundaroz *et al.*, 2002). Entre estos fármacos, los antibióticos han demostrado una importante capacidad de contribuir al daño oxidativo en el ADN (Dundaroz *et al.*, 2001, Stopper *et al.*, 2001.).

- Existe también una evidencia de la relación de la dieta y la composición de nutrientes, sobre la estabilidad del ADN cromosómico (Szeto Benzoe *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2001). Muchos estudios epidemiológicos muestran los efectos preventivos de los antioxidantes en el origen y la evolución de diversas enfermedades (Moller Loft *et al.*, 2002).). El consumo de carotinoides, de té, de soja, de dietas ricas en fruta y verdura protege frente al daño oxidativo (Porrini *et al.*, 2002), lo cual se relaciona con un menor riesgo de cáncer (Astley *et al.*, 2002) y otras patologías. En pacientes diabéticos, por ejemplo, se ha demostrado que se produce una disminución en el daño oxidativo en el ADN, aportando suplementos de sustancias antioxidantes en la dieta (Sardas *et al.*, 2001)- De forma complementaria, el déficit de estas sustancias antioxidantes (déficit de fólico, Vitc, Vit_{B12}...) es lesivo para nuestro organismo, por ejemplo se ha demostrado que el déficit de folatos da lugar a mayor número de fracturas en el ADN (Courtemanche *et al.*, 2004). Estas sustancias antioxidantes actúan disminuyendo el daño oxidativo en el ADN (Moller *et al.*, 2004), pues nos protegen de los agentes oxidantes generados en nuestro propio cuerpo. (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003). La especificidad mutacional significa que muchos agentes mutágenos tienden a producir un determinado tipo de mutación, por ejemplo:

Etilmetanosulfonato (EMS): produce fundamentalmente transiciones GC→AT.

Nitrosoguanidina (NG): produce esencialmente transversiones GC→TA.

Luz ultravioleta (UV): produce transiciones y transversiones.

2.3. MECANISMOS DE MUTAGÉNESIS

Los principales mecanismos por los que se producen las mutaciones son los siguientes:

- Reemplazar una base en el ADN.
- Mutágenos que alteran las bases produciendo emparejamientos erróneos específicos.
- Agentes de tipo intercalante.
- Mutágenos que producen pérdida del emparejamiento específico.

Reemplazar una base en el ADN:

Los análogos de bases son compuestos químicos que pueden reemplazar a una base determinada. Por ejemplo, el 5-Bromouracilo es análogo de la Timina (T) y puede reemplazarla. El 5BU en su forma cetónica empareja con la Adenina (A) mientras que en su forma enólica empareja con la Guanina (G). El 5BU es más inestable y produce transiciones. La 2-Aminopurina es análogo de la Adenina (A) y puede reemplazarla. La 2AP apareja con la Timina (T) pero en su forma imíno empareja con la Citosina (C). Esta alteración produce transiciones (Hartwell *et al.*, 2006).

Mutágenos que alteran las bases produciendo emparejamientos erróneos específicos

Existen varios tipos de agentes mutagénicos que alteran las bases nitrogenadas produciendo emparejamientos erróneos:

Agentes alquilantes: como el EMS que añade radicales etilo y produce transiciones GC→AT. La NG añade radicales metilo y produce también transiciones GC→AT. Hidroxilamina (HA): produce específicamente transiciones GC→AT.

Iones bisulfito y ácido nitroso: producen desaminación. El ácido nitroso transforma la Citosina (C) en Uracilo (U), el Uracilo (U) empareja con la Adenina (A) produciendo transiciones. La desaminación de las Adenina (A) la convierte en hipoxantina (H) que empareja con la Citosina (C) produciendo transiciones.

Agentes de tipo intercalante

La Proflavina, Naranja de acridina y Compuestos ICR: son compuestos con estructuras planas que se intercalan entre las bases nitrogenadas del ADN produciendo adiciones o deleciones de un solo par de nucleótidos.

Mutágenos que producen pérdida del emparejamiento específico

Estos mutágenos dañan muchas bases nitrogenadas y producen como consecuencia un bloqueo de la replicación del ADN. La mayoría de los compuestos cancerígenos producen este tipo de alteraciones. Debido a la gran cantidad de alteraciones que producen en el ADN como primera medida se produce un bloqueo de la replicación y se ponen en marcha un sistema de emergencia denominado abreviadamente SOS para reparar los

daños y permitir que la célula se replique y pueda seguir viviendo. El sistema SOS consta de al menos tres genes denominados *recA*, *umuC* y *umuD*. Este sistema produce un relajamiento de la especificidad de apareamiento de la ADN polimerasa III de *E. coli*. Algunos ejemplos de esta situación son:

Luz ultravioleta (UV): produce dímeros de pirimidinas. Cuando hay dos pirimidinas sucesivas en la misma hélice la luz UV hace que se produzcan puente de hidrógeno entre ambas. Los más frecuentes son los dímeros de Timinas.

Aflatoxina B1: se une a la Guanina (G) modificándola de manera que la Guanina modificada se separa del azúcar al que estaba unida produciendo una sede apurínica. El sistema SOS pone habitualmente en la sede apurínica una Adenina (A) dando lugar a transversiones.

Benzopireno: es un producto resultante de los motores de combustión y es un potente carcinógeno.

3. REPARACIÓN DEL ADN

Las células disponen de diversos mecanismos que alertan sobre la aparición de distintas alteraciones que pueden afectar a su funcionalidad e integridad. Así, existen mecanismos que detectan estos daños y perturbaciones en el genoma, en el crecimiento y división celular y otros, que se encargan de reparar el "error".

Se ha estimado que en un solo día cada célula de una persona sufre, aproximadamente, 10.000 lesiones o lo que es lo mismo 1×10^{18} lesiones por día y persona. (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

Las causas de estos daños son muy variadas pero, fundamentalmente son las radiaciones, los agentes citostáticos, la exposición a agentes hidrocarbonados policíclicos aromáticos, errores en la replicación y los radicales de oxígeno, los causantes del daño en nuestro ADN.

Por tanto, deben existir mecanismos que permitan prevenir y reparar los daños que se producen en el material hereditario tanto de forma espontánea como inducida.

La propia ADN polimerasa III, encargada de la replicación del ADN, posee la subunidad ϵ que tiene una función correctora de pruebas que permite detectar cuando la ADN polimerasa ha introducido un nucleótido que no es el correcto y retirarlo. Este es un primer mecanismo que evita que se produzcan mutaciones durante la replicación.

Además de este mecanismo existen otros que previenen posibles daños y que reparan las lesiones producidas:

- Sistemas que evitan los errores antes de que ocurran.
- Reparación directa de las lesiones en el ADN. (DRD, del inglés, "direct reversion of damage" en que por la acción de las enzimas ADN alquiltransferasas se elimina la base alterada).
- Sistemas de reparación por escisión. (NER del inglés, "nucleotide excision repair", o BER del inglés, "bases excision repair").

3.1. SISTEMAS QUE EVITAN LOS ERRORES ANTES DE QUE OCURRAN

Existen múltiples enzimas y sistemas genéticos complejos encargados de esta importante función, entre las más importantes cabe destacar:

Superóxido dismutasa: este enzima convierte los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno.

Catalasa: este enzima convierte el peróxido de hidrógeno en agua.

Gen mutT: este gen codifica para un enzima que impide la incorporación de la 8-oxo-G al ADN. Este enzima hidroliza el trifosfato de la 8-oxo-G a la forma monofosfato.

3.2. REPARACIÓN DIRECTA DE LAS LESIONES EN EL ADN: DRD

DRD, del inglés, "direct reversion of damage" en que por la acción de las enzimas ADN alquiltransferasas se elimina la base alterada.

Foto reactivación: sistema de reparación directa de los daños producidos por la luz UV. La luz UV produce dímeros de pirimidinas, fundamentalmente dímeros de Timinas. El enzima Fotoliasa codificada por el gen phr reconoce en la oscuridad los dímeros de Timina y se une a ellos, y cuando se expone a la luz (mediante un fotón) deshace el dímero de Timinas.

Transferasa de grupos alquilo (metilo o etilo): elimina los grupos alquilo producidos por el EMS o por NG. El enzima

metiltransferasa transfiere el grupo metilo de la O-6-metilguanina a una cisteína (cys) de la enzima.

3.3. SISTEMAS DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN: NER

NER del inglés, "nucleotide excision repair", o BER del inglés, "bases excision repair"

Reparación de los daños de la luz UV (Endonucleasa uvrABC): La Endonucleasa uvrABC es una escilnucleasa codificada por los genes uvrA, uvrB y uvrC que corta el ADN. La Helicasa II de ADN separa las dos hélices y retira 12 nucleótidos. La ADN polimerasa I rellena el hueco producido por la Helicasa II y la Ligasa sella los extremos.

Reparación AP: reparación de las sedes apurínicas o apirimidínicas. La llevan a cabo las Endonucleasas AP de la clase I que cortan por el extremo 3' y las de la clase II que cortan por el extremo 5'. Una exonucleasa elimina una pequeña región que contiene entre 2 y 4 nucleótidos, la ADN polimerasa I rellena el hueco y la Ligasa sella los extremos.

Reparación mediante glucosidasas: estas enzimas detectan las bases dañadas y las retiran rompiendo el enlace N-glucosídico con el azúcar. Como consecuencia se origina una sede AP que se repara de la forma indicada anteriormente (reparación AP). La Glucosidasa de Uracilo elimina el Uracilo (U) del ADN. La Glucosidasa de Hipoxantina, elimina la Hipoxantina (H) del ADN. (Ibáñez Quiles S *et al.*, 2003).

3.4. REPARACIÓN POSTERIOR A LA REPLICACIÓN

Reparación de apareamientos incorrectos: la reparación de apareamientos incorrectos posterior a la replicación requiere la existencia de un sistema que sea capaz de realizar las siguientes operaciones:

- Reconocer las bases mal apareadas.
- Determinar cuál de las dos bases es la incorrecta.
- Eliminar la base incorrecta y sintetizar.

Esta reparación la realizan los productos de los genes *mutH*, *mutL*, *mutS* y *mutU*. Además, para distinguir la hélice de nueva síntesis de la hélice molde y así saber eliminar la base incorrecta, el sistema consiste utiliza el hecho de que la hélice de nueva síntesis tarda un cierto tiempo en metilarse la Adenina (A) de la secuencia GATC, mientras que la A de la secuencia GATC de la hélice molde ya está metilada. El enzima que reconoce la secuencia GATC metilando la A que contiene es la Metilasa de Adenina.

4. RELACIÓN ENTRE DAÑO EN EL ADN Y ENFERMEDAD

Existen estudios que han relacionado el daño en el ADN cromosómico con múltiples y variadas enfermedades (Aslan *et al.*, 2007; Gur *et al.*, 2006; Altindag *et al.*, 2007).

Existe una clara relación entre enfermedad y afectación del material genético y esta relación que existe es bidireccional, entendiendo por esto que hay enfermedades que ocurren por una alteración primaria en el ADN que es lo que condiciona la

enfermedad, y que hay otras enfermedades que son ellas mismas las que provocan un daño secundario en el ADN.

ENFERMEDAD <-----> DAÑO ADN

Enfermedades como por ejemplo la diabetes o el asma, producen un aumento del estrés oxidativo celular que produce a su vez un aumento del daño genético.

Existen estudios que mediante el ensayo comet demuestran este aumento del daño en el ADN en pacientes adultos con diabetes méllitus tipo I (Migliore *et al.*, 2002; Aslan *et al.*, 2007), con asma, o con síndrome de Down (Maluf *et al.*, 2001), entre otras alteraciones, pero existen muy pocos estudios realizados en pacientes pediátricos.

Es conocido también, que los procesos inflamatorios crónicos ocasionan acumulación de radicales libres y aumentan consiguientemente el estrés celular (Forcet *et al.*, 2002; Hiroshi, Kazuaki *et al.*, 2006).

Según los resultados de un estudio en pacientes pediátricos, las enfermedades agudas son las que con mayor frecuencia producen daño en el ADN celular, produciendo mayor daño que las enfermedades crónicas, y las crónicas a su vez mayor daño que el encontrado en niños sanos. (Moreno Galarraga L, *et al.*, 2007).

Recientemente se ha estudiado también el aumento del daño celular en enfermedades cardíacas, infarto, angina, y síndrome X (Gur *et al.*, 2006) y en enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide (Altindag *et al.*, 2007).

En todas estas enfermedades la enfermedad es la que aparece primero en el tiempo y al alterar la balanza del daño oxidativo, genera un daño secundario en el ADN.

Además existe un amplio grupo de enfermedades en las que una mutación inicial en el individuo, bien sea en la línea germinal o a nivel somático produce una enfermedad.

Algunos ejemplos son: la anemia falciforme, la alcaptonuria, la encefalopatía mitocondrial, la enfermedad de Fabry, el síndrome X-frágil, la Corea de Huntington y muchas más enfermedades hereditarias generadas por una mutación en el material genético que genera algún tipo de proteína anómala, que es disfuncionante y causa una enfermedad.

Es importante destacar de entre este tipo de patologías varias enfermedades genéticas humanas, que se heredan como autosómicas recesivas y cuyas mutaciones afectan específicamente a las proteínas encargadas de la reparación del ADN.

En todas ellas, evidentemente, el ADN es más susceptible a mutágenos y por tanto los pacientes tienen un llamativo aumento del daño celular y desarrollan con gran frecuencia distintos tipos de neoplasias malignas.

Son enfermedades de este tipo las siguientes: Xeroderma pigmentosum, Síndrome de Bloom, Síndrome de Cockayne, la anemia de Fanconi y Ataxia telangiectasia (AT). Es conocido que los pacientes afectados de AT presentan una sensibilidad elevada a los agentes que producen genotoxicidad y presentan un elevado índice de daño en el ADN y por tanto una mayor incidencia de procesos neoplásicos que la población general, debido a que el gen responsable de la AT, que se encuentra en el brazo largo del

cromosoma 11 en 11q22-23 (ATM), controla la producción de una enzima del tipo fosfatidilinositol- 3- cinasa involucrada en respuestas celulares y en el control de ciclo celular (Swift *et al.*, 1990). La afectación de esta proteína reguladora es lo que genera la inestabilidad cromosómica y los defectos en la reparación del ADN (Boder, Sedgwick *et al.*, 1958; Savitsky, Bar-Shira *et al.*, 1995). No sólo los pacientes afectados de AT (homocigotos del gen ATM) sino también los portadores de esta enfermedad (heterocigotos del gen ATM), presentan niveles sobreelevados de daño en el ADN cromosómico demostrado mediante estudios previos con el ensayo comet (Moreno Galarraga *et al.*, 2007).

Sin embargo existen muy pocos estudios realizados en pacientes pediátricos que demuestren la existencia de una relación entre enfermedades en la infancia y daño en el ADN (Dundaroz *et al.*, 2003, González *et al.*, 2002). Cabe destacar un estudio donde se ha detectado una clara relación, estadísticamente significativa, entre el daño en el ADN cromosómico medido mediante el comet test y el estado de salud en pacientes pediátricos. (Moreno Galarraga *et al.*, 2007).

Las mutaciones del material genético, producen alteraciones en el mensaje que trasmite el código genético y se producen por tanto proteínas alteradas.

Al afectar a las proteínas y por consiguiente a la función de estas, generan en muchas ocasiones enfermedades. Como se comentó anteriormente no todo cambio en el genoma produce enfermedades. En algunas ocasiones se producen mutaciones genéticas en regiones no codificantes careciendo entonces de significación clínica y en otras ocasiones los cambios genéticos producen alteraciones en las proteínas que no causan una

enfermedad sino una mejoría respecto a los individuos no mutados, siendo los individuos mutantes más resistentes a las condiciones medioambientales existentes. De hecho la base genética de la evolución de las especies se sustenta en mutaciones de este tipo.

Sin embargo pese a estas excepciones lo más frecuente es que un error generado al azar en el código genético de un individuo, sea el causante de una enfermedad. Son especialmente graves aquellas mutaciones que afectan a las proteínas encargadas de la reparación y control del daño celular.

La lesión de la célula ya sea por mecanismos oxidantes o por otras causas genera una alteración intrínseca en el mecanismo de regulación del crecimiento celular; las células dañadas pierden este control y proliferan de manera descontrolada generando patologías. Smith y colaboradores, por ejemplo, encuentran en su trabajo que este daño en el DNA está relacionado con un mayor riesgo de presentar cáncer (Smith *et al.*, 2003).

Según el momento en el que se produzca la mutación, aparecerá una patología u otra. Por ejemplo las mutaciones que afectan a la línea germinal o a los gametos, causan enfermedades genéticas hereditarias que afectan a la totalidad del individuo pues todas sus células derivan de una célula inicialmente afectada. Este tipo de enfermedades suelen ser producidas por mutaciones espontáneas y son hereditarias.

4.1. MUTACIONES QUE AFECTAN A LA LÍNEA GERMINAL

Estas enfermedades se pueden clasificar según el tipo de mutación que las ha generado:

- Mutaciones de cambio de sentido
- Mutaciones de cambio de fase o pauta de lectura
- Mutaciones sin sentido:

Existen muchos ejemplos de este tipo de mutaciones en la especie humana. Muchos de los errores congénitos del metabolismo se producen por mutaciones de cualquiera de los tres tipos anteriores.

Algunos ejemplos de mutaciones de cambio de sentido son: la anemia falciforme con la aparición de la hemoglobina de tipo S (HbS), o la hemoglobina de tipo C (HbC). Otros ejemplos de alteraciones de este tipo son la Alcaptonuria (acumulación de ácido homogentísico o alcapción) y la fenilcetonuria (PKU).

Delecciones entre secuencias repetidas:

En estas mutaciones se produce una pérdida de material genético que afecta a secuencias de repetición múltiple. Son ejemplos característicos de este tipo de mutación las siguientes enfermedades:

Encefalopatía mitocondrial: enfermedad genética por delección que afecta al sistema nervioso central y a los músculos. Se produce por un funcionamiento defectuoso de las fosforilación oxidativa. Este mal funcionamiento se produce

como consecuencia de una delección de 5000 pares de bases del ADN mitocondrial entre secuencias repetidas.

Enfermedad de Fabry: enfermedad genética que afecta al catabolismo de los glicoesfingolípidos, la enzima α -galactosidasa cuyo gen está en el cromosoma X es defectuosa debido a una delección entre repeticiones directas de una secuencia corta.

Expansiones de trinucleótidos:

En los genomas de las especies eucariontes existen secuencias cortas repetidas en tandem un número variable de veces, que se denominan abreviadamente VNTRs (Variable Number Tandem Repeat). Las VNTRs se pueden clasificar a su vez en Minisatélites y Microsatélites en base a la longitud de la secuencia repetida, en los Minisatélites la longitud de la secuencia que se repite es superior 10 bases, en los Microsatélites es inferior a 10. Los Microsatélites más frecuentes son dinucleótidos repetidos muchas veces, por ejemplo: TCTCTCTCTCTCTC.... También hay trinucleótidos repetidos muchas veces, por ejemplo, CGGCGGCGGCGGCGG..... En las mutaciones producidas por expansiones de trinucleótidos el número normal de repeticiones de un determinado trinucleótido en una determinada posición del genoma (locus) se altera, aumentando su número de repeticiones. Un posible mecanismo propuesto para explicar este aumento en el número de repeticiones sería el "apareamiento erróneo deslizado", sin embargo, esta hipótesis no explica incrementos demasiado grandes en el número de repeticiones. (Klug *et al.*, 2006; Hartwell *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de enfermedades

producidos por expansiones de trinucleótidos en la especie humana son las siguientes:

Síndrome X-frágil: es la causa más común de retraso mental en varones. El trinucleótido que se repite en el cromosoma X en el locus (FRM-1) es CGG. El número normal de repeticiones oscila entre 6 y 50, existe un alelo premutacional con un número de repeticiones que varía entre 50 y 200 y la enfermedad se manifiesta cuando el número de repeticiones oscila entre 100 y 1.300.

Corea de Huntington: enfermedad neurodegenerativa de la edad adulta, se suele manifestar después de la época reproductiva. Este microsatélite se localiza cerca del telómero del brazo corto del cromosoma 4, el trinucleótido repetido es CAG. El número normal de repeticiones oscila entre 11 y 34 y el número de repeticiones en los individuos enfermos varía entre 42 y 100. Se trata de una enfermedad con herencia autosómica dominante.

Distrofia miotónica: enfermedad genética que afecta al sistema nervioso central y al sistema muscular. El trinucleótido que se repite se localiza en el cromosoma 19 y es CAG, el número normal de repeticiones varía entre 5 y 35, las personas enfermas poseen entre 50 y 200 repeticiones. También tiene herencia autosómica dominante.

Atrofia muscular espino bulbar: Enfermedad degenerativa causada por repeticiones excesivas del microsatélite localizado en el cromosoma X. El trinucleótido repetido es CTG, el número normal de repeticiones oscila entre 11 y 31, mientras que las personas afectadas por esta enfermedad muestran entre 40 y 65 repeticiones.

Varias enfermedades genéticas humanas, que se heredan como autosómicas recesivas, están relacionadas con fallos en la reparación del ADN.

Estos pacientes tienen mutaciones en las proteínas encargadas del control y reparación del ciclo celular, al estar afectadas estas proteínas son más sensibles a padecer mutaciones genéticas. Existe una evidente y probada relación entre esta mayor susceptibilidad cromosómica con mutagénesis y el cáncer. (Starcervic *et al.*, 2003).

En todas ellas el ADN es más susceptible a mutágenos y por tanto los pacientes desarrollan con gran frecuencia algún tipo de cáncer. Son enfermedades de este tipo las siguientes:

- Xeroderma pimentosum
- Ataxia telangiectasia
- Síndrome de Bloom
- Síndrome de Cockayne
- Anemia de Fanconi

Estas enfermedades se caracterizan por afectar al individuo de manera sistémica y progresiva.

4.2. MUTACIONES QUE AFECTAN A CÉLULAS SOMÁTICAS

Cuando la mutación se produce en una célula de un individuo ya formado, solamente esta célula afecta y sus sucesoras se ven afectadas.

En un individuo sano se producen incontables mutaciones en células somáticas pero existe un complejo sistema interno encargado de detectar estas alteraciones corregirlas en lo

posible y si la corrección no es posible eliminar la célula afectada.

Cuando las mutaciones consiguen evitar ese mecanismo intrínseco de control aparecen las enfermedades.

El ejemplo más ilustrativo de este tipo de mutaciones son los tumores, en donde el control del crecimiento celular se ve afectado y las células crecen de manera desorganizada e incontrolada afectando al individuo afecto.

El cáncer es una "neoplasia maligna", neoplasia significa "multiplicación", que se origina a partir de una célula cualquiera de un tejido, que al haber perdido su control interno, se multiplica continuamente, invade otras células y destruye otros tejidos, generando la patología tumoral.

Las neoplasias malignas pueden suceder en diversos tipos celulares y se ordenan de acuerdo con su origen histológico. Se conocen por tanto cientos de enfermedades neoplásicas, de entre ellas cabe mencionar tres subtipos:

- *Sarcomas*.- Procedentes del tejido conectivo muscular u óseo. (Huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo).
- *Carcinomas*.- Procedentes de tejido epitelial.
- *Leucemias, linfomas y mielomas*.- procedentes de tejidos linfático y hematopoyético.

Las células neoplásicas se diferencian de las células normales por una mutación en el ADN nuclear, que altera su ritmo de mitosis y lo acelera por encima de los niveles normales, dichas células mutadas también poseen alteraciones a otros nivel como en el control del ciclo celular o en la apoptosis.

El cáncer es la segunda causa principal de muerte detrás de las enfermedades cardíacas. Sin embargo, las muertes por enfermedades cardiovasculares están disminuyendo, mientras que las muertes por cáncer están aumentando. Se estima que a lo largo del siglo XXI, el cáncer sea la primera causa de muerte en los países desarrollados.

En la actualidad la causa del cáncer es desconocida pero se conocen múltiples factores de riesgo que los precipitan. El principal factor de riesgo es la edad o el envejecimiento, ya que dos terceras partes de todos los cánceres ocurren en personas mayores de 65 años. El segundo factor de riesgo es el tabaquismo y le sigue la dieta, el ejercicio físico, la exposición solar, y otros estilos de vida poco saludables. Aunque el mecanismo de producción del cáncer subyace en los genes, sólo un pequeño porcentaje de los cánceres son secundarios a una enfermedad genética hereditaria. (Agudo, González *et al.*, 2002; Armstrong, Bofetta *et al.*, 1999).

5. RADICALES LIBRES Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

5.1. EL BALANCE OXIDATIVO

Es sabido, por estudios previos realizados, que un desbalance en el sistema oxidantes - antioxidantes de cada individuo, que genere un aumento de los agentes lesivos, agentes oxidantes, o que disminuya los agentes protectores, agentes antioxidantes, produce un daño celular a nivel del ADN.

Son múltiples y muy variados los agentes con capacidad para producir esta lesión en el ADN, denominados genotóxicos (Blasiak *et al.*, 2004).

Figura 5.1: Balanza oxidativa



Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados que les confieren gran reactividad química, esto les conducirá a interactuar rápidamente con cualquier molécula biológica con la que entren en contacto. Por su avidez para aceptar electrones de las moléculas diana, los radicales libres pueden modificar la estructura y/o la función de éstas, pudiendo actuar así sobre componentes estructurales como la membrana plasmática y sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos (Halliwell, Chirico *et al.*, 1993; Cheeseman, Slater *et al.*, 1993; Liu, cols *et al.*, 2002).

Sin embargo, en nuestro organismo existe un sistema de defensa antioxidante para evitar el daño que puede llegar a producir en él un aumento de los radicales libres. Debiendo existir un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y el de producción de radicales, que se conoce como balance

oxidativo, que al inclinarse hacia la producción de radicales da lugar a lo denominado estrés oxidativo (Halliwell *et al.*, 1992; Halliwell, Chirico *et al.*, 1993; Schon *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Sastre *et al.*, 1999; Lenaz, 1998; De la fuente *et al.*, 2002; Hiroshi y Kazuaki *et al.*, 2006).

La dieta modula el balance oxidativo. Es conocido que el tipo de ácidos grasos de la dieta determina la composición en mayor o menor grado en ácidos grasos de la membrana, o lo que es lo mismo su nivel de insaturación, y por lo tanto su distinta vulnerabilidad a la peroxidación lipídica. En función de lo argumentado, dietas con grasas menos insaturadas, no sólo pueden condicionar un estado oxidativo menor de base, sino tamponar posibles efectos de estrés oxidativo por causas diversas, al determinar una membrana menos insaturada. Por otro lado, la mayor ingesta de antioxidantes a través de la dieta disminuye el estrés oxidativo en la célula. (Quiles *et al.*, 1999; Ibáñez Quiles S *et al.*, 2003).

5.2. LOS RADICALES LIBRES

5.2.1. LA MITOCONDRIA COMO FUENTE DE ENERGÍA CELULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO

La mitocondria es un orgánulo de gran importancia que posee una gran diversidad de funciones vitales para la estabilidad e integridad celular, además de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, la mitocondria está involucrada en la termogénesis, en la generación de radicales libres, en la modulación de la homeostasis del calcio y en el proceso de muerte celular. El estudio del control del metabolismo energético mitocondrial

puede ser utilizado para la investigación de los cambios fisiológicos, patológicos y farmacológicos que sufren las mitocondrias en mamíferos. El metabolismo energético de animales de sangre caliente responde a la variable demanda de energía acoplado la tasa respiratoria con la velocidad de utilización de ATP, incrementando la termogénesis a bajas temperaturas o estimulando la síntesis global de ATP en respuesta a determinadas condiciones de estrés (Kadenbach *et al.*, 2000).

Los radicales libres se forman continuamente en el organismo bien de forma accidental, como sucede en los casos de escape de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, o en reacciones de auto oxidación. También pueden originarse de modo deliberado, como en la activación de fagocitos y en menor grado en células diferenciadas tipo fibroblastos o linfocitos. Con la excepción de algunas circunstancias poco usuales como la acción de radiaciones ionizantes, los radicales libres son producidos en la célula generalmente a través de reacciones de transferencia de electrones, mediados con o sin participación enzimática, en este último caso a través de iones metálicos de transición (Beckman, Ames *et al.*, 1998; Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

En la mitocondria, la cadena respiratoria permite gracias al transporte de electrones que provienen del catabolismo de los nutrientes, la liberación de energía que es transferida a los enlaces energéticos del ATP formados por el proceso de fosforilación oxidativa acoplada a dicha cadena. La teoría del estrés oxidativo se basa en que las especies reactivas del oxígeno (ERO) son un producto normal de la vida aeróbica y en que la acumulación del daño oxidativo debido a dichas especies

reactivas dan lugar a cambios fundamentales que afectan al envejecimiento. Como se ha mencionado ya, esta teoría fue propuesta inicialmente por Denham Harman en los años cincuenta (1956) y desde que fue enunciada se ha demostrado que el daño oxidativo tiene lugar en las células como el resultado de la reacción entre las ERO y las diversas moléculas biológicas. Los radicales libres pueden actuar tanto sobre pequeñas biomoléculas libres (vitaminas, aminoácidos, carbohidratos simples y lípidos), como sobre moléculas (proteínas, o ácidos nucleicos) y estructuras supramoleculares (membranas y lipoproteínas). (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

En general, el daño de ERO sobre las moléculas biológicas da lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo. Además, también se ha comprobado que aunque las ERO se producen por una gran variedad de rutas del metabolismo aeróbico, la principal fuente productora es la mitocondria (Van Remmen, Richardson *et al.*, 2001; Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

Existen múltiples estudios previos que defienden que el envejecimiento es causa de una degeneración en la capacidad bioenergética celular, de entre ellos cabe destacar la teoría mitocondrial del envejecimiento (Miquel *et al.*, 1980). Es sabido que la mitocondria es nuestra fuente interna de energía por lo que toda alteración en ella como ocurre en el envejecimiento, a causa de la peroxidación lipídica, genera una pérdida de la capacidad de obtención de energía y aumenta la generación de radicales libres, incrementando la oxidación de los fosfolípidos, proteínas y ADN.

Durante el envejecimiento, debido al aumento de radicales libres y de sustancias oxidantes generadas por el organismo, se

acumula progresivamente ADN dañado, no reparado. (Mataix *et al.*, 1998; Huertas *et al.*, 1999; Lenaz *et al.*, 2002).

La longevidad está afectada por múltiples genes controladores de la reparación del ADN y de la defensa antioxidante (Finkel, Holbrook *et al.*, 2000). En numerosos estudios comparativos, se ha descrito que la capacidad para reparar el ADN es proporcional a la esperanza de vida de la especie. (Martínez Velasco *et al.*, 2003)

En la edad pediátrica cada vez son más los hallazgos significativos en los que se implica al estrés oxidativo como daño en mayor o menor grado. De hecho, ya el recién nacido está expuesto a un mayor grado de estrés oxidativo, debido a su inmadurez orgánica y al cambio brusco de concentración de oxígeno, de un medio como el útero, pobre en dicho gas en comparación con el medio ambiente (Molina A *et al.*, 2002). No obstante, los neonatos a término cuentan con mecanismos de protección más adecuados frente a los efectos de los radicales oxigenados libres que los adultos o los prematuros, debido a un mayor nivel, fundamentalmente a nivel plasmático, de antioxidantes y un menor contenido en lípidos oxidables. (Wiedemann M *et al.*, 2003).

Pese a lo que cabría esperar, que es un claro aumento lineal y progresivo del daño celular conforme avanza la edad del paciente, hecho ampliamente estudiado y confirmado con las teorías del envejecimiento, en la edad pediátrica, no existe una clara progresión lineal reflejando que a mayor edad, mayor daño celular, si no que existe una edad más sensible al daño celular que es la primera infancia, tras la cual el daño se estabiliza

(hacia los 3 años) para luego ir aumentando progresivamente. (Moreno Galarraga L *et al.*, 2007).

A su vez, los recién nacidos prematuros, deben soportar un grado de estrés oxidativo mayor que los nacidos a término, y con un sistema antioxidante inmaduro aún (Buonocore G *et al.*, 2002). Esta mayor exposición del recién nacido prematuro a la acción de radicales libres derivados del oxígeno (Saugstad O D *et al.*, 2001) motiva una participación de éstos en procesos como la broncodisplasia pulmonar, la retinopatía de la prematuridad, el daño hepatocelular o la fibroplasia retrolental (Weinberger B *et al.*, 2002; Lackmann G M *et al.*, 1996).

La maduración prenatal de los sistemas antioxidantes no es simultánea en todos los órganos y sistemas, siendo más precoz en corazón, seguido pulmón y por último riñón, lo que explica la mayor vulnerabilidad de éste último al estrés oxidativo (Hayashibe H *et al.*, 1990). Lo cual unido a una mayor susceptibilidad al daño producido por radicales libres, predispone a los pacientes prematuros a una mayor incidencia de patologías.

5.2.2. TIPOS DE RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

El oxígeno es en las células de metabolismo aeróbico el principal responsable de la producción de especies oxidantes. Muchos autores utilizan el término genérico de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO).

La actividad como agente pro-oxidante de un radical libre depende de su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad (Cheeseman, Slater *et al.*, 1993).

5.2.2.1. ANIÓN SUPERÓXIDO

El anión superóxido se produce en la reducción de oxígeno por la transferencia de un electrón o por autooxidación de metales de transición (Fridovich *et al.*, 1983; Cheeseman, Slater *et al.*, 1993). El anión superóxido, a pesar de no ser particularmente dañino, es importante como fuente de peróxido de hidrógeno y como reductor de metales de transición. La principal fuente de esta especie reactiva se produce en la mitocondria de forma accidental a nivel de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico, describiéndose que de 2-5% del oxígeno se reduce incompletamente hasta éste radical. Debido a que la formación de esta especie depende del flujo de la cadena de transporte de electrones, cualquier situación que aumente el consumo de O₂, aumentará proporcionalmente la generación del anión superóxido (Lenaz *et al.*, 1998; Finkel, Holbrook *et al.*, 2000).

5.2.2.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La génesis del peróxido de hidrógeno proviene de la reducción espontánea con dos electrones del oxígeno, pudiendo ser también generado en los sistemas biológicos por la reacción de dos moléculas de anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa. (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003). El peróxido de hidrógeno no es un radical libre pero está dentro de las especies reactivas derivadas del oxígeno y envuelto en la producción de otros radicales libres. En presencia de iones metálicos produce el más reactivo y dañino radical libre, el radical hidroxilo (Cheeseman, Slater *et al.*, 1993).

5.2.2.3. RADICAL HIDROXILO

El radical hidroxilo es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula (Halliwell, Gutteridge *et al.*, 1989). No tiene gran poder de difusión y su vida media es corta, produciendo gran daño a moléculas alrededor del lugar de producción. Los mecanismos de generación de este radical son:

(a) Por la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente hierro (Fe^{2+}) (Aust *et al.*, 1985) y cobre (Cu^{2+}). En el caso del hierro se trata de la denominada reacción de Fenton.

(b) Cuando se exponen los tejidos a radiaciones, la mayor parte de la energía captada es absorbida por el agua de las células. Se produce entonces la separación de una de las uniones covalentes entre el oxígeno y el hidrógeno del agua, dejando un único electrón en el hidrógeno, formando el radical hidroxilo.

(c) En la reacción llamada de Haber-Weiss no catalizada por metales de transición o también en la denominada reacción de Fenton conducida por el O_2 , el anión superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno.

Los radicales hidroxilo son los más reactivos que se conocen en química, teniendo capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN, son por tanto agentes capaces de producir un daño en el ADN celular, son agentes genotóxicos. (Bohr, Anson *et al.*, 1999; Sastre *et al.*, 1999; Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

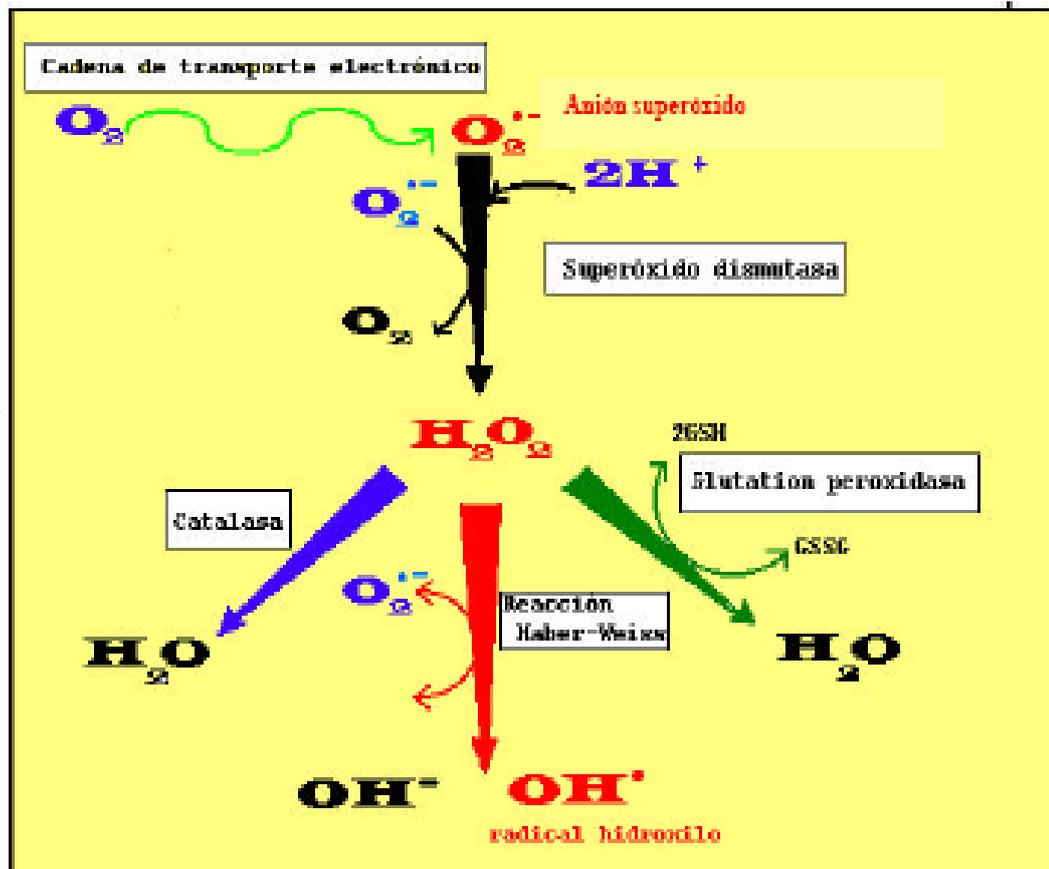


Imagen 2.3: Representación gráfica de la generación de radicales Hidroxilo.

5.2.2.4. OTROS RADICALES LIBRES

Otros radicales libres importantes son los radicales que se centran en el átomo de carbono, formados a partir del ataque sobre moléculas como los lípidos. Producen la peroxidación lipídica y atacan las cadenas de ácidos grasos, ácidos nucleicos, carbohidratos o proteínas.

Estas ERO reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar el radical peroxilo.

5.3. DAÑOS CELULARES PRODUCIDOS POR LOS RADICALES LIBRES.

5.3.1. EFECTOS SOBRE LOS LÍPIDOS. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (PL).

La peroxidación lipídica es la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados en una reacción autocatalítica e incontrolada donde se forman hidroperóxidos y productos secundarios (Sevaniam, Hochstein *et al.*, 1985; Halliwell, Chirico *et al.*, 1993). Las membranas biológicas y las lipoproteínas plasmáticas son susceptibles de peroxidación porque contienen los sustratos necesarios para ello, como el ácido linoleico, araquidónico y docosahexaenoico. (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003)

En la PL se produce la oxigenación de AG poliinsaturados (con 18 ó más átomos de carbono y con dos o más dobles enlaces conjugados en cis tanto en la forma libre como esterificada) generándose peróxidos de AG (Niki *et al.*, 1987).

La peroxidación de los ácidos grasos modifica la estructura molecular de los lípidos que los contienen y provoca un cambio conformacional que será más importante cuando los lípidos sean integrantes de membranas y sobre todo en la membrana mitocondrial ya que el mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa se asocia a destrucción de la membrana por alteraciones en la fluidez y la pérdida de AG (Lenaz *et al.*, 1998).

Existe un mecanismo reparador del daño oxidativo de los lípidos que parece estar relacionado con la fosfolipasa A2, ya que su actividad en la membrana interna mitocondrial parece incrementarse en situaciones asociadas a un aumento de la producción de ERO. Por tanto la fosfolipasa A2 parece ser una

enzima reparadora que lleva a cabo la supresión de los lípidos oxidados de membrana. Sin este mecanismo reparador, los lípidos peroxidados se acumularían y las consecuencias de esto podrían ser, entre otras, un aumento de la permeabilidad de la membrana y una pérdida del control de la respiración mitocondrial.

5.3.2. EFECTOS SOBRE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas también son objeto de daño oxidativo alterándose su funcionamiento normal y por tanto su actividad biológica (Cheeseman y Slater *et al.*, 1993; Melov *et al.*, 2002). Alteraciones como fragmentación, agregación y susceptibilidad a la degradación proteolítica. Los daños oxidativos en las proteínas originan agregación de las mismas por desnaturalización. Una proteína que ha sido objeto del daño oxidativo y está alterada ya no puede cumplir correctamente su función y se vuelve biológicamente inactiva o deficitaria (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

5.3.3. EFECTOS SOBRE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Algunos azúcares como la glucosa, y otros desoxiazúcares se autooxidan produciendo cantidades de H₂O₂ que contribuyen a los niveles intracelulares de este compuesto. (Lunec *et al.*, 1992). La autooxidación de la glucosa permite que esta pueda interactuar con otras moléculas provocando por ejemplo la glicosilación no enzimática de las proteínas (Oberley *et al.*, 1986).

5.3.4. EFECTOS SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO

Los radicales libres, bien endógenos, generados por nuestro propio organismo o bien exógenos, pueden provocar lesiones irreparables en nuestro material genético dando lugar a mutaciones celulares y a sus consecuencias.

El ADN de nuestras células también es susceptible a padecer el daño oxidativo. La acumulación de lesiones en el ADN nuclear (fragmentaciones y deleciones) producidas por los agentes endógenos, producen alteraciones somáticas que contribuyen al envejecimiento. Según la teoría de los radicales la acumulación de ERO y el daño que producen sobre el ADN puede ser la causa fundamental de los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento.

El ADN nuclear aislado de varios tejidos muestra un aumento del daño oxidativo con la edad. Se estima que el daño oxidativo sobre el ADN es de unos 10.000 residuos por célula/día.

5.4. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS RADICALES LIBRES

Los radicales libres relacionados con las enfermedades humanas derivan de cuatro fuentes:

- a) los generados en los procesos biológicos intracelulares normales pero de forma exagerada e inadecuada.
- b) los liberados por células inflamatorias.
- c) los secundarios a xenobióticos.

d) mecanismos fisiopatológicos que participan en el envejecimiento, así como con otras enfermedades relacionadas con la edad como la arterioesclerosis, cataratas, diabetes, y trastornos degenerativos del sistema nervioso como el Parkinson o el Alzheimer. (Multhaup, Rupper *et al.*, 1997).

La acumulación de proteínas dañadas oxidativamente depende del tejido, pero se ha observado que esta acumulación se incrementa con la edad (Stadman *et al.*, 1995). Esta acumulación de proteínas oxidadas está asociada, con la pérdida de la actividad de ciertas enzimas por ejemplo, la glutathion sintetasa, así como con un marcado descenso en el citosol de la actividad de la proteasa alcalina.

5.4.1. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Una sustancia se define como antioxidante cuando es capaz de disminuir o inhibir el daño oxidativo sobre una molécula. Para la desintoxicación de ERO los organismos han desarrollado numerosos tipos de sistemas defensivos de prevención, intercepción y reparación, formados por atrapadores y sustancias neutralizantes no enzimáticas, así como por sistemas enzimáticos entre los que están las superóxido dismutasas, glutathion peroxidasas y la catalasa, entre otras. También otros sistemas importantes son las reacciones de regeneración y el sistema del glutathion (Navarro *et al.*, 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, en la célula se forman continuamente radicales libres frente a los cuales se debe actuar.

Los sistemas defensivos pueden actuar capturando la mayor cantidad posible de metales como el hierro y cobre en proteínas almacenadoras o transportadoras.

Un ejemplo es la transferrina, que tiene capacidad de unirse al hierro plasmático de humanos, la ceruloplasmina y la albúmina al cobre plasmático (Halliwell *et al.*, 1988; Grootveld *et al.*, 1989).

El ácido ascórbico también es un antioxidante importante, pero sólo en ausencia de iones metálicos, ya que se ha comprobado que en pacientes con sobrecarga de hierro, en cuya sangre circulan quelatos de iones de hierro y citrato, pueden presentar lesión hepática, diabetes, artropatía y hepatoma (Cheeseman, Slater *et al.*, 1993; Viña *et al.*, 1993).

5.4.2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Hay numerosas formas de clasificar los antioxidantes y dentro de cada categoría un número bastante elevado de los mismos. (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003). Este tema ha sido con anterioridad motivo de diversas revisiones por lo que aquí nos referimos sólo a algunos de ellos.

5.4.2.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (SOD) fue descrita por McCord y Fridovich en 1968. Está presente en la mayoría de los organismos aeróbicos y contiene en su estructura metales esenciales para su función catalítica, según los cuales hay varios tipos que catalizan la misma reacción.

5.4.2.2. CATALASA (CAT)

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos que se encuentra localizada en pequeñas orgánulos llamados peroxisomas (80%) y en el citosol (20%) (Nieto *et al.*, 1993), aunque también en tejido cardíaco se halla en la mitocondria a baja concentración donde ejerce un importante papel antioxidante. La catalasa elimina el H₂O₂ rompiéndolo directamente hasta O₂.

También tiene actividad peroxidante produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el etanol, metanol, ácido fórmico y fenoles con el consumo de un mol de peróxido. La actividad predominante depende de la concentración del donador de hidrógeno y de la concentración o producción de H₂O₂ en el sistema. La catalasa tiene enorme capacidad para destruir el H₂O₂, es una de las enzimas más activas conocidas. De todas formas su afinidad por el H₂O₂ es también baja y necesita elevadas concentraciones de H₂O₂ para actuar rápidamente (Cheeseman, Slater *et al.*, 1993).

5.4.2.3. GLUTATION PEROXIDASAS

Se trata de una familia de enzimas que utilizan glutatión (GSH) como donador de hidrógeno y que pueden aceptar otros peróxidos orgánicos además del H₂O₂ como sustratos. El radical R puede ser un grupo alifático, un grupo orgánico aromático o simplemente H.

Los tejidos humanos contienen glutatión peroxidasa, como la mayor enzima eliminadora de peróxidos. La regeneración del glutatión oxidado es efectuada por la enzima glutatión.

5.4.2.4. VITAMINA E

Bajo el término de vitamina E se engloba un conjunto de 8 nutrientes solubles en grasa (Papas *et al.*, 1993). De los cuales, el tocoferol predomina en muchas especies y es el de mayor actividad biológica. Su centro activo se relaciona con el grupo 6-OH, mientras que su cola fitilo es la responsable del transporte y de la retención dentro de las membranas biológicas. La distribución de la vitamina E parece no ser homogénea, se halla asociada a las zonas más fluidas cerca de los AG poliinsaturados. Niki en 1987 sugirió que la vitamina E podía encargarse de la eliminación de radicales en zonas más externas de la membrana y el coenzima Q en la zona interior hidrofóbica.

Los tocoferoles actúan como antioxidantes biológicos (TGutteridge, Halliwell *et al.*, 1994); constituyendo gran parte de la capacidad antioxidante liposoluble del plasma humano y de los eritrocitos. En consecuencia, una de las funciones biológicas principales del tocoferol como antioxidante radica en su papel neutralizador de radicales libres.

El tocoferol rompe la reacción en cadena de la peroxidación debido a que los radicales peróxidos reaccionan con otros lípidos a una velocidad aproximada de 50 por mol por segundo, mientras que con el tocoferol reaccionan 10⁴ a 10⁵ veces más rápido. Es probable, en relación con la reversibilidad de la formación de radicales libres de tocoferol, que el dador de hidrógeno sea hidrosoluble y que el radical en cuestión se elimine de la membrana hacia el compartimento acuoso de la célula.

Aunque este radical es lo suficientemente estable como para que no continúe la cadena de eventos peroxidativos, es

retirado del ciclo y reciclado mediante la acción de dos posibles moléculas, el ácido ascórbico y el coenzima Q (Lenaz *et al.*, 1998; Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

5.4.2.5. COENZIMA Q

La ubiquinona parece estar localizada en el plano medio de la bicapa lipídica, con la cabeza polar oscilando transversalmente de un lado a otro de la membrana (Lenaz *et al.*, 1995). Este movimiento transversal de la ubiquinona es probable que este limitado a oscilaciones de su grupo polar, permitiendo las interacciones con los agentes redox solubles en agua.

El coenzima Q es el único antioxidante lipofílico biosintetizado en el organismo, el aportado exógenamente también protege a las células del estrés oxidativo por conversión en sus formas reducidas por reductasas celulares.

Últimamente se ha investigado el papel que juega el coenzima Q tanto por su acción antioxidante lipofílico como por formar parte de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y reducir los efectos del estrés oxidativo, como pretratamiento antes de cirugía cardíaca ya que podría mejorar la situación de isquemia/reperfusión generada en el miocardio en esa situación (Rosenfeldt *et al.*, 2002).

El coenzima Q10 aportado exógenamente en forma de cationes se acumula en la mitocondria previniendo la peroxidación lipídica y protegiendo frente el estrés oxidativo. Suplementaciones en la dieta con coenzima Q10 y tocoferol retrasan el decline en la función neuronal de individuos ancianos (Bondy *et al.*, 2002; Milgram *et al.*, 2002; Ibáñez Quiles S *et al.*, 2003).

5.4.3. ANTIOXIDANTES EN EL ENVEJECIMIENTO Y EN PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Todos los organismos están dotados de mecanismos de defensa antioxidante. Numerosos investigadores han descrito cambios en el sistema antioxidante enzimático durante el envejecimiento, comprobándose cambios de actividad en la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa, incrementándose en general sus actividades cuando aumentan sus sustratos en el organismo (Stadman *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 2001).

Se ha correlacionado la expectativa de vida media con la actividad SOD, y los niveles de vitamina E, urato y ceruloplasmina en múltiples especies, observando que la mayor expectativa de vida se da en aquellos que tienen mayores niveles de antioxidantes.

En relación a antioxidantes no enzimáticos, Ohkuwa y cols en 1997, encontraron que los niveles de glutatión decrecen con la edad pero que el ejercicio físico produce una mejora en la capacidad regeneradora de éste con lo que se aumenta la defensa contra el estrés oxidativo.

Otros autores asocian a la vejez una disminución en la actividad de las enzimas encargadas de catalizar las reacciones que tienden a reducir el GSSG, por ejemplo la glucosa-6-P-DH o la glutatión reductasa, más que en un aumento en la actividad de oxidación del GSH, como por ejemplo la glutatión peroxidasa o la glutatión transferasa en hígado, cerebro y riñón (Al-Turk *et al.*, 1987).

Los resultados sugirieron que la combinación de ejercicio y restricción calórica es el mecanismo más apropiado para

preservar la fluidez de la membrana y la supresión de radicales libres por los microsomas durante el envejecimiento.

En general se puede concluir que durante el envejecimiento se produce en general una modificación en la actividad de las enzimas antioxidantes dependiendo del tipo de tejido. Generalmente aumentan, lo que sugiere que las defensas antioxidantes se incrementan con la edad, pero el tanto por ciento de producción de las ERO excede e induce la capacidad antioxidante, generando una situación que favorece el estrés oxidativo y la peroxidación.

De forma reciente otro sistema antioxidante está empezando a ser considerado cada vez con más importancia sobre todo durante el envejecimiento y es el sistema de reparación del ADN sobre todo el relacionado con el ADN mitocondrial (Mandavilli *et al.*, 2002). Esto se basa en que el estrés oxidativo y el daño producido por él son el resultado de la acumulación de ADN mutado no reparado y de enzimas antioxidantes menos activas en el envejecimiento humano (Ibáñez Quiles *et al.*, 2003).

Enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento como el Alzheimer tienen también su origen en el aumento en el organismo de agentes oxidantes genotóxicos. Por ejemplo el Óxido Nítrico, los radicales oxidantes tipo superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo, productos de la respiración celular causan mutaciones en el DNA y alteran el metabolismo lipídico (disminución de la fosfolipasa A2 que convierte los fosfolípidos de membrana en acetilcolina) favoreciendo la progresión de la enfermedad de Alzheimer al contribuir a la muerte neuronal (Carney *et al.*, 1994).

6. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON FACTORES NUTRICIONALES

En los últimos años, las condiciones económicas y sociales favorables para nuestro país han conseguido aumentar notablemente la esperanza de vida, debido principalmente a una mejora de la nutrición y al control de las enfermedades infecciosas. Sin embargo parece contradictorio que una de cada 5 personas todavía muere antes de los 65 años por enfermedades potencialmente evitables, especialmente enfermedades debidas al estilo de vida (Sauer *et al.*, 2002; Urieta Guijarro *et al.*, 2004).

Mientras hace tan sólo unas décadas el hambre causaba estragos provocando enfermedades carenciales, desnutrición y muerte, es ahora la abundancia de alimentos un problema para nuestra sociedad. La prevalencia de la obesidad, está aumentando rápidamente en todos los grupos de edad en la mayoría de los países de la Unión Europea y afecta a un 10-20% de la población adulta (EURODIET, 2000). Actualmente se considera como una de las epidemias que crece más rápidamente (WHO, 1998).

La obesidad afecta prácticamente a todos los grupos de edad y socio-económicos aunque en diferentes grados (Sauer *et al.*, 2002). Datos de un estudio subvencionado por la Comisión Europea sugieren que en total, alrededor del 30% de los europeos tienen sobrepeso (IMC>25) y alrededor del 10% son obesos (IMC>30). (IEFS, 1996).

La obesidad está asociada a serias enfermedades como la diabetes tipo 2, la osteoporosis, enfermedades cardiovasculares,

ciertos tipos de cáncer y en consecuencia a una reducción de la esperanza de vida. Los factores principales en el desarrollo de obesidad y sobrepeso son la dieta y la actividad física. En nuestra sociedad actual, los niños se ven expuestos a una vida mucho más sedentaria, disminuyendo las actividades físicas deportivas y aumentando las actividades sedentarias (ordenadores, televisiones, consolas...) Además las modas y las corrientes actuales favorecen las dietas pobres en frutas y verduras y ricas en grasas, la comida rápida y los preparados precocinados. La infancia, por tanto, es un importante colectivo en especial riesgo para la obesidad. (Urieta Guijarro *et al.*, 2004).

Sin embargo estos excesos en la alimentación alternan con situaciones de deficiente nutrición persistentes todavía hoy en los países desarrollados. En España existen zonas afectadas por diversas deficiencias nutricionales que todavía suponen una causa de preocupación. Entre ellas, hay que destacar la deficiencia de hierro, prevalente en niños y mujeres en edad de procrear, la deficiencia de yodo y la deficiencia de folato (Steingrimsdóttir *et al.*, 2002).

Múltiples factores nutricionales han sido objeto de estudio, en su implicación en diversas enfermedades; uno de los más estudiados ha sido el tipo de grasa y su relación con patologías tan prevalentes como el cáncer y las enfermedades coronarias. No solo la cantidad total de grasa ingerida ha sido objeto de estudio sino el tipo de ésta.

El tipo de grasa de la dieta condiciona de manera importante numerosos parámetros bioquímicos en las membranas celulares. (Mataix *et al.*, 1998; Quiles *et al.*, 1999). La importancia del tipo de ácidos grasos de la dieta reside en el

hecho de que la membrana mitocondrial (y en general todas las membranas biológicas) es capaz de adaptar la composición de sus fosfolípidos a la grasa ingerida de forma mayoritaria y según la composición de sus membranas tiene mayor o menor sensibilidad al estrés oxidativo (Quiles *et al.*, 1999; Ochoa-Herrera *et al.*, 2001).

El estrés oxidativo está relacionado con la composición lipídica de las membranas biológicas, de modo que una fuente grasa poliinsaturada (aceite de girasol, por ejemplo) generará membranas más susceptibles al daño oxidativo que una fuente saturada (grasa animal) o monoinsaturada (aceite de oliva), lo cual ha sido ampliamente demostrado en numerosas situaciones (Quiles *et al.*, 1999; Ramírez-Tortosa *et al.*, 1999).

Por tanto, el tipo de grasa de la dieta va a condicionar la funcionalidad y la estructura de las membranas y por tanto la susceptibilidad de las mismas a ser atacadas oxidativamente, produciéndose entonces enfermedades secundarias al desbalance entre sustancias oxidantes y antioxidantes.

Actualmente existe una alta prevalencia de enfermedades no-transmisibles, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, ciertas alergias y osteoporosis, que son debidas a la interacción de varios factores genéticos, medio ambientales y del estilo de vida (incluyendo el hábito de fumar y la vida sedentaria). Numerosos estudios sugieren que la nutrición es importante en el mantenimiento de la salud y en el desarrollo de estas enfermedades (WHO *et al.*, 2003; Ferro Luzzi, James *et al.*, 1997).

La capacidad antioxidativa celular, también depende del aporte de componentes antioxidantes alimentarios. Así, se ha

demostrado en poblaciones como la mediterránea, con una ingesta de grasa marcadamente diferente en cuanto a su tipo (aunque a veces incluso superior en cantidad) a la realizada en el norte de Europa o Estados Unidos presenta menores niveles de estas patologías (Mataix *et al.*, 2001).

Se estima, que entre un 30 y un 40% de los cánceres pueden prevenirse mediante una dieta adecuada y con actividad física y peso corporal correcto. Existe un consenso internacional en considerar la elevada ingesta energética y el consumo de alcohol excesivo, como factores de riesgo de ciertos tipos de cáncer (boca, faringe, laringe, esófago e hígado) mientras que una dieta rica en verduras y frutas está asociada a un menor riesgo de cáncer de boca, faringe, esófago, estómago y pulmón.

La nutrición también es determinante en el aumento de la prevalencia de la obesidad en la comunidad europea, y ésta a su vez está unida a la aparición de diabetes méllitus en la madurez, aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, ciertos cánceres y muerte prematura por aumento del riesgo de hipertensión (Byrne *et al.*, 2001; Urieta Guijarro *et al.*, 2004).

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en Europa y suponen un 49% del total de las muertes. Se estima que más de un tercio de las muertes por enfermedades cardiovasculares en gente menor de 65 años es atribuible a la dieta (Ferro Luzzi, James *et al.*, 1997). Los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares son el consumo de grasa total, grasa saturada, colesterol y sodio junto con carencias en algunas vitaminas y minerales. Por el contrario, el consumo de cantidades suficientes de fruta y verdura, cereales sin refinar, legumbres, pescado y pollo y un consumo bajo de carne roja, embutidos, derivados

lácteos ricos en grasa y cereales refinados puede reducir el riesgo de enfermedad coronaria (Hu *et al.*, 2001).

Las orientaciones dietéticas de la AHA (American Health Association), basándose en el aumento de la evidencia de los beneficios para la prevención de ECV, recomiendan un consumo de pescado, verduras, fruta y productos lácteos bajos en grasa así como la limitación del consumo de sal y alcohol (Krauss *et al.*, 2001; Urieta Guijarro *et al.*, 2004).

Otra enfermedad relacionada con la nutrición es la osteoporosis que debido al envejecimiento de nuestra sociedad es cada vez una patología más prevalente. Entre sus factores de riesgo además de la deficiencia de estrógenos están la vida sedentaria, el hábito de fumar, un consumo elevado de cafeína y alcohol, un peso corporal bajo y una ingesta baja de calcio. Esta ingesta de calcio es primordial en la infancia y primera adolescencia donde la masa ósea está en continuo desarrollo y formación, de forma que una adecuada ingesta de calcio en los niños favorecerá una adecuada masa ósea en su edad adulta.

Existen también estudios que relacionan la nutrición con el envejecimiento. Esta relación se ha centrado básicamente en los estudios de restricción calórica, según los cuales la reducción en la ingesta energética condiciona positivamente la longevidad de una serie de especies animales. Por otro lado, también se han realizado estudios centrados en el papel antioxidante de numerosas sustancias ingeridas en la dieta, siendo más abundantes aquellos que se abordan desde el punto de vista de enfermedades que aparecen con la edad y en especial los que tratan a los antioxidantes como medida preventiva nutricional (Sharman, Bondy *et al.*, 2001).

El papel de la restricción calórica, o lo que es lo mismo, de la limitación de la ingesta de alimentos, fue descrito por primera vez en 1935 por McCay y colaboradores (McCay *et al.*, 1989). Numerosos estudios han demostrado que la restricción calórica en mamíferos es la mejor estrategia para extender la supervivencia, retardar el envejecimiento fisiológico y retrasar las enfermedades relacionadas con éste (Merry *et al.*, 2000). Aunque hay varias teorías para explicar el efecto antienviejimiento de la restricción calórica, la explicación de este hecho parece justificarse por una reducción del estrés oxidativo, con un menor metabolismo y, por tanto, una menor producción de ERO, reduciéndose así la acumulación de proteínas, lípidos y ADN dañados (Ailion *et al.*, 1999).

Además de reducir el estrés oxidativo y aumentar la expectativa de vida en animales, la restricción calórica también parece reducir la incidencia de determinados tipos de cáncer, posiblemente porque disminuye la mutagénesis (Dreosti *et al.*, 1998).

Al comprender la importancia del estrés oxidativo originado por diversos nutrientes y sus efectos negativos para nuestro organismo, surgieron múltiples intentos de mejorar la salud mediante suplementos de antioxidantes en las dietas. Muchos antioxidantes han sido probados en relación al envejecimiento, con resultados más o menos positivos.

Entre dichos antioxidantes caben destacar la vitamina E, C, el ácido fólico, el coenzima Q, extractos herbales ricos en flavonoides y polifenoles, y otros (Halliwell, Gutteridge *et al.* 1999; Huertas *et al.*, 1999; Sastre *et al.*, 1999). Si bien los resultados obtenidos con estos antioxidantes han sido exitosos en cuanto a la atenuación del estrés oxidativo mediado por la

edad o por enfermedades asociadas a la misma, han tenido poco o ningún éxito con relación al aumento de la longevidad. Tal vez para tener un mayor éxito con la terapia basada en antioxidantes se debería profundizar en el conocimiento de las propiedades farmacológicas de las sustancias empleadas, sobre todo en lo concerniente a la absorción, distribución tisular y metabolismo de las mismas.

Aunque múltiples y variados estudios ponen de manifiesto la relación entre daño en el ADN, oxidación celular y dieta, poco se ha estudiado respecto a la influencia de la alimentación en la infancia.

Existe un artículo muy interesante pero realizado únicamente en lactantes donde comparan la influencia del tipo de leche (lactancia materna vs. lactancia artificial) en el estrés oxidativo, obteniendo como resultado que aquellos lactantes alimentados a pecho tienen un menor daño a nivel cromosómico. (Dundaroz *et al.*, 2003).

Es evidente que la edad infantil es un periodo crítico en el crecimiento y en la maduración celular. Estos fenómenos se encuentran relacionados directamente con una elevada síntesis del material genético, con actividad aumentada de endonucleasas y otras enzimas que regulan estos procesos a nivel del núcleo celular.

La relación entre crecimiento, nutrición y reparación de ADN no está suficientemente aclarada en la edad infantil.

7. MÉTODOS PARA LA VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

El daño en el DNA se puede medir mediante distintos métodos: HPLC, Citometría de flujo, microscopía electrónica, estudio de micronúcleos y electroforesis de DNA en medio alcalino.

El ensayo de electroforesis en gel de células individuales (single-cell gel electrophoresis assay) o "Ensayo Comet" es un método simple, rápido y sencillo para medir daño en el ADN de células eucariotas (animales y vegetales) individuales, así como en pequeñas muestras de tejido (Duthie *et al.*, 2003).

Ha sido un método estándar para evaluar el daño a nivel de DNA en la última década, con aplicaciones en epidemiología molecular y biomonitorización humana, comprobación de genotoxicidad, ecogenotoxicología, así como en la investigación básica de daño y reparación del ADN (Collins *et al.*, 2004).

El ensayo cometa es el método de elección para medir el daño del ADN, en las células humanas, como los linfocitos obtenidos en el curso de los estudios basados en la población de la exposición ambiental y ocupacional a los diferentes agentes genotóxicos, como la radiación, productos químicos y el estrés oxidativo. Se destaca por su versatilidad y la amplitud de sus posibles aplicaciones. En términos de simplicidad, costo, una pequeña cantidad de material requerido, sensibilidad y fiabilidad, la prueba del cometa en sus diversas modificaciones tiene pocos competidores serios.

Estandarizado y validado, la prueba del cometa puede proporcionar información muy valiosa en las áreas de

identificación de peligros y evaluación de los riesgos de la exposición ambiental y ocupacional, las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (por ejemplo, diabetes y enfermedades cardiovasculares), la nutrición, el control de la eficacia del tratamiento médico y la investigación de la variación individual en la respuesta al daño del ADN que puede reflejar las influencias genéticas o ambientales. La información obtenida podría llevar a asesoramiento individual sobre los cambios de estilo de vida para promover la salud y, especialmente, sobre los riesgos relativos de exposición a la contaminación del medio ambiente genotóxico. (Dusinska M, Collins A R 2008).

El ensayo cometa no es la única manera de medir el daño oxidativo del ADN, pero es uno de los más sensible y preciso, siendo relativamente libre de artefactos. Se trata de una herramienta valiosa en la supervisión de la población, por ejemplo en la evaluación del papel del estrés oxidativo en la enfermedad humana, y en el seguimiento de los efectos de los antioxidantes dietéticos. Puede proporcionar información importante sobre las interacciones entre la variación genética y los factores ambientales en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. (Collins A R 2009).

Se trata de un método adaptado de la técnica de electroforesis en microgel de Östling y Johanson (Östling, Johanson *et al.*, 1984) quienes observaron que, el ADN de células de linfoma de ratones previamente irradiadas con radiación gamma, suspendidas en gel de agarosa en un portaobjetos, lisadas con un detergente neutro y expuesto a un campo eléctrico débil, migró más hacia el ánodo que el ADN de aquellas células no irradiadas. Propusieron que la radiación produce roturas en la cadena de ADN, permitiendo la relajación

del ADN superenrollado y dando lugar a una migración más pronunciada de éste en el gel, dando como resultado una imagen muy particular, semejante a un cometa.

Las variantes más comunes de Ensayo Comet son: comet alcalino, comet neutro, y uso de enzimas lesión-específicas. El ensayo comet alcalino es el resultado de la modificación llevada a cabo por Singh y colaboradores (Singh *et al.*, 1988), quienes optimizaron la desnaturalización alcalina del ADN y las condiciones de electroforesis, permitiendo la evaluación del daño de una de las cadenas de ADN y de los lugares sensibles a medio alcalino. Actualmente se usa el protocolo introducido por Singh pero simplificado (Duthie *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004).

Otras variantes menos comunes son: marcaje con Bromodeoxiuridina para detectar ADN replicante, detección de intermediarios en la reparación de ADN, comet FISH (*Fluoresce In Situ Hybridation*) (Collins *et al.*, 2004).

Las células más comúnmente usadas en el ensayo comet son los linfocitos, existe la necesidad de encontrar una célula humana alternativa que pueda ser recogida con una mínima invasión. Las células de la mucosa bucal son las células fácilmente accesibles para las células tipo del tejido epitelial humano y han sido usadas para la valoración citogenética de individuos expuestos a mutágenos medioambientales (Surrallés *et al.*, 1997; Karahalil *et al.*, 1999; Salama *et al.*, 1999; Lucero *et al.*, 2000). Hay estudios donde se ha realizado el ensayo de electroforesis en gel de células individuales en células de la mucosa bucal (Rojas *et al.*, 1996; Valverde *et al.*, 1997; Eren *et al.*, 2002; Dhillon *et al.*, 2004), la baja viabilidad celular, la contaminación de bacterias saprofitas y sus membranas

celulares especializadas, que hacen difícil la lisis de las células, contribuyen a hacer de las células de la mucosa bucal una célula más complicada de analizar en comparación con los leucocitos. Siguiendo el protocolo de Östling y Johanson (Östling, Johanson *et al.*, 1984) las células de la mucosa bucal mostraban un daño masivo debido al elevado pH usado, pero con un pH bajo eran extremadamente resistentes a la lisis, un paso esencial en el ensayo comet. El éxito de la lisis fue alcanzado usando una lisis mixta (Szeto Y T *et al.*, 2005). El objetivo de nuestro estudio es obtener un modelo de ensayo comet en células de la mucosa bucal de neonatos. Por lo que, se ha realizado el ensayo comet alcalino en linfocitos y en células de la mucosa bucal de neonatos para ver si este último es útil para la determinación de genotoxicidad. También hay un estudio donde se investiga si las células de la mucosa bucal están disponibles para la electroforesis en gel de células unicelulares, y los resultados indicaron que sólo unas pocas células de la muestra produjeron cometas (Pinhal *et al.*, 2006. Buccal mucosa cell...).

Recientemente otros estudios sugieren que la recogida y almacenamiento de muestras bucales, son factores críticos para la evaluación de daños en el ADN. Además, los leucocitos parecen ser una fuente más fiable de tejido humano para evaluar el daño del ADN (Muñiz J F *et al.*, 2009).



MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

1.1. SELECCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.

Para poder, mediante la teoría de la estimación inferir las características de la población desde los datos obtenidos en una muestra, es importante realizar una adecuada selección de la muestra de forma que esta sea representativa de la población estudiada. Las técnicas de muestreo engloban un conjunto de procedimientos para elegir y observar una parte de la población, la muestra a estudiar, con objeto de obtener conclusiones de la población total. Lógicamente la proyección de una información parcial para obtener la información total conlleva una pérdida de precisión.

Para seleccionar los individuos que deben formar parte de la muestra se utilizan un conjunto de técnicas conocidas como métodos de muestreo. Las técnicas de muestreo aleatorio constituyen el muestreo científico propiamente dicho y se basan en el principio de la elección al azar.

En este estudio se seleccionaron un total de 105 neonatos, atendidos en el servicio de neonatología del Hospital Materno Infantil (HMI) Universitario Virgen de las Nieves en Granada por un periodo de tiempo comprendido entre el mes de marzo de 2009 al mes de noviembre de 2010.

Las características de los recién nacidos incluidos en el estudio (N=105) quedó distribuida de forma aleatoria. De cada recién nacido se obtienen los siguientes datos: fecha de recogida de la muestra, fecha de nacimiento, fecha de ingreso, fecha de alta, sexo, patología principal, edad de la madre, número de embarazo, número de

abortos, enfermedades de la madre, patología gestacional, edad gestacional, tipo de parto, Apgar al minuto y a los 5 minutos, reanimación al nacer y tipo, peso, longitud, oxigenoterapia y tipo, displasia broncopulmonar, antibioterapia, tratamientos, nutrición inicial, fototerapia, datos al alta. Hemograma, bioquímica, gasometría, orina, coagulación y hemostasia.

El estudio fue realizado siguiendo el código ético del hospital y los principios y recomendaciones para investigación biomédica con sujetos humanos establecidos en la declaración de Helsinki (Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, Helsinki, Finlandia 1964).

Los padres o representante legal de los pacientes fueron informados previamente de las características del estudio y se les entregó una hoja informativa, explicándoles la voluntariedad del estudio, el uso confidencial de los datos y la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento. Antes de entrar a formar parte del estudio firmaron un consentimiento informado.

El trabajo de campo, se ha llevado a cabo desde mayo de 2009 hasta diciembre de 2010. El análisis y procesamiento de las muestras recogidas se ha llevado a cabo en el Instituto de Nutrición Y Tecnología de Alimentos José Mataix Verdú, Centro de Investigaciones Biomédicas, Campus de la Salud, Universidad de Granada.

1.2. MATERIAL.

- Balanza digital GRAM PRECISION (Gram Precision, SL. Barcelona, España).
- Balanza electrónica de precisión SARTORIUS BP110S (Sartorius AG, Göttingen, Alemania).
- Centrífuga refrigerada BECKMAN J2-21 (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, EEUU).

- Máquina productora de hielo SCOTSMAN AF-10 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, EEUU).
- Microcentrífuga para eppendorfs HETTICH EBA12 ZENTRIFUGEN (HettichLab GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania).
- pH-metro GLP 21, CRISON (Barcelona, España).
- Cubeta de electroforesis (Consort).
- Jarra coplin, tubos eppendorf, portaobjetos embebidos.
- Microscopio-UV Leica DMLS con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400. Microscopio ultravioleta.
- Además de los programas de ofimática habituales (Microsoft Word, Excel, Power point), se han utilizado los siguientes programas informáticos
 - Programa estadístico: *SPSS versión 15.0 para Windows.*
 - Programa del Comet: *software para imágenes Kinetic Imaging Comet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK).*

2. MÉTODOS ANALÍTICOS.

2.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de líquidos corporales se han obtenido siguiendo el método acostumbrado para cualquier análisis de laboratorio (Tietz *et al.*, 1994), usando siempre suero o plasma recién extraído.

Tanto la extracción de mucosa oral, como la extracción sanguínea se llevó a cabo en un único acto, obteniéndose con el

paciente en ayunas de mínimo 6 horas mediante punción venosa periférica, realizada por personal de enfermería especializado. Y mediante frotis con escobillón la muestra de mucosa oral, también en ayunas.

La extracción se realizó en la unidad neonatal del Hospital Materno Infantil, desde donde se repartieron las muestras a los distintos laboratorios encargados de su manejo.

Los siguientes criterios se pautaron como objetivos y reglas generales a seguir, para asegurar un adecuado almacenamiento y estabilidad de las muestras de todos los pacientes incluidos en el estudio, para garantizar así la integridad de cada muestra al llegar a su laboratorio destino.

- Los tubos de sangre se mantuvieron siempre cerrados en posición vertical con el tapón hacia arriba. El suero o el plasma se separó de las células lo más pronto posible. Se pautó un límite máximo de dos horas a partir de la obtención de las muestras.
- Los tubos de mucosa oral se mantuvieron siempre cerrados en posición vertical, con el tapón hacia arriba. Se pautó un límite máximo de dos horas a partir de la obtención de la muestra hasta su análisis.
- El suero o el plasma separado no permaneció más de 8 horas entre +15°C y +30°C. Si los ensayos no se realizaron dentro de las 8 horas, el suero o plasma se almacenó entre +2°C y +8°C. Si los ensayos no se realizaron dentro de las 48 horas, la muestra se debe congelar entre -15°C y -20°C. El ensayo comet se realizó a las muestras de mucosa después de su recogida.
- Las muestras se descongelaron solamente una vez.

- El volumen óptimo, para cada parámetro se estableció según el criterio de laboratorio específico para los volúmenes óptimos y mínimos de cada reactivo.
- Se utilizaron los criterios para manipulación y rechazo de muestras, específicos a cada laboratorio.

2.2. BIOQUÍMICA CLÍNICA.

Para la determinación del hemograma y la bioquímica básica se utilizo el material del laboratorio de urgencias del Hospital Materno Infantil de Granada.

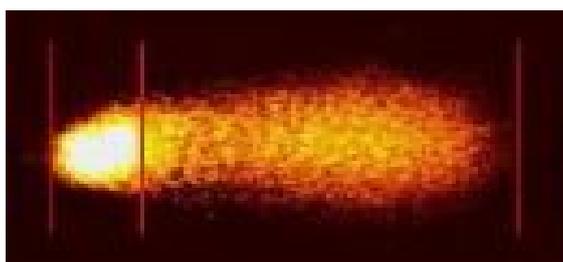
Los datos de bioquímica más específicos se realizaron con el material del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves en Granada, mediante el equipo analítico Synchron LX CIS de Beckman Coulter.

2.3. ENSAYO COMET ALCALINO (LINFOCITOS SANGRE PERIFÉRICA)

ENSAYO COMET ALCALINO.

De forma general, el ensayo comet alcalino cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación en agarosa, lisis con detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN y electroforesis, neutralización, tinción y análisis.

Imagen 1: Estructura del cometa



Cuando se deposita una célula en el gel de agarosa, se crea una cavidad. Tras la lisis, todas las proteínas se liberan y se diluyen en el gel, permaneciendo únicamente las proteínas de andamiaje nucleares o *nuclear scaffold proteins*, expandiéndose todo el ADN superenrollado o "nucleoide" por la cavidad (Östling y Johanson *et al.*, 1984). El ADN queda negativamente cargado tras el desenmarañamiento alcalino, y en la electroforesis se dirige hacia el ánodo, excepto aquellos lazos del ADN que contienen fracturas, que son liberados de la estructura superenrollada y van quedando atrapados en la estructura reticular del gel. Estos lazos quedan extendidos desde la cabeza del nucleoide formando la cola del cometa (Duthie *et al.*, 2003).

Estas estructuras se marcan posteriormente con colorantes fluorescentes que se unen al ADN para poder ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. El bromuro de etilo (BE) es probablemente el más usado, seguido del 4,6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (Collins *et al.*, 2004). También hay otros colorantes como el yoduro de propidio, naranja de acridina, Hoechst 33258 (Duthie *et al.*, 2003), SYBR Green I y YOYO-I (Hartmann *et al.*, 2003).

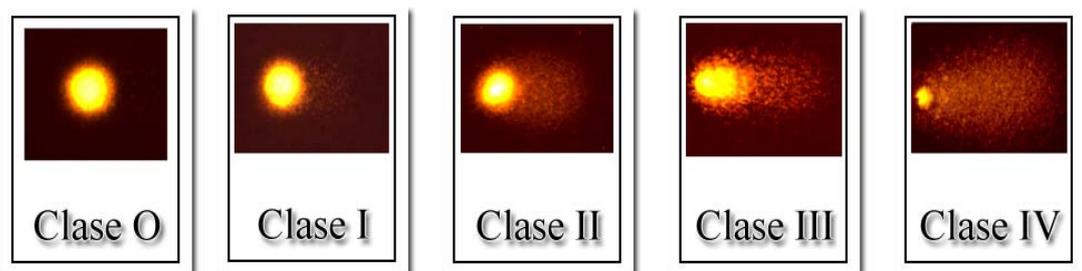
Imagen 2: Diferentes grados de daño en el ADN



Estos programas nos dan una gran variedad de parámetros relativos a los cometas. Los más usados son la longitud de la cola, intensidad relativa de fluorescencia (normalmente expresado como porcentaje de ADN en la cola), momento de la cola (producto del porcentaje del ADN en la cola y la longitud de la misma) y porcentaje de ADN en la cabeza. De ellos, el porcentaje de ADN en la cola representa el parámetro más útil, ya que guarda una relación lineal con la frecuencia de rotura, se afecta relativamente poco por los ajustes del umbral, y permite la discriminación del daño por encima del rango más amplio posible (en teoría, desde 0 a 100 % de ADN en la cola). Se recomienda contar 50 cometas por muestra (Collins *et al.*, 2004).

Por otra parte, es posible calcular el daño del ADN usando únicamente nuestros ojos. Con un entrenamiento adecuado, los órganos visuales son totalmente capaces de discriminar diferentes grados de daño en función del aspecto que presente el cometa que se encuentre en ese momento en el campo de visión. De forma general, tenemos cinco clases de cometas, numerados del 0 al 4, en función de la ausencia de cola (0) y de la forma, tamaño, e intensidad de la cabeza y cola (1 al 4), como se nos muestra en la siguiente imagen.

Imagen 4: Clasificación visual simple de los tipos de cometas en función del daño en el ADN.



El valor 0 se le da a aquellos cometas que no presentan cola alguna y tienen una alta intensidad en la cabeza, donde el daño en el ADN es prácticamente nulo; el valor 1 se le da a aquellos cometas que presentan una cola tan pequeña que se asemeja a una aureola y una alta intensidad en la cabeza, el daño sigue siendo prácticamente nulo; el valor 2 se corresponde con cometas con una cola mayor, totalmente recta, y con una intensidad en la cabeza inferior a los anteriores, hay más daño en el ADN pero sin ser excesivo; el valor 3 se asigna a aquellos cometas que tienen una cola aún mayor que los anteriores, no es recta, sino redondeada, y la cabeza es mucho más pequeña, el daño a nivel de ADN es considerable; por último, el valor 4 se da a aquellos cometas de cola extensa, muy alargada, con una cabeza pequeña, de intensidad muy baja, se considera que el daño en el ADN es máximo. En este caso, es necesario contar un número de 100 cometas por muestra (Duthie *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004).

Para la determinación del ensayo comet en linfocitos de sangre periférica y en la mucosa oral, se utilizó el laboratorio 120 del Instituto de Nutrición José Mataix Verdú situado en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada.

Con el fin de valorar y cuantificar el daño en el ADN presente en los linfocitos de sangre periférica de nuestros recién nacidos, llevamos a cabo el ensayo comet alcalino descrito por Collins (Collins *et al.*, 1996), siguiendo las recomendaciones de un grupo de expertos reunido en el 4th Internacional Assay Workshop (Ulm, Alemania, 22-25 de Julio de 2001) y recogido todo por Hartmann (Hartmann *et al.*, 2003).

REACTIVOS.

1) Tampón de Electroforesis/Tratamiento alcalino (pH≥13).

- EDTA Na₂ 1 mM (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, 99+% SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Hidróxido sódico 0.3 M (Sodium hydroxide, Sigma ultra, minimum 98%; SIGMA-ALDRICH[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

2) Tampón de Neutralización (pH 7.5).

- Ácido clorhídrico 37% (Ácido clorhídrico 37%, PA-ACS-ISO, PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España) para ajustar pH.
- Tris Base 0.4 M (SIGMA 7-9[®] SIGMA[®], BioChemika. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

3) Tampón de Lisis (pH 10).

- Cloruro sódico 2.5 M (Sodium Chloride, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- DMSO 10% (Dimethyl sulfoxide, minimum 99.5% GC, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- EDTA Na₂ 0.1 M.
- Tris Base 10 mM.
- Triton[®] X-100 1% v/v (Triton[®] X-100 Sigma Ultra. SIGMA-ALDRICH[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

4) Agarosas.

- Agarosa de bajo punto de fusión 1% (Agarosa Low melting point. Invitrogen™. Invitrogen, Ltd. Paisley, Escocia, Reino Unido).
- Agarosa de grado electroforesis 1% (Agarosa electrophoresis grade. Invitrogen™. Invitrogen, Ltd. Paisley, Escocia, Reino Unido).

5) PBS 10x (GIBCO Invitrogen; Ref: 70011-036)

TÉCNICA

1.- Aislamiento de linfocitos

Para ello se cogen 30µl de sangre y se introducen en un tubo eppendorf en el cual hay previamente 1ml de PBS 1x, se agita todo de manera suave y depositamos suavemente en el fondo de cada eppendorf de la muestra diluida 100µl de Histopaque-1077-1 (Sigma Diagnostics, INC) y llevamos a centrifugar a 200xg durante 3 minutos en frío (4°C) y oscuridad.

A continuación procedemos al lavado de las células, para ello recogemos la interfase rosácea (células blancas) y la llevamos a un tubo eppendorf con 500µl de PBS 1x, acto seguido centrifugamos a 200xg durante 3 minutos en frío (4°C) y oscuridad. Posteriormente eliminamos el PBS sobrante.

2.- Inclusión de los linfocitos en agarosa

Es en este momento cuando se ha de recoger la mayor cantidad de células que se encuentran en una de las paredes del tubo. Para ello pipeteamos 80µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% LMP (Invitrogen. Low Melting Point grade. Ultra pure) precalentada a

37°C, y la mezclamos con las células; esta mezcla se ha de depositar en una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1% (Invitrogen. Electrophoresis grade. Ultra pure) previamente dispuesta en un portaobjetos. Llevar a frío (4°C) y oscuridad durante 5 minutos.

3.- Lisis de las células

El portaobjetos que contiene nuestra muestra de linfocitos se introduce en una solución de lisis (2.5M NaCl Sigma, 100mM EDTA Na₂ Sigma, 10mM Tris base Sigma 7-9, Triton X-100 1% v/v Sigma-Ultra, DMSO 10% Sigma; ajustado a pH 10) durante 1 hora y a una temperatura de 4°C y oscuridad, para eliminar las proteínas celulares. Transcurrido ese tiempo se procede al lavado de los portas.

4.- Tratamiento alcalino

Posteriormente se colocan los portas cargados con la muestra de forma ordenada en una cubeta de electroforesis (Consort) que contiene tampón alcalino (0.3M NaOH Sigma, 1mM EDTA Na₂ Sigma; pH 13) durante 40 minutos a 4°C y oscuridad, con el fin de que se produzca el desmarañamiento o separación de las cadenas de ADN.

5.- Electroforesis

Transcurridos los 40 minutos de tratamiento alcalino, se inició el proceso electroforético con un voltaje de entre 0.7 y 1.0 V/cm, con un amperaje no superior al de 300mA. El tiempo de electroforesis no supera los 30 minutos y se mantienen los 4°C y oscuridad.

6.- Neutralización

Una vez terminada la electroforesis, se necesita neutralizar el álcali de los geles lavando los portaobjetos con un tampón adecuado (0.4M Tris base a pH 7.5). Se someten a tres lavados consecutivos de 5 minutos cada uno y manteniendo la temperatura de 4°C y la oscuridad.

7.- Tinción del ADN y visualización de los cometas

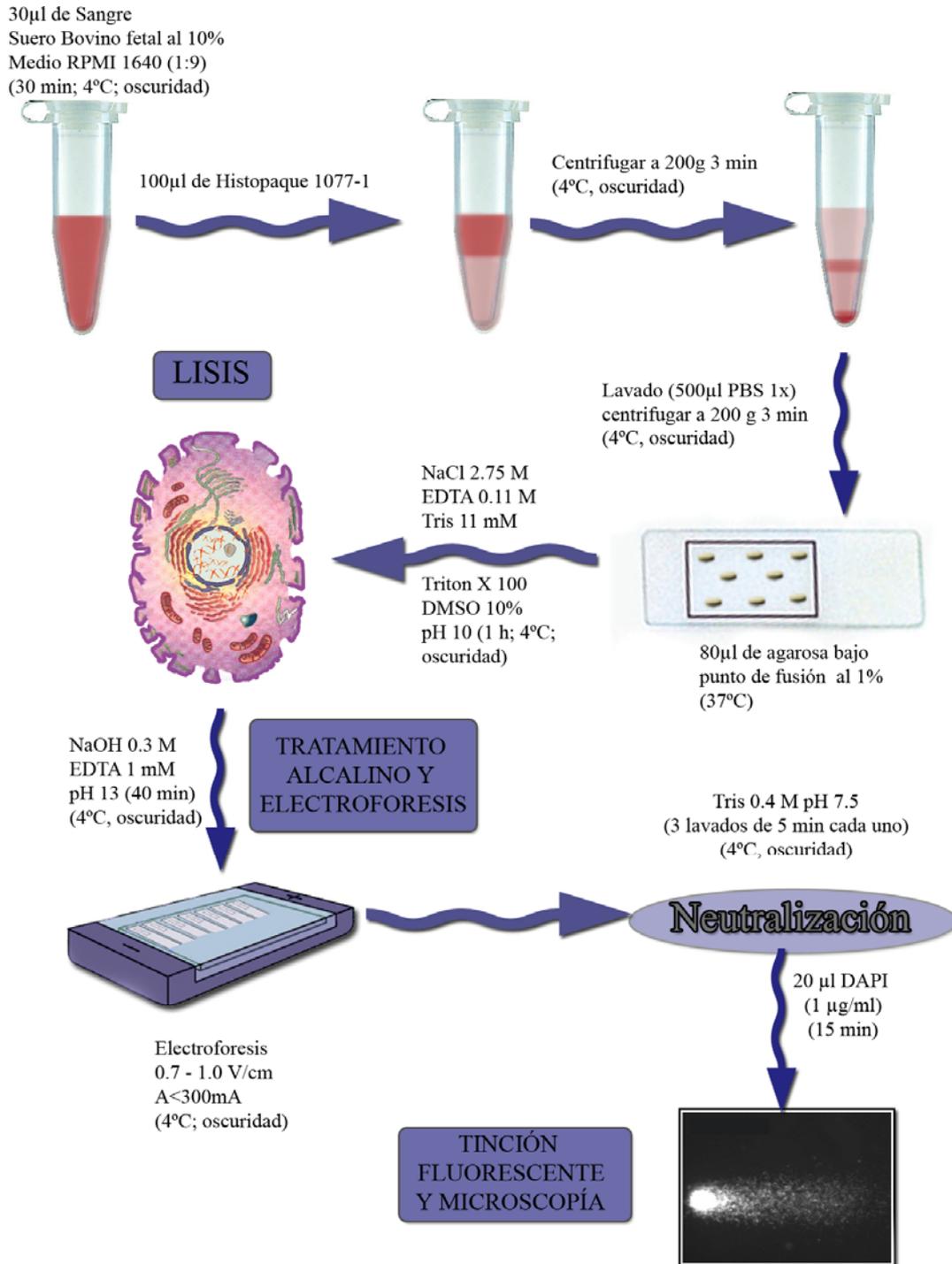
Finalizado el proceso de neutralización, se realiza la tinción de las muestras usando 20 µl de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) de 1µg/ml durante quince minutos (mínimo) en oscuridad. Tras la tinción con el colorante fluorescente, se puede comenzar con el recuento de los cometas en el microscopio de fluorescencia.

8.- Lectura y expresión de los resultados

Finalmente la valoración del daño en el ADN cromosómico se puede realizar de diversas maneras como se explica previamente.

La lectura de los cometas se realiza usando el software kinetic Imaging komet 5.5. Contamos únicamente 50 cometas. Los resultados serán %DNA cabeza, %DNA cola y OTM (Olive Tail Moment).

Esquema simplificado de las diferentes fases de las que consta el *Ensayo Comet Alcalino*:



2.4. ENSAYO COMET ALCALINO (CÉLULAS DE LA MUCOSA BUCAL).

Existen muy pocos estudios de determinación de genotoxicidad en recién nacidos mediante el ensayo comet. Las células tipo para este ensayo son los linfocitos; por lo que trataremos de estandarizar esta técnica para otro tipo de célula (mucosa bucal) con el fin de poder valorar y cuantificar daño genético en nuestros recién nacidos con una mínima invasión.

REACTIVOS.

1) Tampón de Electroforesis/Tratamiento alcalino (pH=12,5).

- EDTA Na₂ 1 mM (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, 99+% SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Hidróxido sódico 0.3 M (Sodium hydroxide, Sigma ultra, minimum 98%; SIGMA-ALDRICH[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

2) Tampón de Neutralización (pH 7.5).

- Ácido clorhídrico 37% (Ácido clorhídrico 37%, PA-ACS-ISO, PANREAC. Panreac Química SA, Barcelona, España) para ajustar pH.
- Tris Base 0.4 M (SIGMA 7-9[®] SIGMA[®], BioChemika. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).

3) Lisis mixta: Tampón de Lisis (pH 10) más proteinasa K (pH7, 4-8)

- Cloruro sódico 2.5 M (Sodium Chloride, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- DMSO 10% (Dimethyl sulfoxide, minimum 99.5% GC, SIGMA[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- EDTA Na₂ 0.1 M.
- Tris Base 10 mM.

- Triton[®] X-100 1% v/v (Triton[®] X-100 Sigma Ultra. SIGMA-ALDRICH[®]. Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, EEUU).
- Proteínasa K 2mg/ml (proteínasa K, from Tritirachium álbium; 10mg; Ref.P2308).
- PBS 10X (GIBCO Invitrogen; Ref: 70011-036).

4) Agarosas.

- Agarosa de bajo punto de fusión 1% (Agarosa Low melting point. Invitrogen[™]. Invitrogen, Ltd. Paisley, Escocia, Reino Unido).
- Agarosa de grado electroforesis 1% (Agarosa electrophoresis grade. Invitrogen[™]. Invitrogen, Ltd. Paisley, Escocia, Reino Unido).

5) PBS 10x (GIBCO Invitrogen; Ref: 70011-036)

TÉCNICA

1.- Toma de la muestra

Para recoger las células de la mucosa bucal se usa un escobillón (Cytobrush[®] Plus Medscand). Primero se raspa un lado de la cara interna de la mejilla realizando movimientos rotacionales con el escobillón hacia arriba y hacia abajo, desde el interior hasta el exterior de la misma durante aproximadamente 30 segundos, y con máximo cuidado para no producir daño mecánico. Posteriormente con otro escobillón se hace exactamente igual en la otra cara interna de la mejilla abarcando el máximo de superficie.

Acto seguido se procede al lavado de ambos escobillones continentales de la muestra en 30 ml de PBS 1x a 4°C. Es importante que toda la masa celular se separe de la escobilla, para perder el menor número de células posible.

NOTA: La toma de muestra se recomienda por la mañana, mejor en ayunas o bien dos horas después de la toma de alimento.

2.- Lavado de las células

Para el lavado de las células, centrifugamos a 2500rpm durante 10 minutos en frío (4°C). Posteriormente eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet obtenido en 30µl de PBS 1x. Es muy importante la disgregación de las células, con lo que hay que pipetear reiteradamente, pero con suavidad.

3.- Inclusión de las células en agarosa

Para ello transferimos 10µl de la suspensión de células a un tubo eppendorf, añadimos 80µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% LMP (Invitrogen. Low Melting Point grade. Ultra pure) precalentada a 37°C, y la mezclamos con las células; esta mezcla se ha de depositar en una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1% (Invitrogen. Electrophoresis grade. Ultra pure) previamente dispuesta en un portaobjetos. Llevar a frío (4°C) y oscuridad durante 5 minutos.

4.- Lisis de las células

El portaobjetos que contiene nuestra muestra se introduce en una solución de lisis (2.5M NaCl Sigma, 100mM EDTA Na₂ Sigma, 10mM Tris base Sigma 7-9, Triton X-100 1% v/v Sigma-Ultra, DMSO 10% Sigma; ajustado a pH 10) durante 1hora y a una temperatura de 4°C y oscuridad, para eliminar las proteínas celulares.

Una vez pasado ese tiempo, se ha de eliminar el triton X para que no nos inactive en parte la proteinasa k (Pinhal *et al.*, 2006). Para ello colocamos los portas en una jarra coplin y lavamos 10 veces con agua destilada.

Tras los lavados, para asegurarnos que eliminamos del triton X, hacemos un lavado de 5 minutos con tampón de neutralización en oscuridad.

Para realizar la lisis con la proteinasa K secamos los geles con mucha delicadeza, asegurándonos de que el resto del portaobjetos está también seco. Añadimos 100µl de proteinasa K 2mg/ml, (previamente atemperada a 37°C) y se coloca un cubre de 22x22 para que la solución quede homogénea. Se llevan los portaobjetos a la estufa durante una hora a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, retiramos los cubreobjetos y lavamos 3 veces con agua destilada para eliminar el exceso de proteinasa K.

4.- Tratamiento alcalino

Posteriormente se colocan los portas cargados con la muestra de forma ordenada en una cubeta de electroforesis (Consort) que contiene tampón alcalino (0.3M NaOH Sigma, 1mM EDTA Na₂ Sigma; pH 12,50) durante 20 minutos a 4°C y oscuridad, con el fin de que se produzca el desenmarañamiento o separación de las cadenas de ADN.

5.- Electroforesis

Transcurridos los 20 minutos de tratamiento alcalino, se inició el proceso electroforético con un voltaje de entre 0.7 y 1.0 V/cm, con un amperaje no superior al de 300mA. El tiempo de electroforesis no supera los 18 minutos y se mantienen los 4°C y oscuridad.

6.- Neutralización

Una vez terminada la electroforesis, se necesita neutralizar el álcali de los geles lavando los portaobjetos con un tampón adecuado (0.4M Tris base a pH 7.5). Se someten a tres lavados consecutivos de 5 minutos cada uno y manteniendo la temperatura de 4°C y la oscuridad.

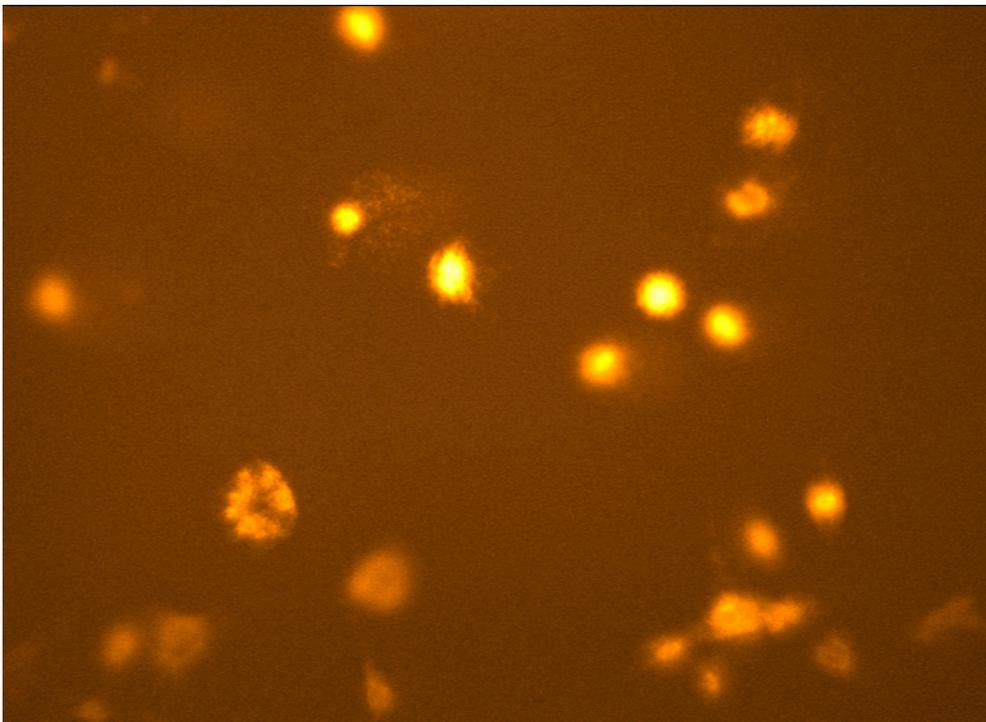
7.- Tinción del ADN y visualización de los cometas

Finalizado el proceso de neutralización, se realiza la tinción de las muestras usando 20 µl de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) de 1µg/ml durante quince minutos (mínimo) en oscuridad. Tras la tinción con el colorante fluorescente, se puede comenzar con el recuento de los cometas en el microscopio de fluorescencia.

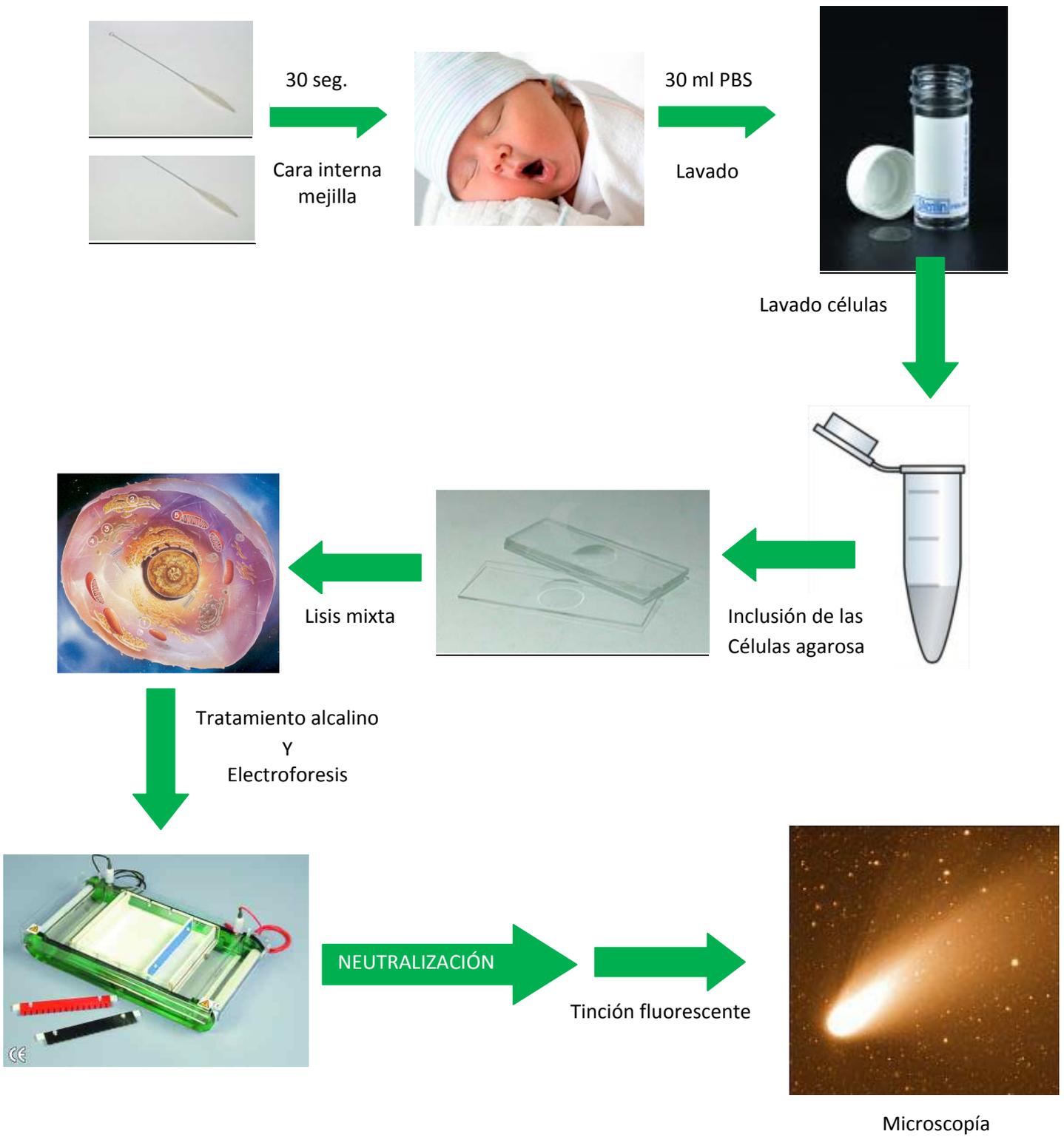
8.- Lectura y expresión de los resultados

Finalmente la lectura de los cometas se realiza usando el software kinetic Imaging komet 5.5. Contamos únicamente 50 cometas. Los resultados serán %DNA cabeza, %DNA cola y OTM (Olive Tail Moment).

Imagen 1: fotografía de los cometas obtenidos.



❖ Esquema simplificado de las diferentes fases del proceso:



3. DISEÑO ESTADÍSTICO.

Además de los programas de ofimática habituales (Microsoft Word, Excel, Power point), se ha utilizado el programa informático:

- Comet: software para imágenes o Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). A través del cual obtenemos la cuantificación del ADN expresado en % de ADN en cola, el %de ADN en la cabeza y el OTM. Además de otros muchos parámetros como son el área de la célula, la longitud de la cola etc.

- SPSS 15.0: programa informático para Windows con el que se ha realizado todo el análisis estadístico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados representan la media y el error estándar de la media. Antes de realizar el análisis estadístico, se comprobó la normalidad y homogeneidad de las variables usando los test de Kolmogorov-Smirnoff y Levene. Para evaluar las diferencias entre grupos, se realizó la T de student. Todas aquellas variables que no siguieron una normalidad se analizaron mediante el test no paramétrico de la U-Mann-Whitney. Para el estudio de relación entre las variables, independientes si eran normales o no se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Con variables normales la relación se estudió con el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Para realizar todo el tratamiento estadístico se usó el programa informático SPSS (SPSS para Windows, 15.0, 2006; SPSS, Inc., Chicago, IL).



RESULTADOS

RESULTADOS

A continuación se exponen los resultados más significativos y relevantes del estudio.

Los parámetros generales estudiados en este trabajo, en función de su relación con el daño en el ADN cromosómico tanto en linfocitos de sangre periférica como en la mucosa oral mediante el ensayo comet son los siguientes:

Parámetros analizados:

1. El sexo.
2. El peso al nacer.
3. Patología gestacional.
4. Edad gestacional.
5. Apgar.
6. Reanimación.
7. Oxigenoterapia.
8. Fototerapia.
9. Antibioterapia.
10. Tipo de nutrición.
11. Tipo de parto.
12. Hematología (fórmula leucocitaria).
13. Bioquímica clínica: Acido úrico, albúmina, bilirrubina, calcio, creatinina, ferritina, fosforo, GGT, GOT, glucemia, hierro, potasio, proteínas totales, sodio y urea.
14. Ensayo comet en células de la mucosa oral y linfocitos de sangre periférica.
15. Comparación del ensayo cometa en diferentes tratamientos como son: Oxigenoterapia, Fototerapia y Antibioterapia.
16. Ensayo comet en función del tipo de nutrición recibida.

1.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN SEXO.

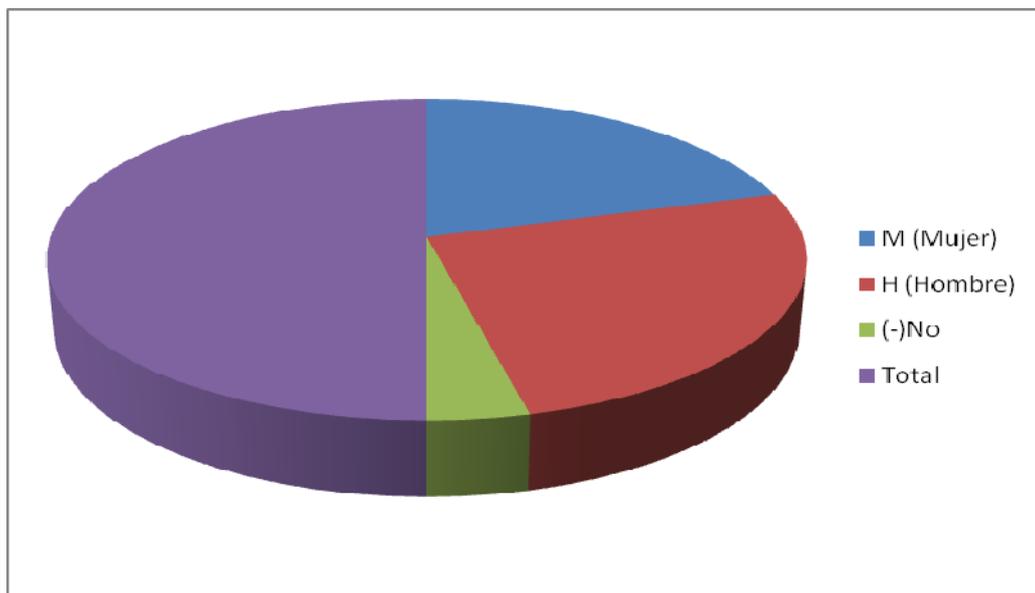
Nuestra muestra se divide en 43 mujeres y 54 hombres, como queda reflejado en la tabla de resultados 1.1.

Tabla de resultados 1.1.: distribución de los grupos experimentales según sexo, representado con valores absolutos y frecuencia.

Sexo	Nº Absoluto	Frecuencia
M (Mujer)	43	41,0
H (Hombre)	54	51,4
(?)	8	7,6
Total	105	100,0

(?): No está recogido el sexo.

Gráfico de resultados 1.1.: distribución gráfica de los grupos experimentales según sexo, representado mediante frecuencia.



2.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN PESO AL NACER.

Como queda reflejado en la tabla de resultados 2.1. los recién nacidos quedaron divididos en seis grupos según el peso al nacer.

Tabla de resultados 2.1.: distribución de los grupos experimentales según peso al nacer, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Peso al nacer</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
RNM	4	3,81
PN	20	19,05
BPN	41	39,05
MBPN	14	13,33
MMBPN	6	5,71
(?)	20	19,05
Total	105	100,00

(?): No está recogido el peso al nacer.

RMN: recién nacido macrosómico. ($\geq 4000\text{g}$)

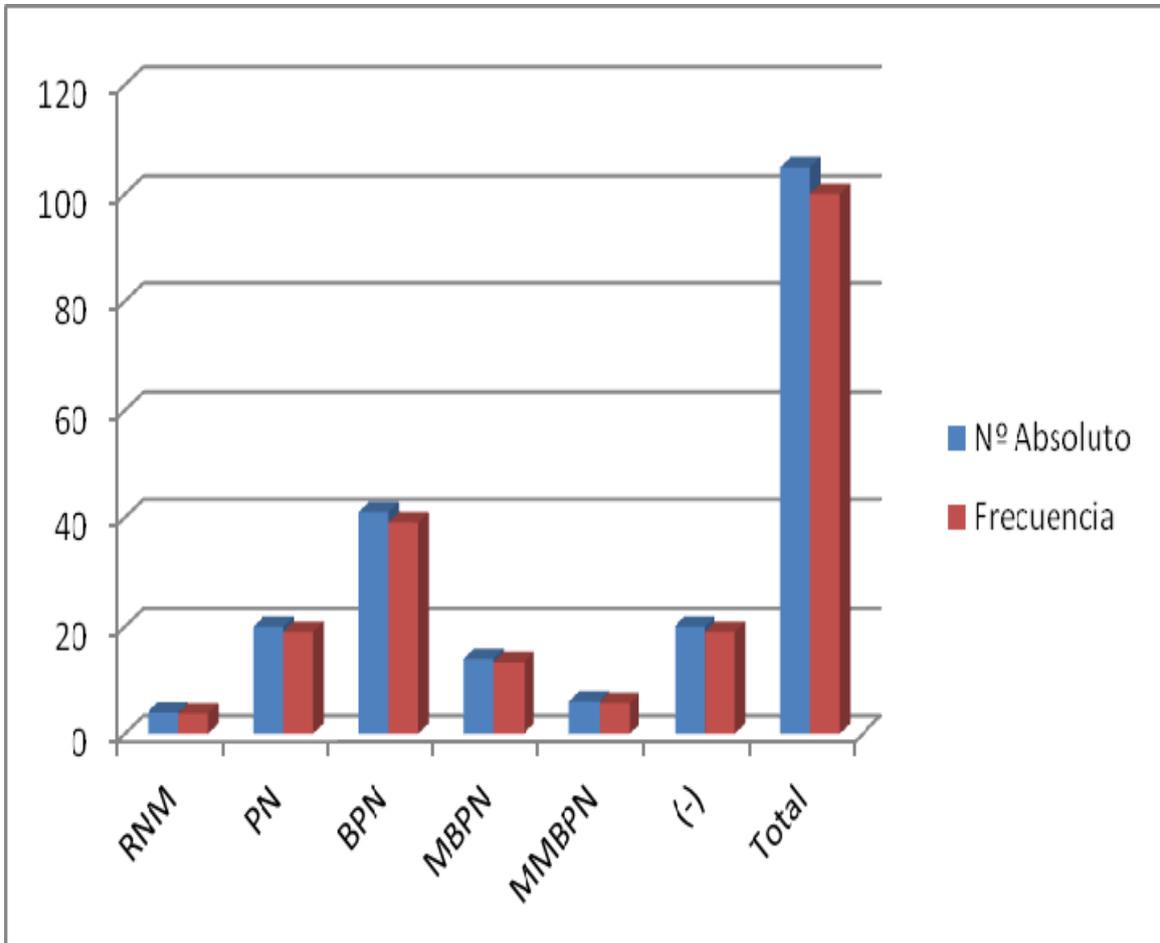
PN: Normo peso. ($> 2500\text{g}$)

BPN: Bajo peso al nacer. ($< 2.500\text{g}$)

MBPN: Muy bajo peso al nacer. ($< 1.500\text{g}$)

MMPBN: Muy muy bajo peso al nacer. ($< 1.00\text{g}$)

Gráfico de resultados 2.1.: distribución de los grupos experimentales según peso al nacer, representados en valor absoluto y frecuencia.



(?): No está recogido el peso al nacer.

RMN: recién nacido macrosómico. ($\geq 4000\text{g}$)

PN: Normo peso. ($> 2500\text{g}$)

BPN: Bajo peso al nacer. ($< 2.500\text{g}$)

MBPN: Muy bajo peso al nacer. ($< 1.500\text{g}$)

MMPBN: Muy muy bajo peso al nacer. ($< 1.00\text{g}$)

Podemos observar que con esta clasificación se obtuvieron seis grupos muy heterogéneos, cada uno conteniendo entre el 3,81% y el 39,05% del total de los neonatos estudiados.

3.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN PATOLOGÍA GESTACIONAL.

La siguiente tabla, la tabla de resultados 3.1. refleja que de los neonatos estudiados, el 36,2% de sus madres sufrían alguna patología gestacional y el 63,8% restante no sufrieron ninguna patología.

Tabla de resultados 3.1.: distribución de los grupos experimentales según patología gestacional, representado con valores absolutos y frecuencia.

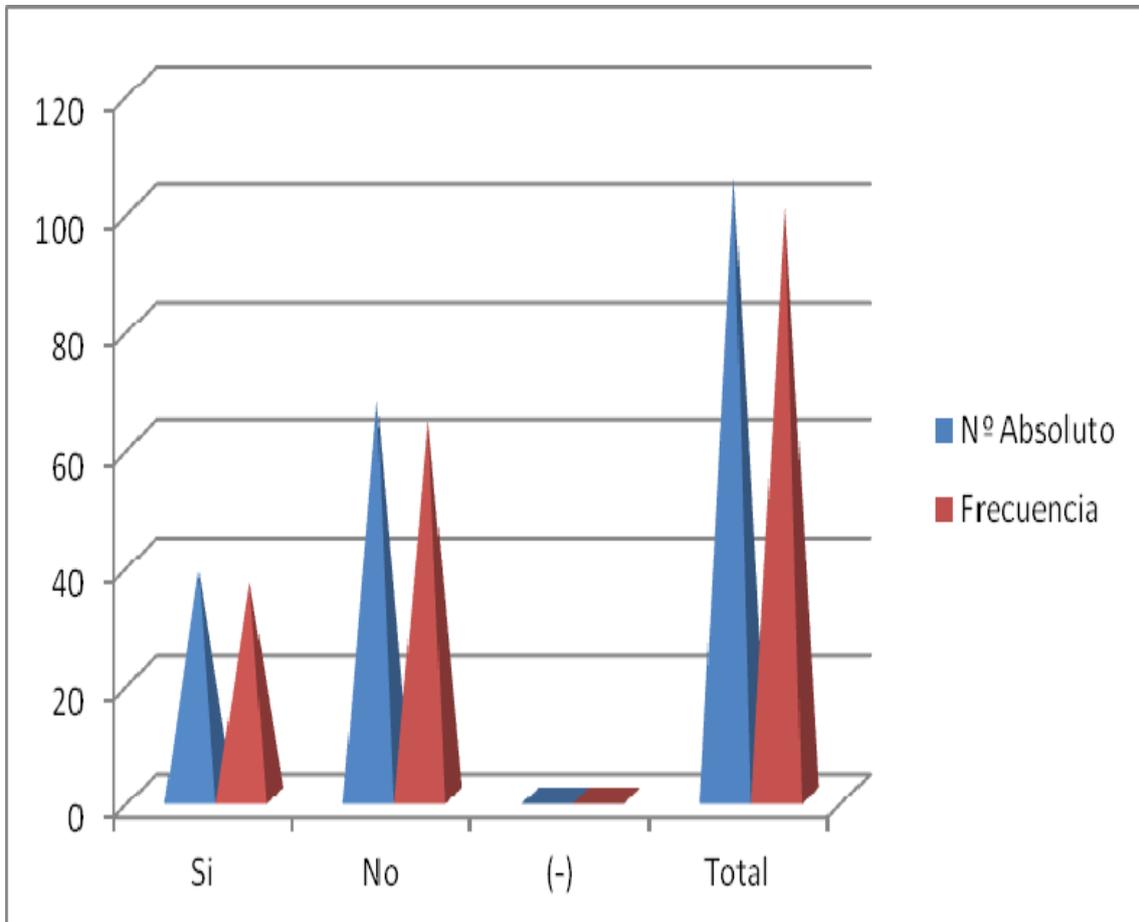
Patología gestacional	Nº Absoluto	Frecuencia
<i>Si</i>	38	36,2
<i>No</i>	67	63,8
(?)	0	0,0
Total	105	100,0

(?): No está recogida la patología gestacional.

Si: con patología gestacional.

No: Sin patología gestacional.

Gráfico de resultados 3.1.: distribución gráfica de los grupos experimentales según patología gestacional, representados en valor absoluto y frecuencia.



(?): No está recogida la patología gestacional.

Si: con patología gestacional.

No: Sin patología gestacional.

Entre las patologías gestacionales consideradas se encuentran la diabetes gestacional, elevada presión arterial y obesidad.

4.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN EDAD GESTACIONAL.

Como queda reflejado en la tabla de resultados 4.1. dentro de la muestra experimental no se encuentra ningún recién nacido posttermino, quedando distribuida la muestra en un 17,1% de recién nacidos a término, un 62,9% de recién nacidos prematuros y el 20% restante se desconoce.

Tabla de resultados 4.1.: distribución de los grupos experimentales según edad gestacional, representado con valores absolutos y frecuencia.

Edad gestacional	Nº Absoluto	Frecuencia
RNT	18	17,1
RNPR	66	62,9
RNPT	0	0,0
(?)	21	20,0
TOTAL	105	100,0

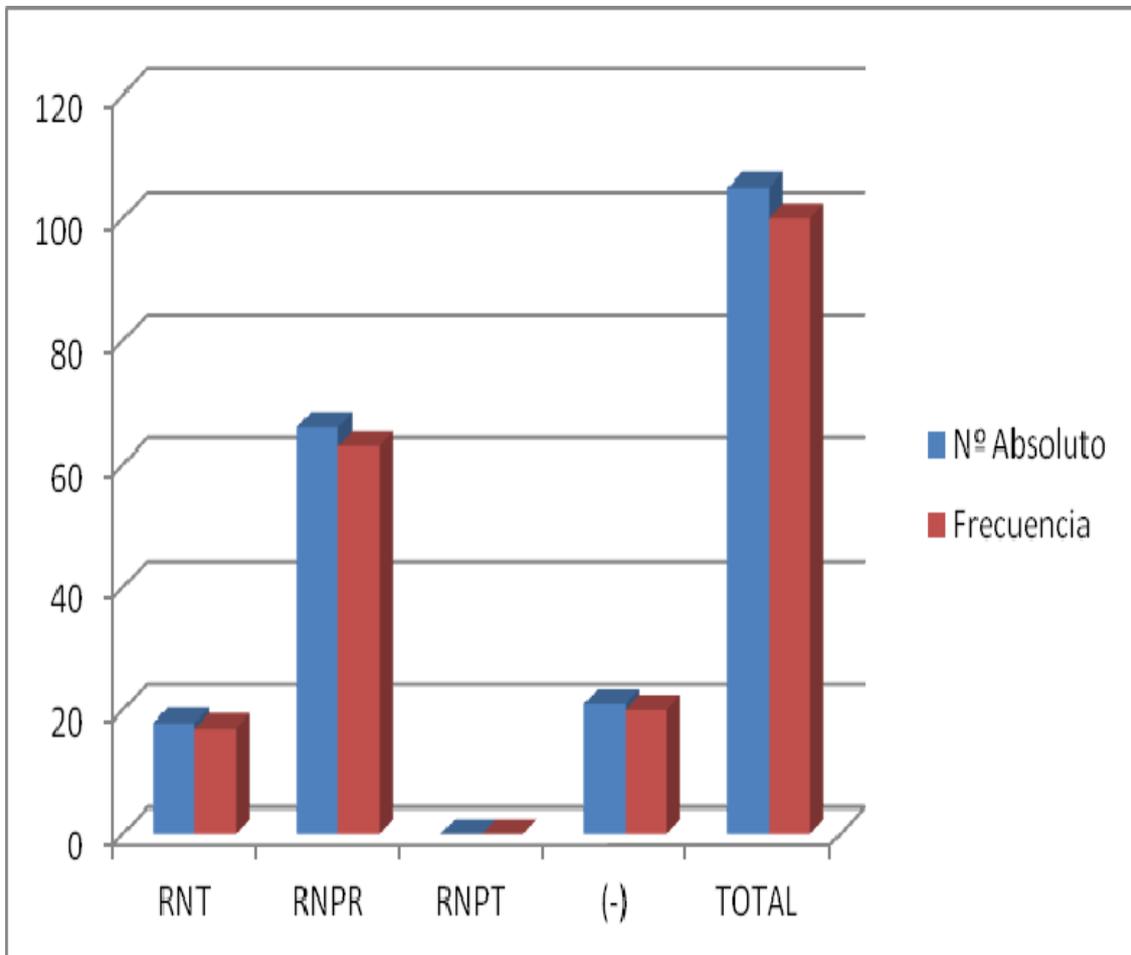
RNT: Recién nacido a término. (38 semanas y 42 semanas).

RNPR: Recién nacido prematuro (menos de 37 semanas).

RNPT: Recién nacido posttermino (mayor de 42 semanas).

(?): Se desconoce la edad gestacional.

Gráfico de resultados 4.1.: distribución gráfica de los grupos experimentales según edad gestacional, representados en valor absoluto y frecuencia.



RNT: Recién nacido a término (38 semanas y 42 semanas).

RNPR: Recién nacido prematuro (menos de 37 semanas de gestación).

RNPT: Recién nacido posttermino (mayor de 42 semanas de gestación)

(?): Se desconoce la edad gestacional.

La distribución gráfica muestra claramente un elevado número de recién nacidos prematuros dentro de la muestra experimental en comparación con el número de recién nacidos a término y los que habían nacido posttermino.

5.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN PRUEBA DE APGAR REALIZADA AL MINUTO DE NACER Y A LOS CINCO MINUTOS.

Tablas de resultados 5.1.: distribución de los grupos experimentales según prueba de apgar al minuto y a los cinco minutos de nacer, representado con valores absolutos y frecuencia

<i>Apgar 1</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(7-10)	71	67,62
<7	13	12,38
(?)	21	20,00
Total	105	100,00

(?): Se desconoce el puntaje de apgar.

<i>Apgar 5</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(7-10)	78	74,29
<7	5	4,76
(?)	22	20,95
Total	105	100,00

El test de Apgar que es utilizado para valorar la condición clínica inicial del neonato, muestra según las tablas de resultados 5.1. que entre el 67% (apgar 1) y el 74,26%(apgar 5) presentan puntaje de apgar alto (7-10).

Gráfico de resultados 5.1.: distribución gráfica del grupo experimental según prueba de apgar realizada al minuto de nacer, representados en valor absoluto y frecuencia.

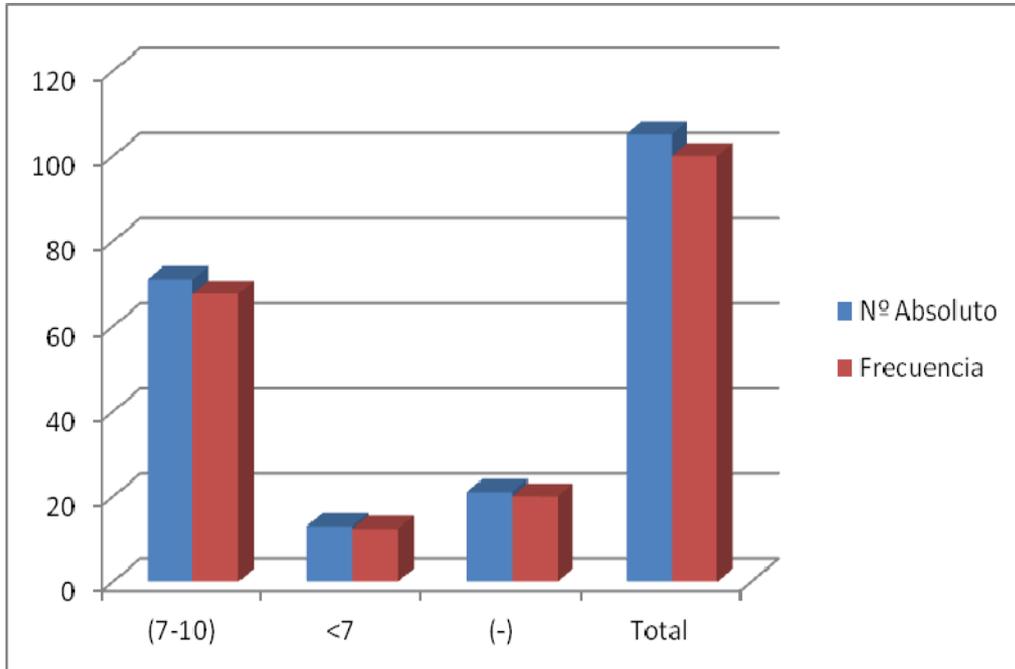
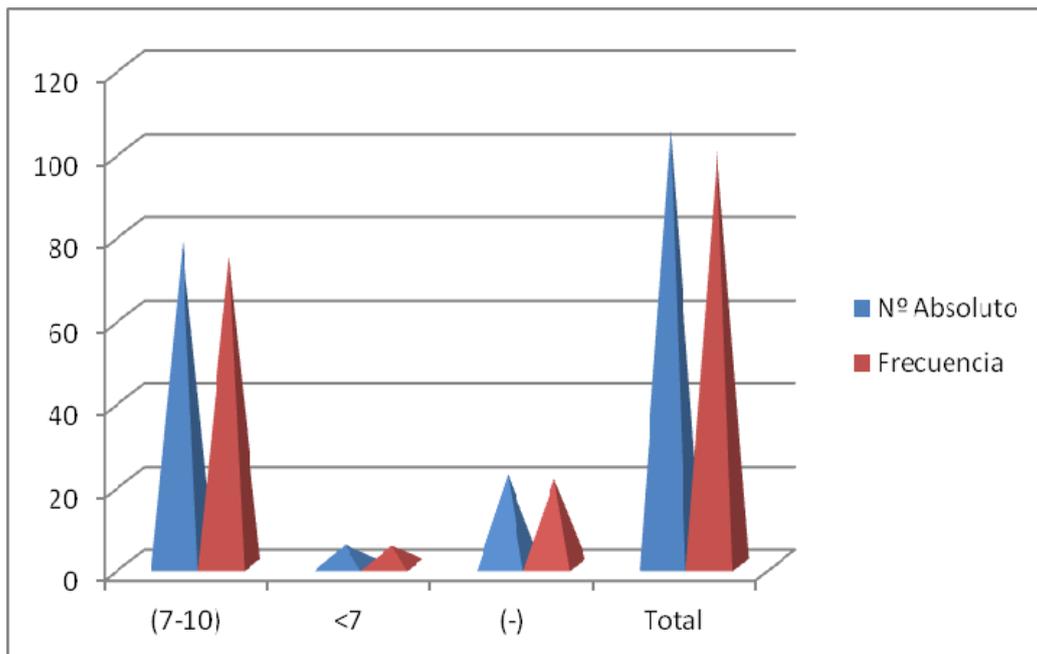


Gráfico de resultados 5.2.: distribución gráfica del grupo experimental según prueba de apgar realizada a los cinco minutos de nacer, representados en valor absoluto y frecuencia.



6.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN REANIMACIÓN.

Si agrupamos la muestra experimental en función de si han recibido algún tipo de reanimación, observamos en la tabla 6.1. que 62 recién nacidos han recibido algún tipo de reanimación.

Tabla de resultados 6.1.: distribución de los grupos experimentales en función de si han recibido algún tipo de reanimación, representado con valores absolutos y frecuencia.

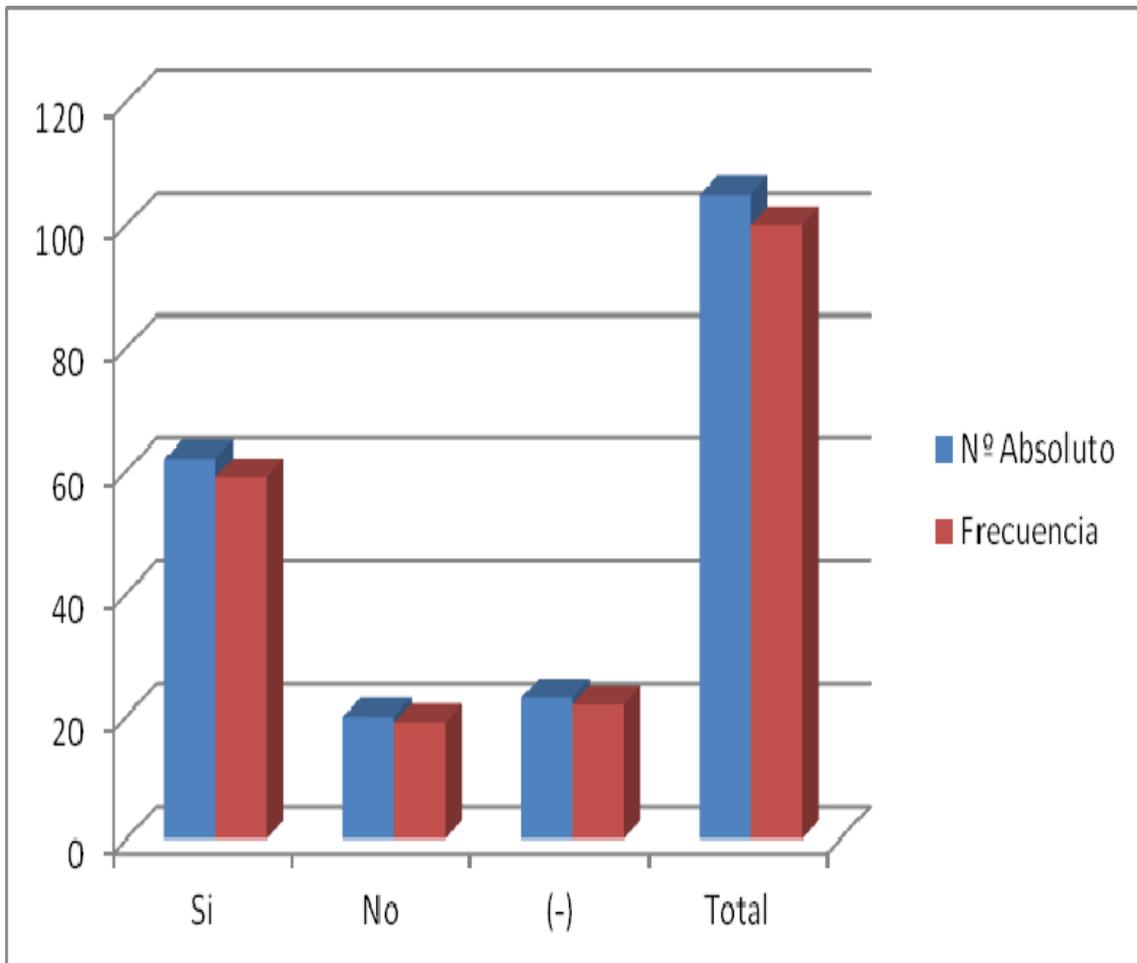
<i>Reanimación</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
Si	62	59,05
No	20	19,05
(?)	23	21,90
Total	105	100,00

(?): Se desconoce si han recibido reanimación.

Si: han recibido algún tipo de reanimación.

No: no han recibido reanimación.

Gráfico de resultados 6.1.: distribución gráfica del grupo experimental en función de si han recibido algún tipo de reanimación al nacer, representados en valor absoluto y frecuencia.



Si: han recibido algún tipo de reanimación.

No: no han recibido reanimación.

(?): Se desconoce si han recibido reanimación.

Observamos en el gráfico 6.1. un elevado número (62) de recién nacidos que al nacer han necesitado reanimación frente a 20 que no recibieron reanimación.

7.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN OXIGENOTERAPIA.

Si agrupamos la muestra experimental en función de si han recibido oxigenoterapia, observamos en la tabla 7.1. que 45 recién nacidos han recibido alguna cantidad de oxígeno.

Tabla de resultados 7.1.: distribución de los grupos experimentales en función de si han recibido oxigenoterapia, representado con valores absolutos y frecuencia.

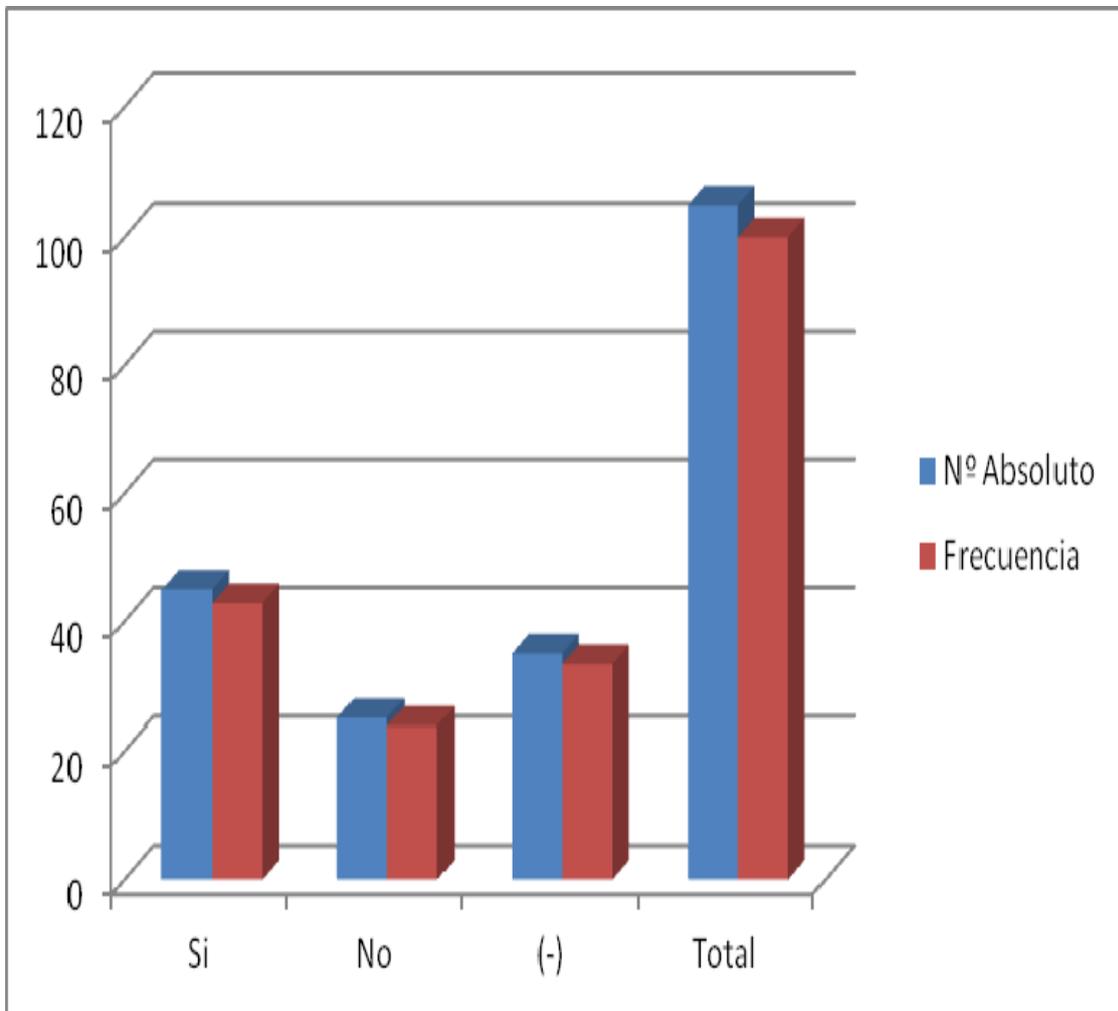
<i>Oxigenoterapia</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
Si	45	42,86
No	25	23,81
(?)	35	33,33
Total	105	100,00

Si: han recibido oxigenoterapia.

No: no han recibido oxigenoterapia.

(?): Se desconoce si han recibido alguna cantidad de oxígeno.

Gráfico de resultados 7.1.: distribución gráfica del grupo experimental según oxigenoterapia recibida, representados en valor absoluto y frecuencia.



Si: han recibido algún tipo de reanimación.

No: no han recibido reanimación.

(?): Se desconoce.

El gráfico 7.1. muestra que 45 de los recién nacidos investigados en el presente estudio habían recibido alguna cantidad de oxígeno, 20 de los mismos no recibieron oxigenoterapia y el resto se desconoce el dato.

8.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN FOTOTERAPIA.

Si agrupamos la muestra experimental en función de si han recibido fototerapia, observamos en la tabla 8.1. que 23 recién nacidos han recibido fototerapia.

Tabla de resultados 8.1.: distribución de los grupos experimentales en función de si han recibido fototerapia, representado con valores absolutos y frecuencia.

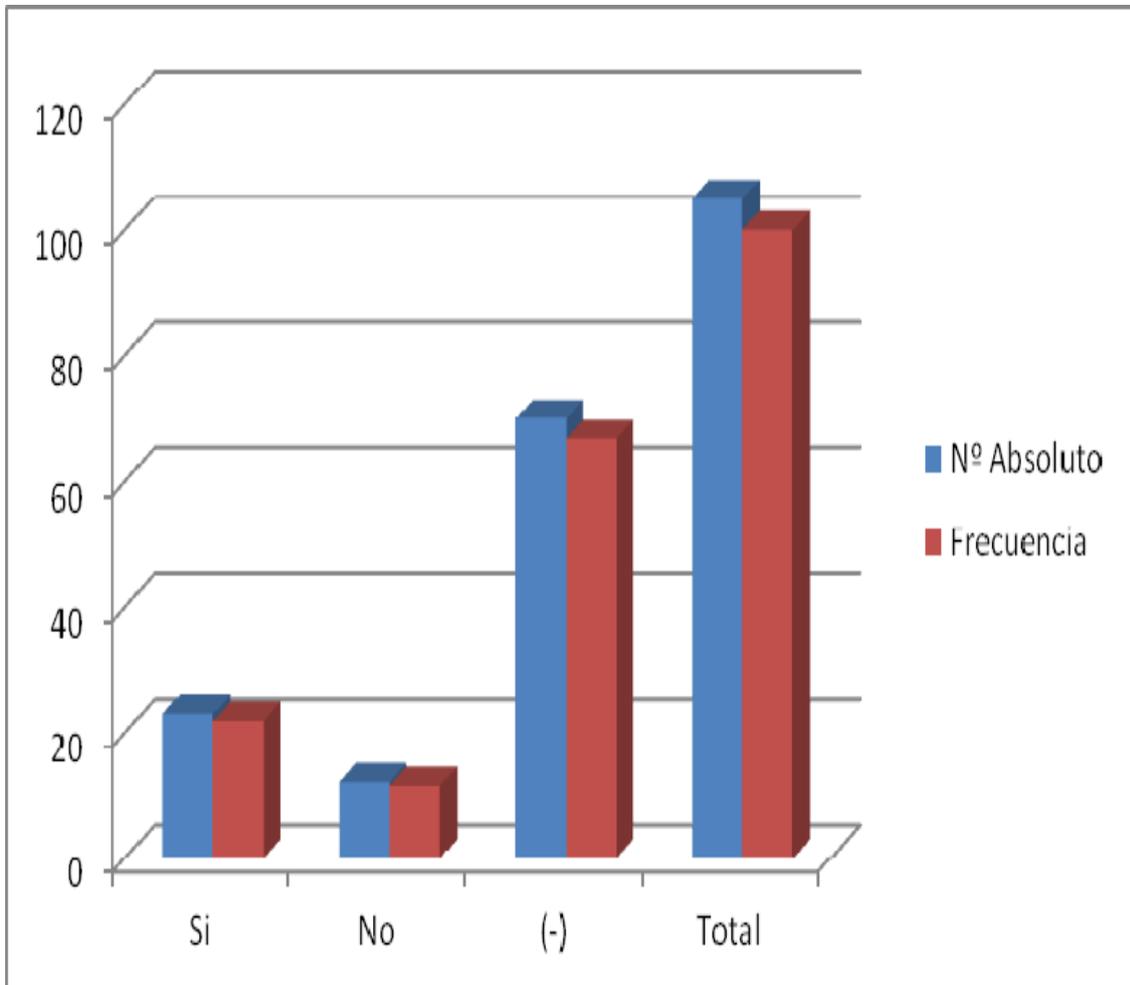
<i>Fototerapia</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
Si	23	21,90
No	12	11,43
(?)	70	66,67
Total	105	100,00

Si: han recibido fototerapia.

No: no han recibido fototerapia.

(?): Se desconoce si han recibido fototerapia.

Gráfico de resultados 8.1.: distribución gráfica del grupo experimental según fototerapia recibida, representados en valor absoluto y frecuencia.



Si: han recibido fototerapia.

No: no han recibido fototerapia.

(?): Se desconoce.

El grupo de recién nacidos distribuidos en función de la fototerapia recibida consta de 34 recién nacidos entre los cuales 23 habían recibido fototerapia y 12 de ellos no. En el resto de la muestra experimental (70) se desconoce el dato.

9.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN ANTIBIOTERAPIA.

Si agrupamos la muestra experimental en función de si han recibido antibioterapia, observamos en la tabla 9.1. que 45 recién nacidos han recibido antibioterapia.

Tabla de resultados 9.1.: distribución de los grupos experimentales en función de si han recibido antibioterapia, representado con valores absolutos y frecuencia.

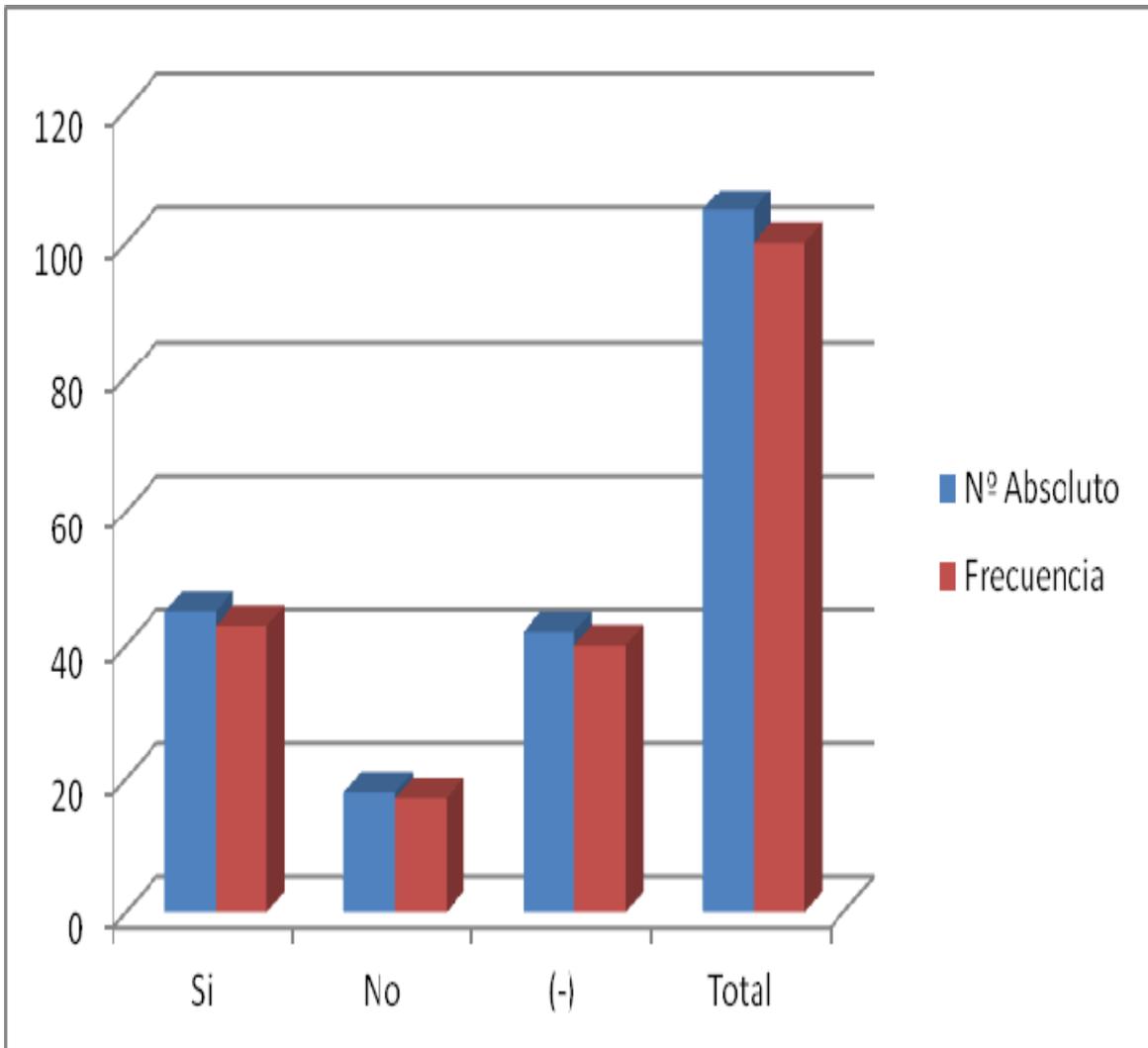
<i>Antibioterapia</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
Si	45	42,86
No	18	17,14
(?)	42	40,00
Total	105	100,00

Si: han recibido antibioterapia.

No: no han recibido antibioterapia.

(?): Se desconoce si los pacientes han recibido antibioterapia.

Gráfico de resultados 9.1.: distribución gráfica del grupo experimental según antibioterapia recibida, representados en valor absoluto y frecuencia.



Si: han recibido antibioterapia.

No: no han recibido antibioterapia.

(?): Se desconoce si han recibido algún antibiótico.

Como queda reflejado en el presente gráfico, la muestra experimental presenta un elevado número de recién nacidos que han recibido antibioterapia (45) frente los 18 que no habían recibido.

10.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN TIPO DE NUTRICIÓN.

Dividiendo a los recién nacidos en dos grupos según la alimentación recibida, observamos en la tabla 10.1. que 45 recién nacidos fueron alimentados con leche materna y 22 con fórmula adaptada.

Tabla de resultados 10.1.: distribución de los grupos experimentales en función del tipo de nutrición, representado con valores absolutos y frecuencia.

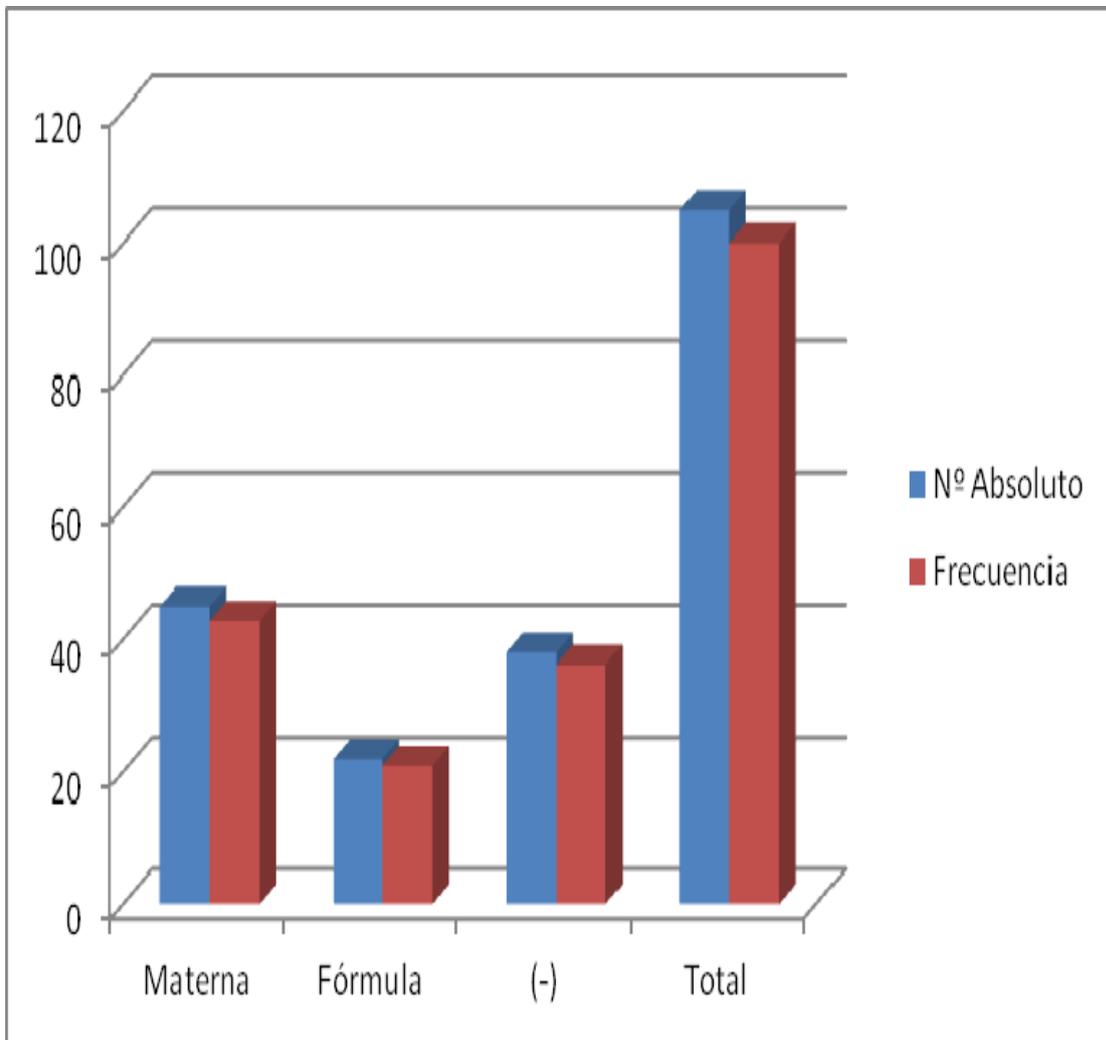
<i>Nutrición</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
Materna	45	42,86
Fórmula	22	20,95
(?)	38	36,19
Total	105	100,00

(?): Se desconoce el tipo de alimentación.

Materna: alimentación con leche materna.

Fórmula: alimentación con leche adaptada.

Gráfico de resultados 10.1.: distribución gráfica del grupo experimental según tipo de nutrición recibida, representados en valor absoluto y frecuencia.



(?): Se desconoce el tipo de nutrición recibida.

Materna: alimentación con leche materna.

Fórmula: alimentación con leche adaptada.

Los resultados gráficos de la muestra experimental distribuida en función del tipo de alimentación recibida muestran claramente un mayor número de recién nacidos alimentados con leche materna.

11.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN TIPO DE PARTO.

Dividiendo a los recién nacidos en dos grupos según el tipo de parto, observamos en la tabla 11.1. que en 56 el tipo de parto fue cesárea, frente a 27 que nacieron de forma espontánea.

Tabla de resultados 11.1.: distribución de los grupos experimentales en función del tipo de parto, representado con valores absolutos y frecuencia.

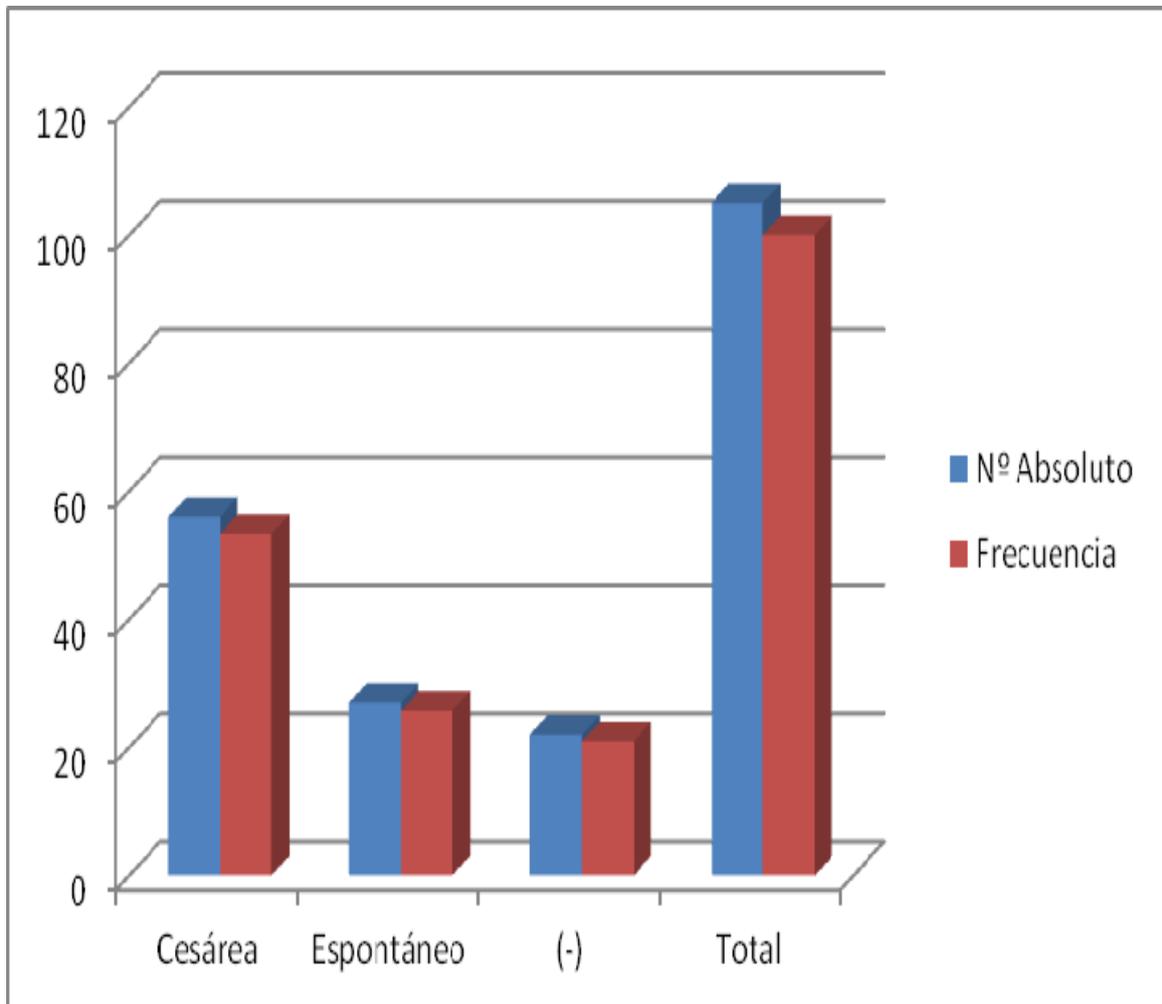
<i>Tipo parto</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
Cesárea	56	53,33
Espontáneo	27	25,71
(?)	22	20,95
Total	105	100,00

(?): Se desconoce el tipo de parto.

Cesárea: parto por cesárea.

Espontáneo: parto vaginal.

Gráfico de resultados 11.1.: distribución gráfica del grupo experimental según tipo de parto, representados en valor absoluto y frecuencia.



(?): Se desconoce el tipo de parto.

Cesárea: parto por cesárea.

Espontáneo: parto vaginal.

El gráfico de distribución de la muestra en función del parto muestra un mayor número de partos por cesárea.

12.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN HEMATOLOGÍA REALIZADA.

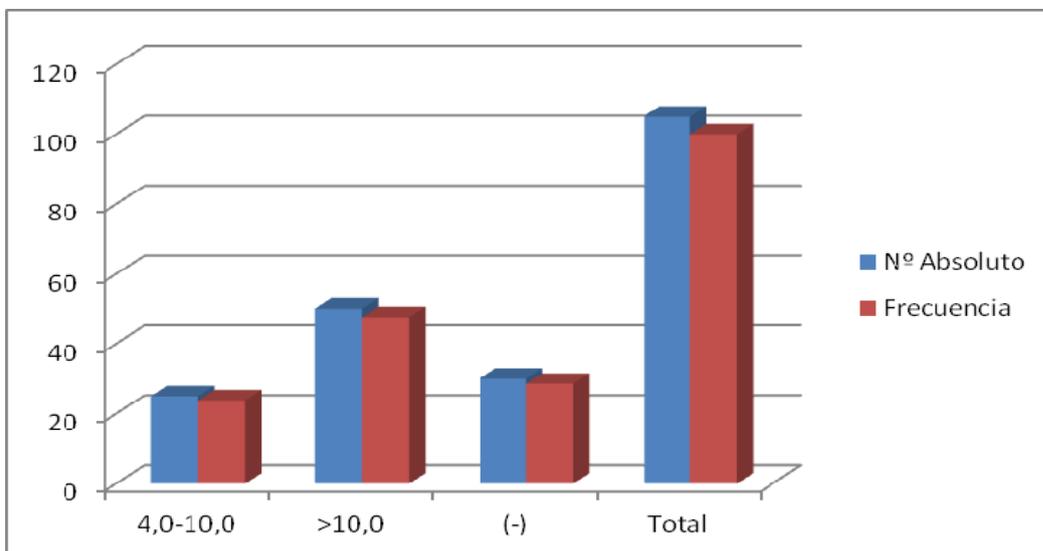
Tabla 12.1.: Distribución de la muestra según fórmula leucocitaria, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Leucocitos</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
4,0-10,0	25	23,81
>10,0	50	47,62
(?)	30	28,57
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (4,0-10,0) $\times 10^3/\mu\text{L}$.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico de resultados 12.1.: Distribución gráfica de la muestra según fórmula leucocitaria, representado con valores absolutos y frecuencia.



Los parámetros de leucocitos normales en sangre son de (4,0-10,0) $\times 10^3/\mu\text{L}$. Como podemos observar en la tabla 12.1. solo 25 de los neonatos estudiados se encontraban con valores normales y 50 de ellos tenían una concentración superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$.

13.-DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EXPERIMENTAL SEGÚN BIOQUÍMICA CLÍNICA REALIZADA.

Todos los parámetros analíticos relacionados con la bioquímica del plasma que han sido estudiados en el presente trabajo se exponen a continuación:

13.1. ÁCIDO ÚRICO.-

Tabla 13.1.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos en las pruebas bioquímicas de ácido úrico, representado con valores absolutos y frecuencia.

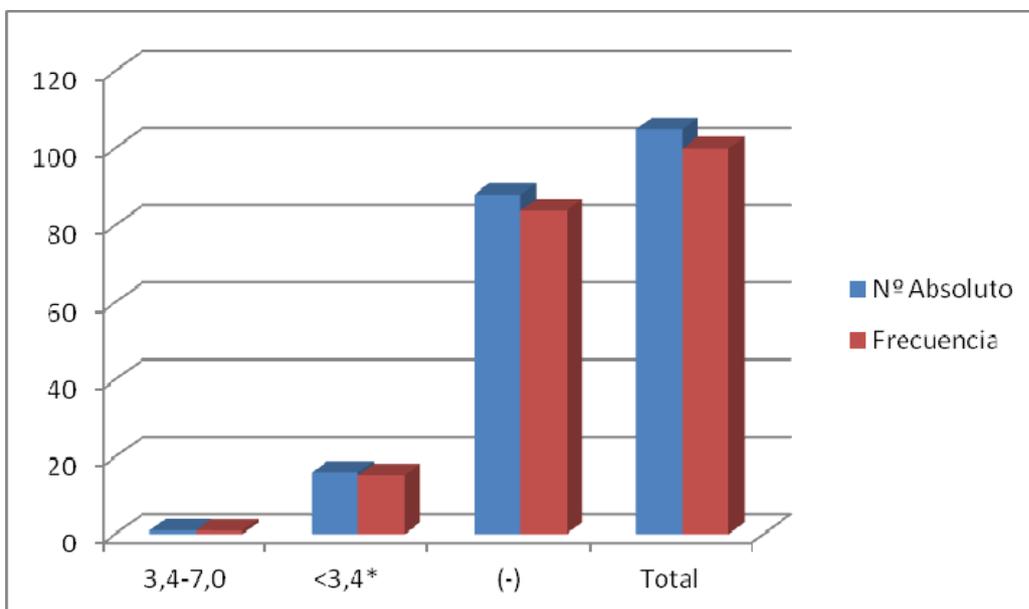
<i>Ácido Úrico</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
3,4-7,0	1	0,95
<3,4*	16	15,24
(?)	88	83,81
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (3,4-7,0) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla de resultados 13.1.1. refleja que de los neonatos estudiados, solo uno tenía valores normales de ácido úrico en sangre en el momento de la toma de la muestra, 16 tenían valores por debajo de los parámetros normales y en los 88 recién nacidos restantes se desconoce dicho parámetro.

Gráfico 13.1.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores de ácido úrico, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (3,4-7,0) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

13.2. ALBÚMINA.-

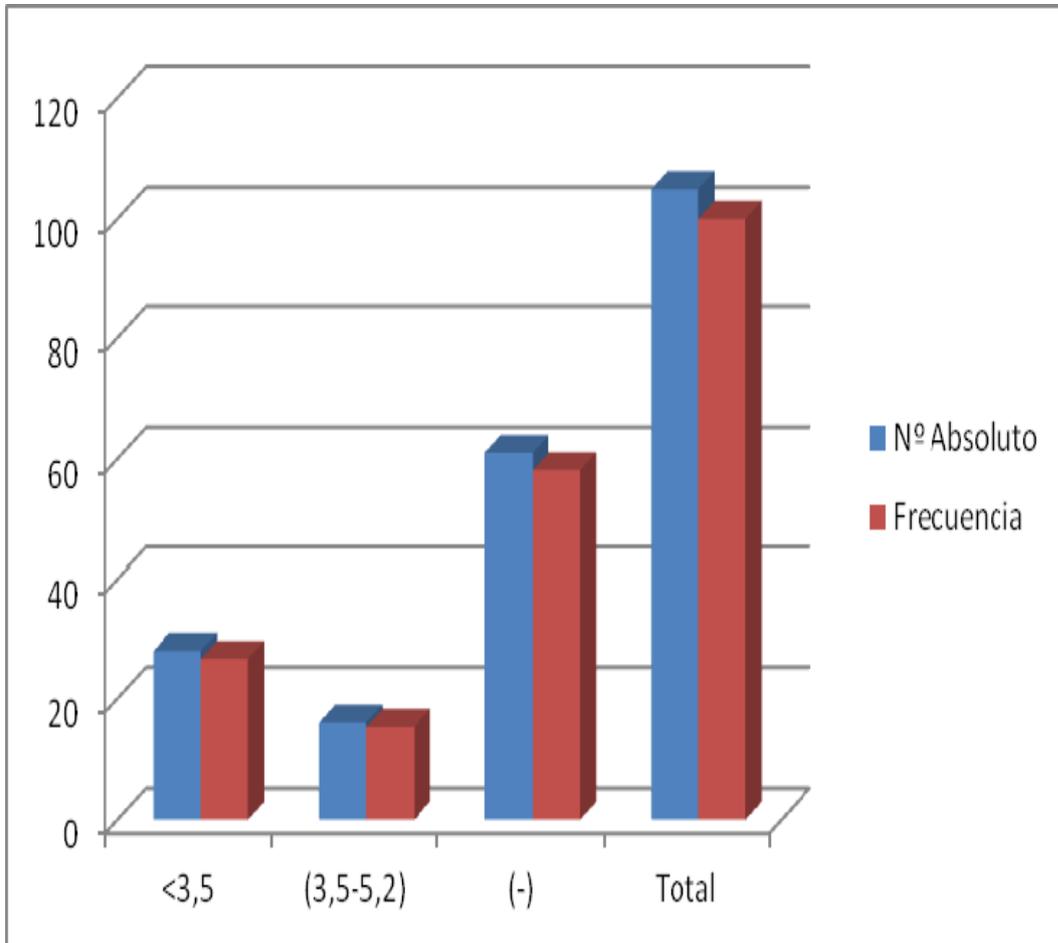
Tabla 13.2.1.: Distribución de la muestra según determinación de albúmina, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Albúmina</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
<3,5	28	26,66
(3,5-5,2)	16	15,24
(?)	61	58,10
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (3,5-5,2) g/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.2.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores de albúmina obtenidos en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (3,5-5,2) g/dL.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla de resultados 13.2.1. refleja que de los neonatos estudiados 16 tenía valores normales de albúmina en sangre en el momento de toma de la muestra, 28 tenían valores por debajo de los parámetros normales y en los recién nacidos restantes se desconoce dicho parámetro.

13.3. BILIRRUBINA.-

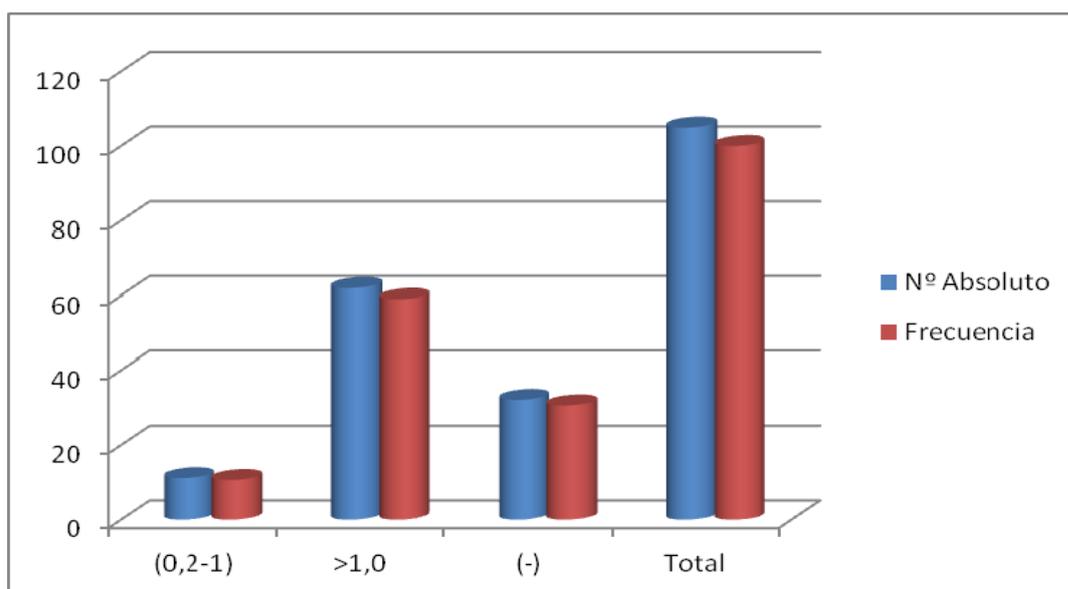
Tabla 13.3.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de bilirrubina total en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Bilirrubina total</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(0,2-1)	11	10,48
>1,0	62	59,05
(?)	32	30,48
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (0,2-1,0) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.3.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de bilirrubina total en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (0,2-1,0) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Los valores normales de bilirrubina total en sangre son (0,2-1,0) mg/dL. La tabla de distribución muestral 13.3.1. refleja que un 59,05% de los recién nacidos tienen valores >1,0 mg/dL de bilirrubina total en el momento de toma de la muestra.

Tabla 13.3.2.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de bilirrubina directa en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

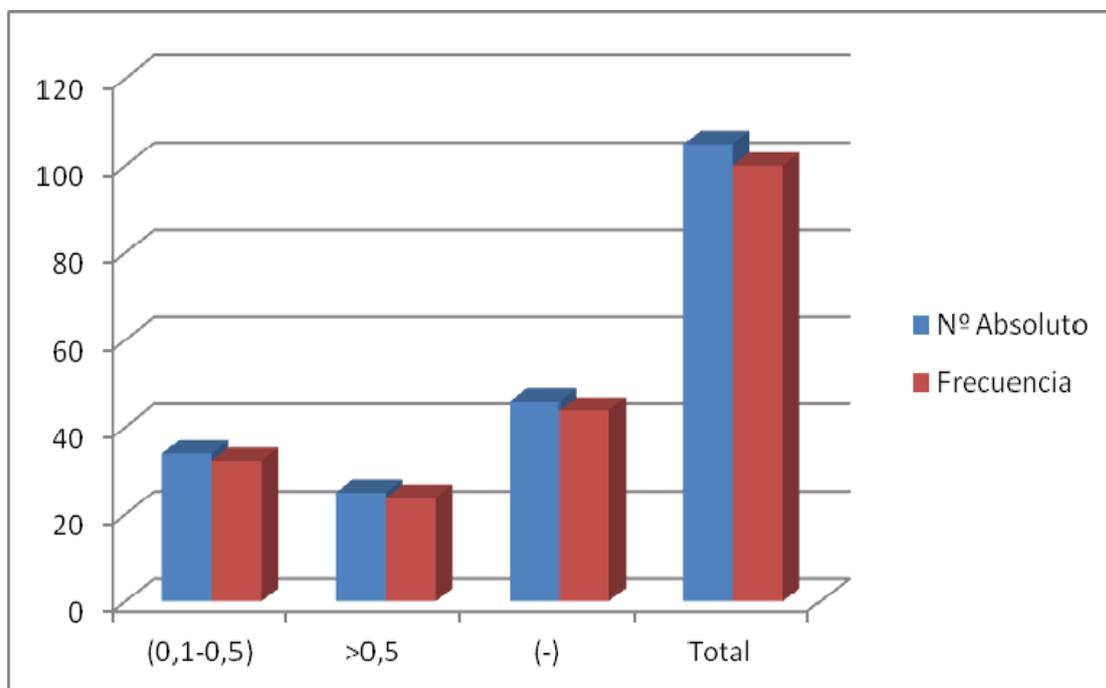
<i>Bilirrubina directa</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(0,1-0,5)	34	32,38
>0,5	25	23,81
(?)	46	43,81
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (0,1-0,5) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla de resultados 13.3.2. refleja que 34 de los neonatos estudiados tenía valores normales (0,1-0,5) de bilirrubina directa en sangre en el momento de la toma de la muestra, 25 tenían valores por debajo de los parámetros normales y en los 46 recién nacidos restantes no se determinó bilirrubina directa en sangre.

Gráfico 13.3.2.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de bilirrubina directa en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (0,1-0,5) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

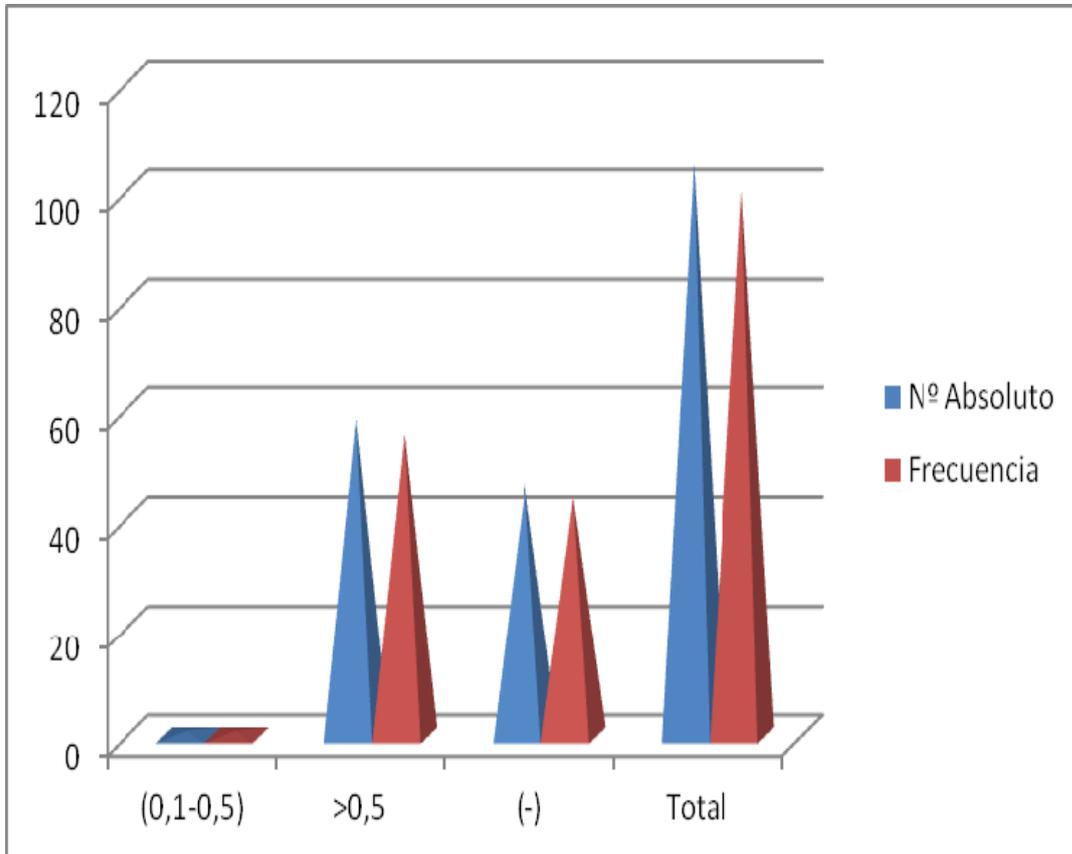
Tabla 13.3.3.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de bilirrubina indirecta en sangre, representado con valor absoluto y frecuencia.

<i>Bilirrubina indirecta</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(0,1-0,5)	1	0,95
>0,5	58	55,24
(-)	46	43,81
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (0,1-0,5) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.3.3.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de bilirrubina indirecta en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (0,1-0,5) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Los valores normales de bilirrubina indirecta en sangre son (0,1-0,5) mg/dL. La tabla de distribución muestral 13.3.3. refleja que un 55,24% de los recién nacidos tienen valores >0,5 mg/dL de bilirrubina indirecta en el momento de toma de la muestra, solo un recién nacido tiene valores normales y para el resto no se determinó el valor de bilirrubina indirecta en sangre.

13.4. CALCIO.-

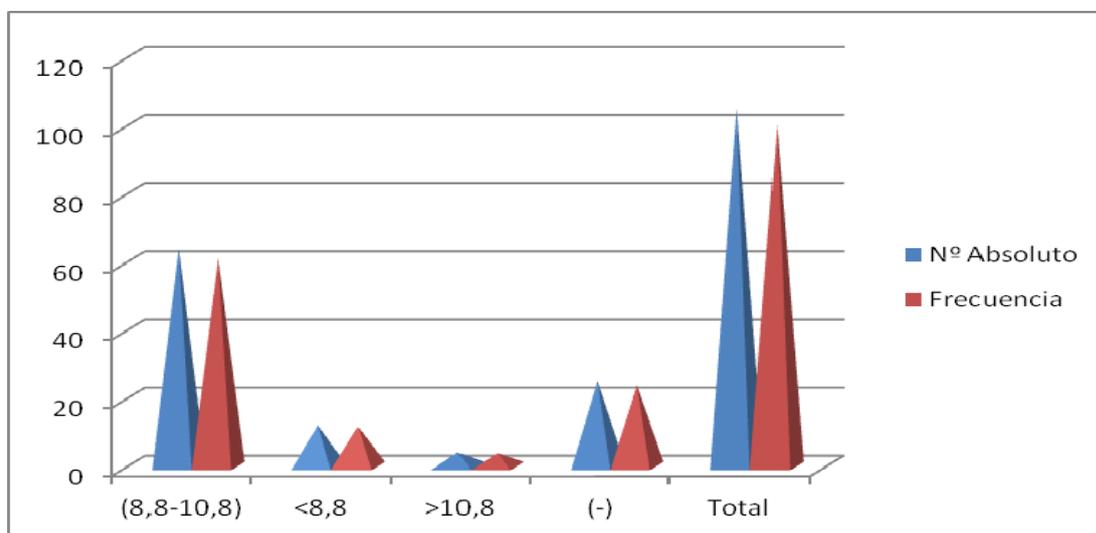
Tabla 13.4.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de calcio en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Calcio</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(8,8-10,8)	64	60,95
<8,8	12	11,43
>10,8	4	3,81
(?)	25	23,81
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (8,8-10,8) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.4.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de calcio en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (8,8-10,8) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Nuestra muestra presenta 64 neonatos con valores dentro de los parámetros normales de calcio en el momento de toma de la muestra como queda reflejado en la tabla 13.4.1.

13.5. CREATININA.-

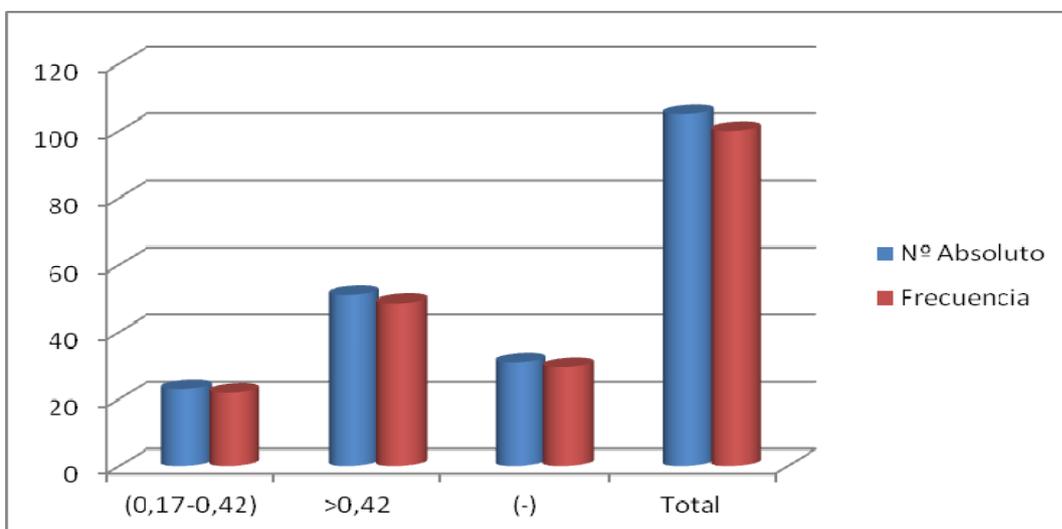
Tabla 13.5.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de creatinina en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Creatinina</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(0,17-0,42)	23	21,90
>0,42	51	48,57
(?)	31	29,52
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (0,17-0,42) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.5.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de creatinina en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (0,17-0,42) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

El gráfico 13.5.1. nos muestra que un mayor número de neonatos tienen valores de creatinina en sangre en el momento de toma de la muestra superiores al valor normal (> 0,42) mg/dL.

13.6. FERRITINA.-

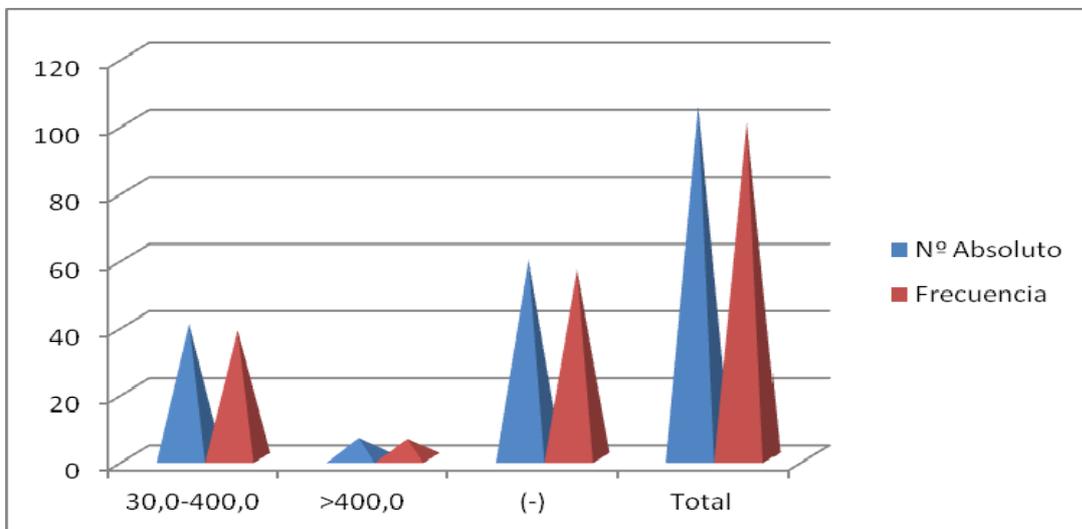
Tabla 13.6.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de ferritina en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Ferritina</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
30,0-400,0	40	38,10
>400,0	6	5,71
(?)	59	56,19
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (30,0-400,0) ng/mL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.6.1: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de ferritina en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (30,0-400,0) ng/mL.

(?): Se desconocen los valores.

El gráfico 13.6.1. nos muestra que un mayor número de neonatos (40) tienen valores de ferritina en sangre en el momento de toma de la muestra dentro del parámetro normal (30,0-400,0) ng/mL.

13.7. FOSFORO.-

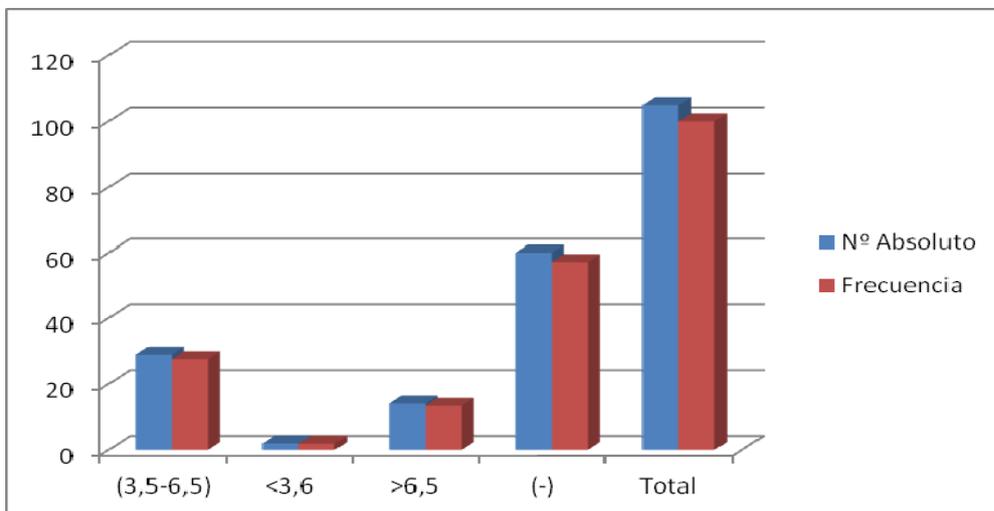
Tabla 13.7.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de fósforo en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Fosforo</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
(3,5-6,5)	29	27,62
<3,6	2	1,90
>6,5	14	13,33
(?)	60	57,14
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (3,5-6,5) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.7.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de fósforo en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (3,5-6,5) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.7.1. nos muestra que un mayor número de neonatos (29) tienen valores de fósforo en sangre en el momento de toma de la muestra dentro del parámetro normal (3,5-6,5) mg/dL.

13.8. GGT.-

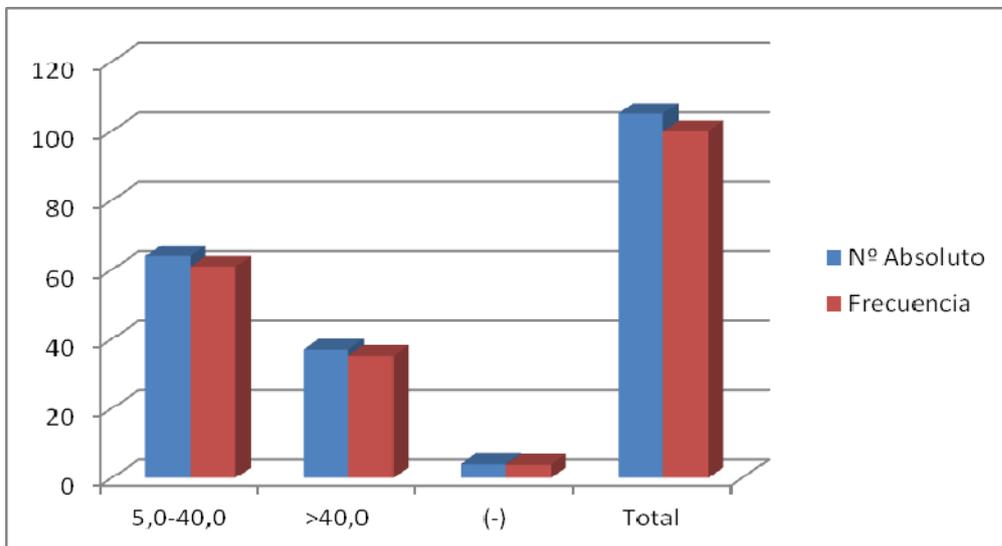
Tabla 13.8.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de GGT en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>GGT</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
5,0-40,0	64	60,95
>40,0	37	35,24
(?)	4	3,81
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (5,0-40,0) U/L.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.8.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de GGT en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (5,0-40,0) U/L.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.8.1. muestra que un 60% de recién nacidos tienen valores normales de GGT en el momento de toma de la muestra, un 35% tienen valores superiores (40 U/L) y el resto se desconoce.

13.9. GOT.-

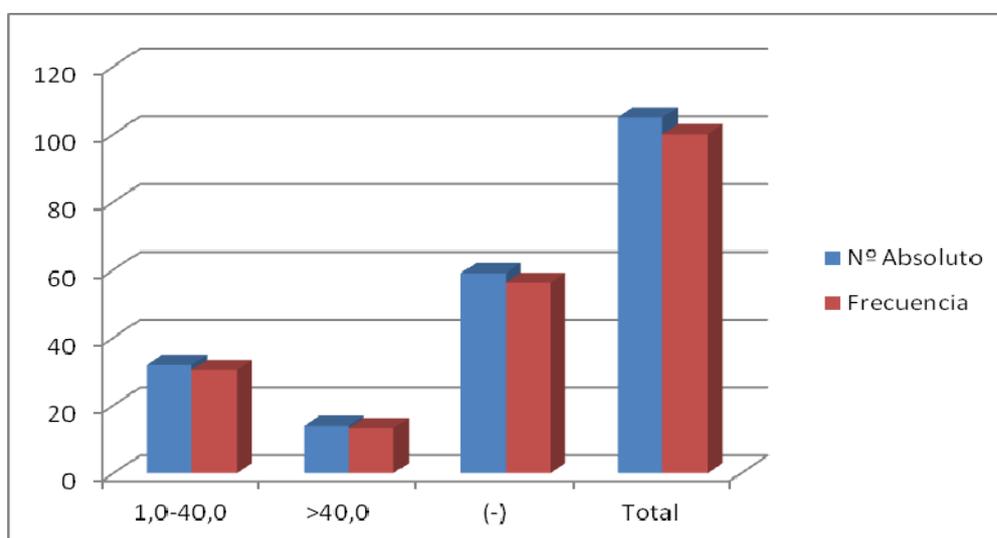
Tabla 13.9.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de GOT en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>GOT</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
1,0-40,0	32	30,48
>40,0	14	13,33
(?)	59	56,19
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (1,0-40,0) U/L.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.9.1: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de GOT en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (1,0-40,0) U/L.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.9.1. muestra que un 30% de recién nacidos tienen valores normales de GOT en el momento de toma de la muestra, un 13% tienen valores superiores (40 U/L) y el resto se desconoce.

13.10. GLUCEMIA.-

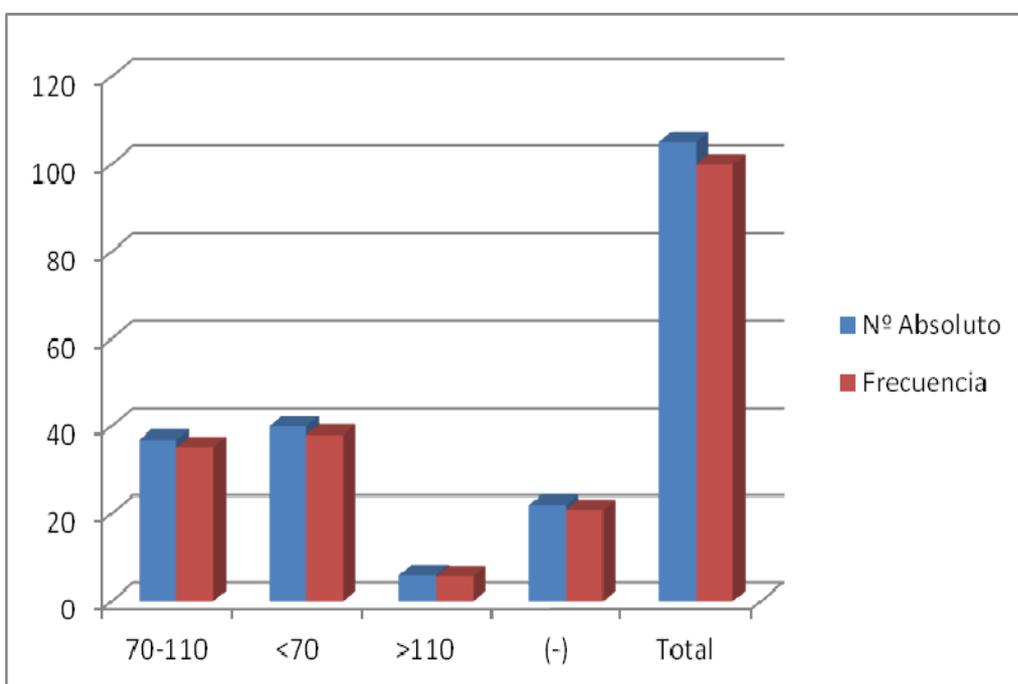
Tabla 13.10.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de glucosa en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Glucemia basal</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
70-110	37	35,24
<70	40	38,10
>110	6	5,71
(?)	22	20,95
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (70,0-110) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.10.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de glucemia en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (70,0-110) mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.10.1. muestra que un 35% de recién nacidos tienen valores normales de glucosa en sangre en el momento que se toma la muestra, un 40% tienen valores menores (<70 mg/dL) y solo un 6% tiene valores superiores a los parámetros normales (>110 mg/dL). El resto de recién nacidos se desconoce los niveles de glucosa en sangre en el momento de toma de la muestra.

13.11. HIERRO.-

Tabla 13.11.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de hierro en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

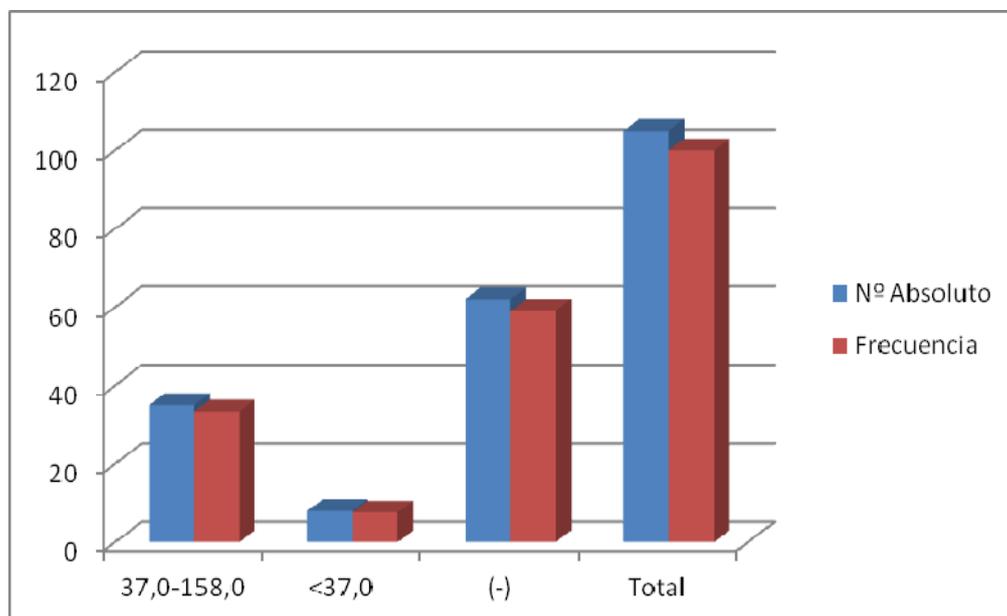
<i>Hierro</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
37,0-158,0	35	33,33
$<37,0$	8	7,62
(?)	62	59,05
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (37,0-158,0) $\mu\text{g/dL}$.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.11.1. muestra que un 33% de recién nacidos tienen niveles de hierro normales en sangre (37,0-158,0 $\mu\text{g/dL}$) en el momento de toma de la muestra, solo un 7% tienen valores inferiores ($<37,0$ $\mu\text{g/dL}$) y el resto se desconoce.

Gráfico 13.11.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de hierro en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (37,0-158,0) µg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

13.12. POTASIO.-

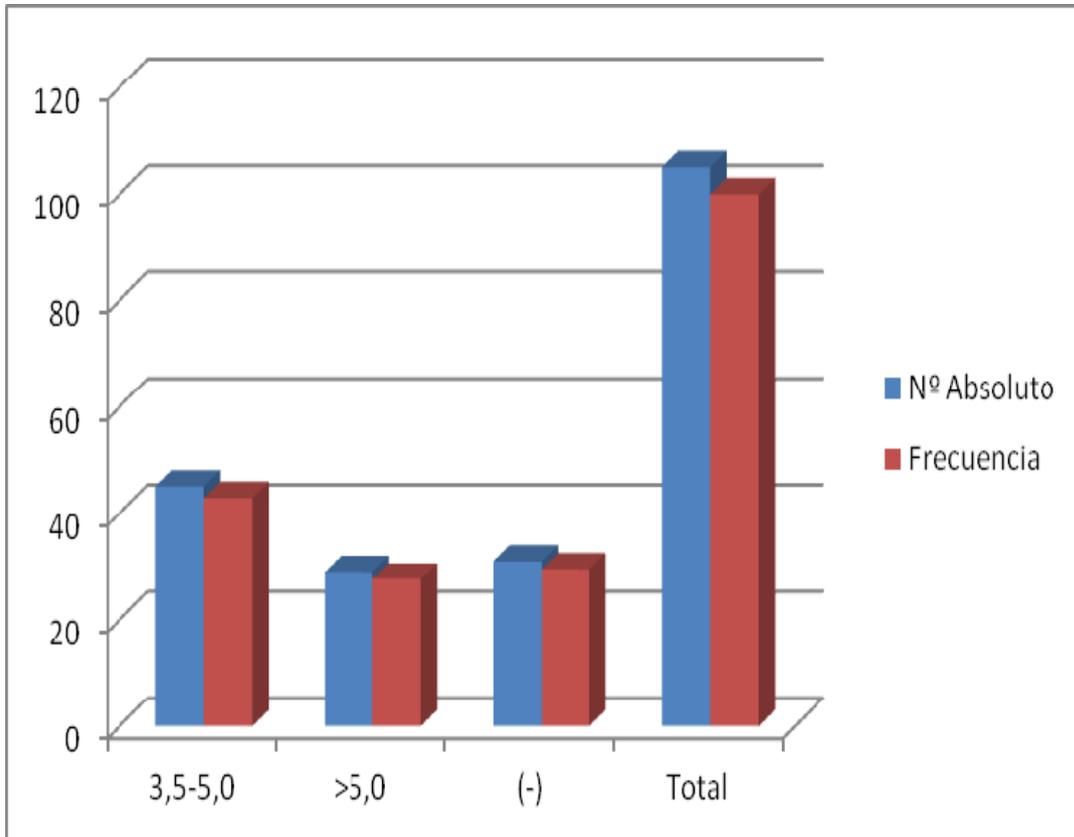
Tabla 13.12.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de potasio en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Potasio</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
3,5-5,0	45	42,86
>5,0	29	27,62
(?)	31	29,52
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (3,4-5,0) mmol/L.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.12.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de potasio en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (3,4-5,0) mmol/L.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.12.1. muestra que 45 recién nacidos tienen niveles de potasio normales en sangre (3,4-5,0 mmol/L) en el momento de toma de la muestra, 29 recién nacidos tienen niveles de potasio en sangre superiores (>5,0mmol/L) y para el resto de la muestra se desconocen los niveles de potasio en sangre en el momento de toma de la muestra.

13.13. PROTEINA TOTAL.-

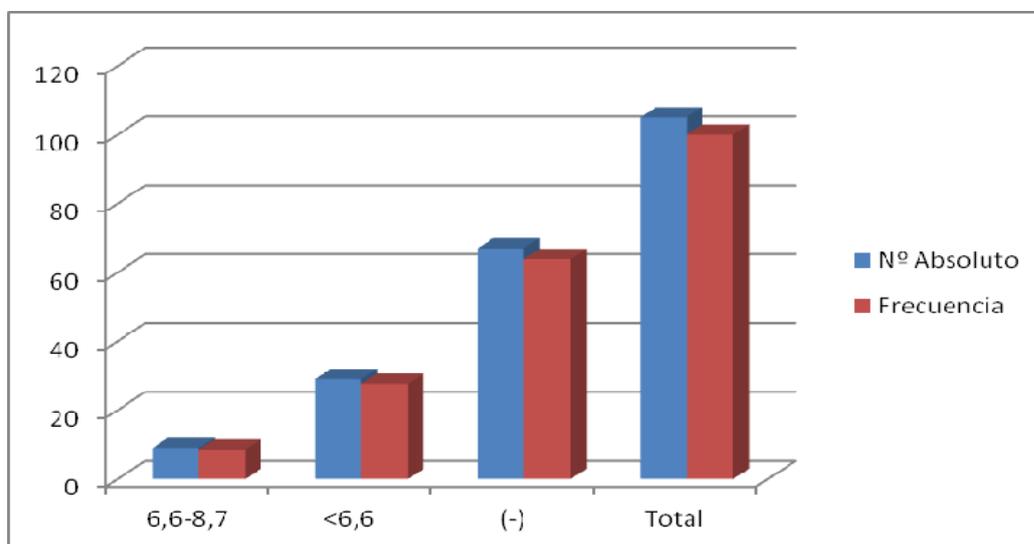
Tabla 13.13.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de proteína total en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Proteína total</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
6,6-8,7	9	8,57
<6,6	29	27,62
(?)	67	63,81
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (6,6-8,7) g/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.13.1: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de proteína total en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (6,6-8,7) g/dL.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.13.1. muestra que solo 9 recién nacidos tienen valores de proteína total en sangre normales (6,6-8,7g/dL) en el momento de toma de la muestra.

13.14. SODIO.-

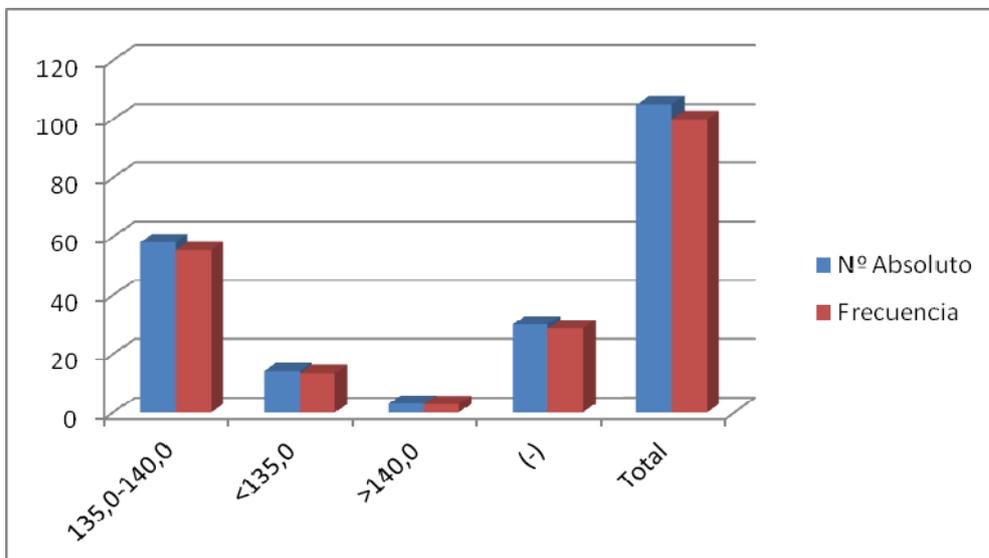
Tabla 13.14.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de sodio en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Sodio</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
135,0-140,0	58	55,24
<135,0	14	13,33
>140,0	3	2,86
(?)	30	28,57
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre (135,0-140,0) mmol/L.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfico 13.14.1: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de sodio en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre (135,0-140,0) mmol/L.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.14.1. muestra un elevado número (58) de recién nacidos que tienen niveles de sodio en sangre normales (135,0-140,0mmol/L) en el momento que se toma de la muestra.

13.15. UREA.-

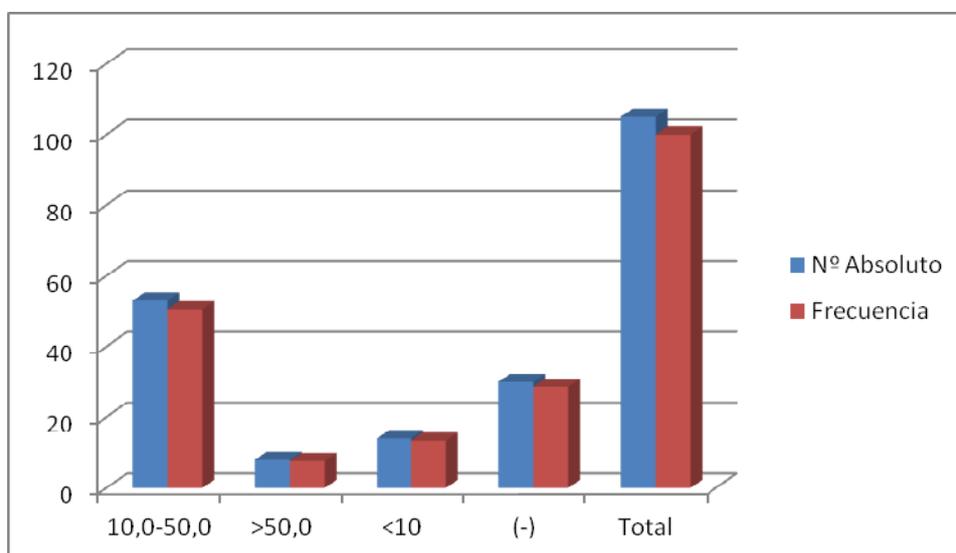
Tabla 13.15.1.: Distribución de la muestra según valores obtenidos de urea en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.

<i>Urea</i>	<i>Nº Absoluto</i>	<i>Frecuencia</i>
10,0-50,0	53	50,48
>50,0	8	7,62
<10	14	13,33
(?)	30	28,57
Total	105	100,00

Parámetros normales en sangre(10,0-50,0)mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

Gráfica 13.15.1.: Distribución gráfica de la muestra según valores obtenidos de urea en sangre, representado con valores absolutos y frecuencia.



Parámetros normales en sangre(10,0-50,0)mg/dL.

(?): Se desconocen los valores.

La tabla 13.15.1. muestra un elevado número (53) de recién nacidos que tienen niveles de urea en sangre normales (10,0-50,0mg/dL) en el momento de toma de la muestra.

14.-ENSAYO COMET EN CÉLULAS DE LA MUCOSA ORAL Y LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

Nuestros resultados muestran que el protocolo de ensayo del cometa para las células epiteliales orales de los recién nacidos desarrollado en nuestro laboratorio origina una buena densidad de cometas válidos. Así queda reflejado en las fotografías que se muestran a continuación del ensayo comet en células de mucosa oral (imagen 14.1) y ensayo comet en linfocitos de sangre periférica (imagen 14.2).

Imagen 14.1: Imágenes que muestra los cometas válidos en células de la mucosa oral (400x magnificado).

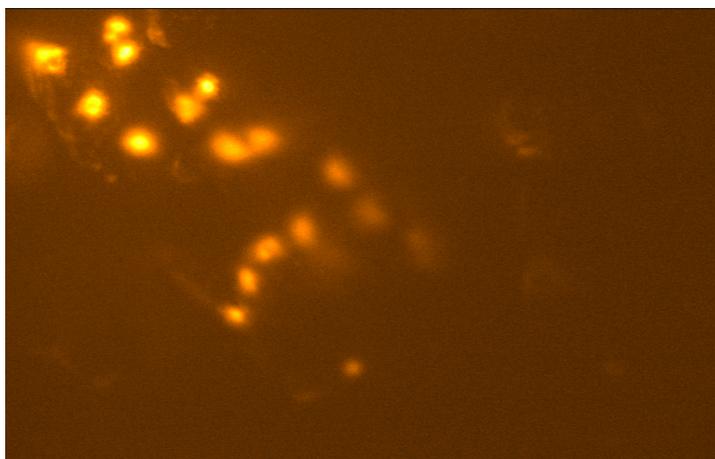
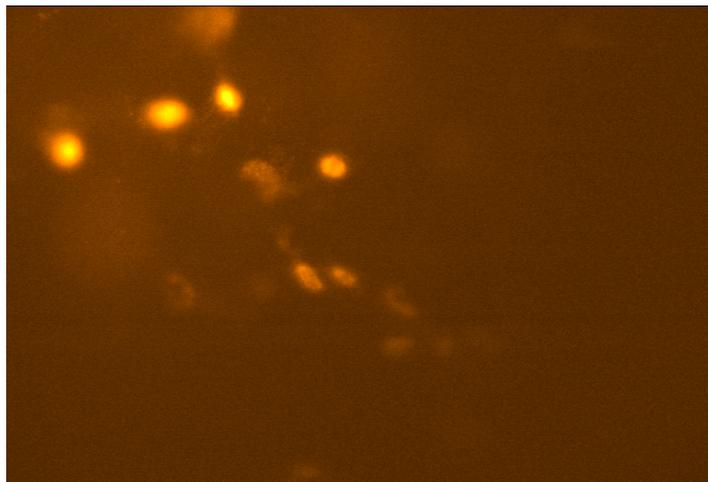
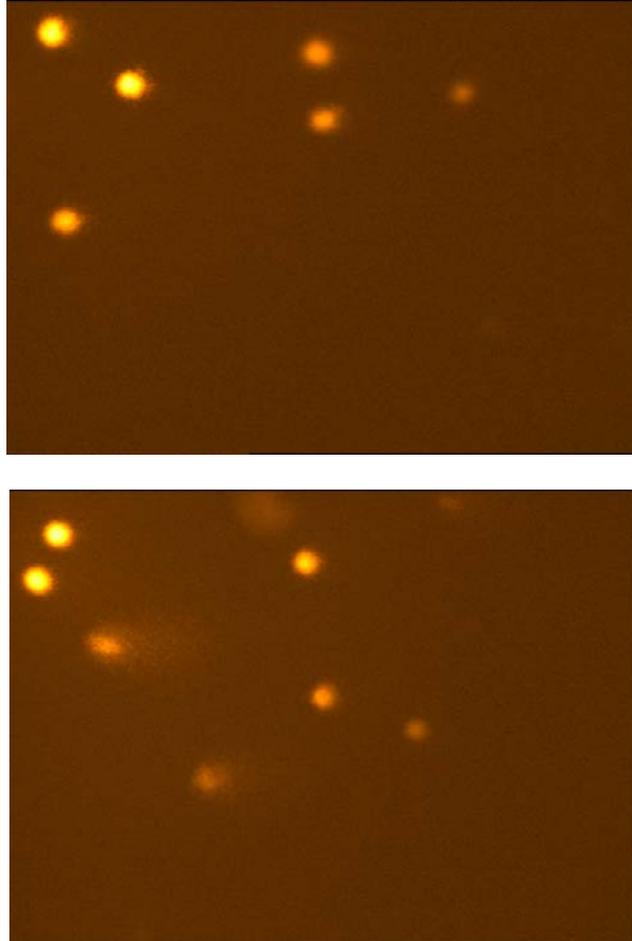


Imagen 14.2: Imágenes que muestran los cometas válidos en linfocitos de sangre periférica (400x magnificada).



En los resultados obtenidos también se muestran mayores niveles de daño en el ADN de células bucales, probablemente como consecuencia de la lisis celular fuerte y la exposición de estas células a factores externos.

No obstante, niveles similares de los parámetros más notables del ensayo de cometa, se encontraron sin diferencias estadísticamente significativas entre las células epiteliales orales y linfocitos (figuras A y B).

Figura A: representación gráfica del % de DNA en la cola del cometa en las células epiteliales orales y linfocitos de sangre periférica. Los valores se expresan como media \pm sem.

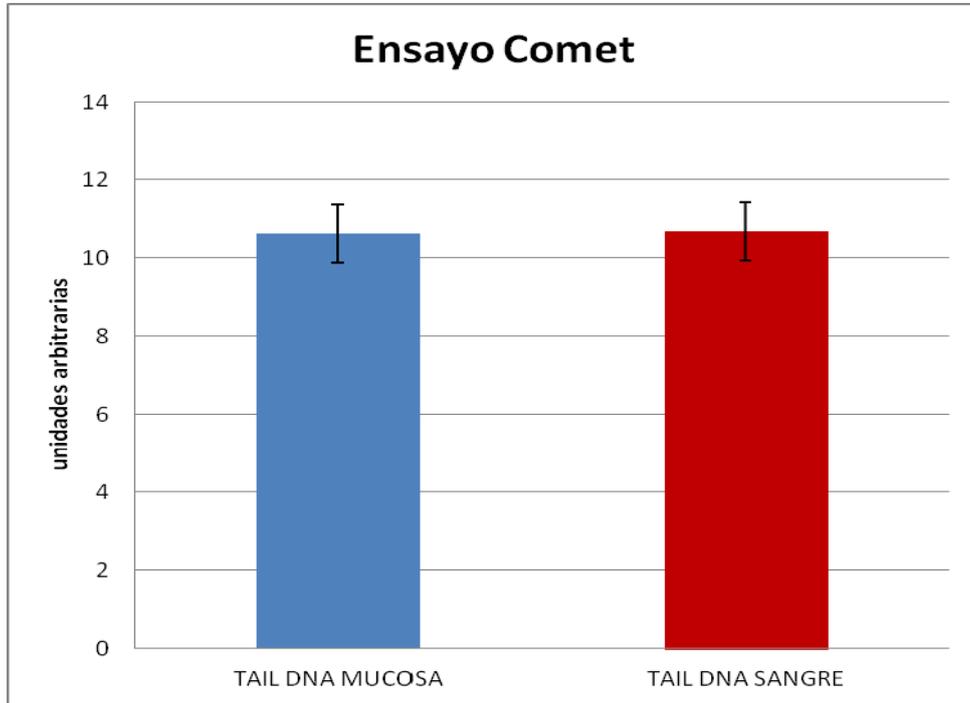
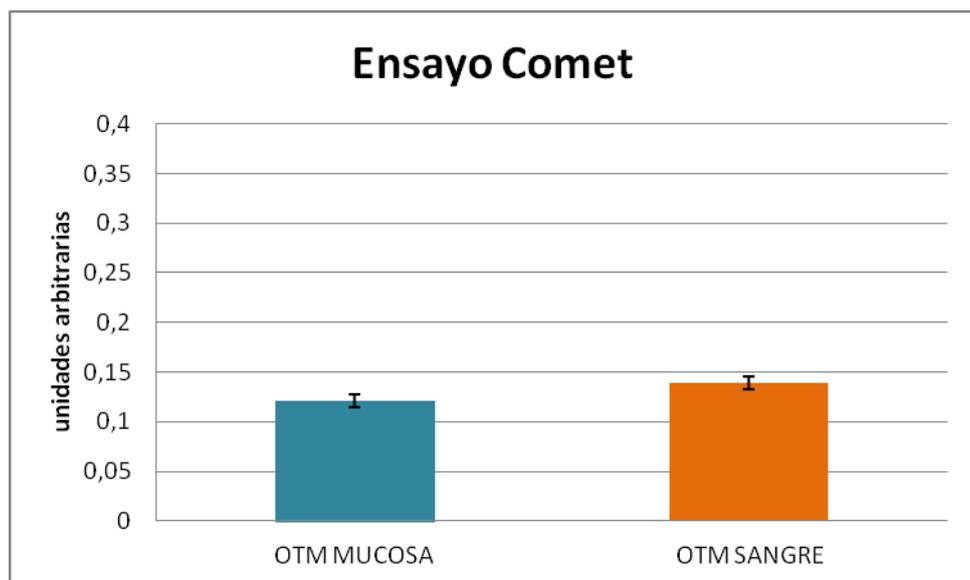


Figura B: representación gráfica del Olive Tail Moment del cometa en las células epiteliales orales y linfocitos de sangre periférica. Los valores se expresan como media \pm sem.



Los resultados encontrados mediante prueba de T de *student* para muestras relacionadas y sin asumir varianzas iguales no detectan diferencias entre células de la mucosa oral y linfocitos de sangre periférica estadísticamente significativa.

Tabla de resultados 14.1: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según las variables cuantitativas porcentaje de ADN en cola y el OTM para ambos tipos de muestra expresados con valores medios y el error estándar de la muestra.

Estadísticos de muestras relacionadas

	Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1 TAILDNA	10,6097	96	4,13460	,42199
TAILDNA	10,6887	96	7,29102	,74414
Par 2 OTMM	,1205	94	,06158	,00635
OTMS	,1391	94	,13410	,01383

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	. (bilate
	Media	Desviación típ.	Media	% Intervalo de confianza para diferencia				
				Inferior	Superior			
Par TAILDNA	7902	38692	85599	7837	2033	-,092	95	,927
Par OTMM - O	1856	14566	01502	4839	1128	1,235	93	,220

De la misma manera, los estudios de correlación también han mostrado que no hay ninguna diferencia significativa para los parámetros estudiados en esta investigación (tabla 14.2).

Tabla de resultados 14.2: correlación encontrada entre los parámetros (% de DNA en cola y OTM) mediante el ensayo comet en células de mucosa oral y linfocitos de sangre periférica.

Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	Sig.
Par 1 TAILDNAM y TAILDN	96	-,001	,989
Par 2 OTMM y OTMS	94	,034	,746

15.-COMPARACIÓN DEL ENSAYO COMET EN DIFERENTES TRATAMIENTOS.

15.1. OXIGENOTERAPIA.-

La tabla de resultados 15.1.1 muestra los resultados del análisis estadístico realizado en los recién nacidos en función de si habían recibido oxigenoterapia o no, determinando la relación entre el tratamiento con oxígeno y el daño celular comparando los resultados del ensayo comet en ambos tipos de células (mucosa oral y linfocitos).

Los resultados encontrados mediante prueba de T de *student* para evaluar la diferencia entre grupos no detectan diferencias estadísticamente significativas entre el daño en el ADN cromosómico y el tratamiento o no con oxígeno.

Tabla de resultados 15.1.1: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según las variables cuantitativas porcentaje de ADN en cola y el OTM para ambos tipos de muestra expresados con valores medios y el error estándar de la muestra.

Estadísticos de grupo

	oxigenoterapia	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
cometsangre	oxigenoterapia	41	10,6731	4,09037	,63881
	normal	23	10,6643	3,62533	,75593
otmsangre	oxigenoterapia	41	,1230	,05974	,00933
	normal	23	,1232	,04873	,01016
cometmucosa	oxigenoterapia	45	9,6697	7,80259	1,16314
	normal	25	10,8710	5,56443	1,11289
otmmucosa	oxigenoterapia	45	,1220	,14077	,02098
	normal	25	,1414	,08478	,01696

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
cometsangre	Se han asumido varianzas iguales	,368	,546	,009	62	,993	,00879	1,02426	-2,03867	2,05626
	No se han asumido varianzas iguales			,009	50,482	,993	,00879	,98970	-1,97861	1,99620
otmsangre	Se han asumido varianzas iguales	,683	,412	-,012	62	,990	-,00018	,01461	-,02938	,02903
	No se han asumido varianzas iguales			-,013	53,726	,990	-,00018	,01379	-,02784	,02748
cometmucosa	Se han asumido varianzas iguales	,000	,997	-,679	68	,499	-1,20133	1,76949	-4,73229	2,32964
	No se han asumido varianzas iguales			-,746	63,646	,458	-1,20133	1,60979	-4,41759	2,01494
otmmucosa	Se han asumido varianzas iguales	,028	,867	-,627	68	,533	-,01938	,03091	-,08107	,04230
	No se han asumido varianzas iguales			-,718	67,478	,475	-,01938	,02698	-,07323	,03446

15.2. ANTIBIOTERAPIA.-

La tabla de resultados 15.2.1 muestra los resultados del análisis estadístico realizado en los recién nacidos en función de si habían recibido antibioterapia o no, determinando la relación entre el tratamiento con antibióticos y el daño celular comparando los resultados del ensayo comet en ambos tipos de células (mucosa oral y linfocitos).

Los resultados encontrados mediante prueba de T de *student* para evaluar la diferencia entre grupos no detectan diferencias estadísticamente significativas entre el daño en el ADN cromosómico y el tratamiento o no de antibióticos.

Tabla de resultados 15.1.1: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según las variables cuantitativas porcentaje de ADN en cola y el OTM para ambos tipos de muestra expresados con valores medios y el error estándar de la muestra.

Estadísticos de grupo

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
cometsangre antibioterapi	41	11,1009	4,07214	,63596
normal	16	9,1632	3,30905	,82726
otmsangre antibioterapi	41	,1278	,05855	,00914
normal	16	,1114	,05327	,01332
cometmucos: antibioterapi	45	10,9746	9,73501	1,45121
normal	18	9,7582	3,47218	,81840
otmmucosa antibioterapi	45	,1478	,18095	,02697
normal	18	,1216	,06698	,01579

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
cometsang Se han asumido varianzas iguales	1,023	,316	1,695	55	,096	1,93769	1,14340	-,35374	4,22912
			No se han asumido varianzas iguales	1,857	33,572	,072	1,93769	1,04346	-,18387
otmsangre Se han asumido varianzas iguales	,213	,647	,973	55	,335	,01639	,01685	-,01737	,05016
			No se han asumido varianzas iguales	1,015	29,978	,318	,01639	,01615	-,01660
cometmucc Se han asumido varianzas iguales	3,040	,086	,515	61	,608	1,21634	2,36181	3,50639	5,93907
			No se han asumido varianzas iguales	,730	60,579	,468	1,21634	1,66607	2,11564
otmmucosa Se han asumido varianzas iguales	2,638	,109	,596	61	,553	,02622	,04398	-,06172	,11416
			No se han asumido varianzas iguales	,839	60,832	,405	,02622	,03125	-,03628

15.3. FOTOTERAPIA.-

La tabla de resultados 15.3.1 muestra los resultados del análisis estadístico realizado en los recién nacidos en función de si habían recibido fototerapia o no, determinando la relación entre el tratamiento con fototerapia y el daño celular comparando los resultados del ensayo comet en ambos tipos de células (mucosa oral y linfocitos).

Los resultados encontrados mediante prueba de T de *student* para evaluar la diferencia entre grupos no detectan diferencias estadísticamente significativas entre el daño en el ADN cromosómico y el tratamiento o no con fototerapia.

Tabla de resultados 15.3.1: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según las variables cuantitativas porcentaje de ADN en cola y el OTM para ambos tipos de muestra expresados con valores medios y el error estándar de la muestra.

Estadísticos de grupo

		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
cometsangre	fototerapia	22	10,1957	3,96168	,84463
	normal	11	10,8749	3,57953	1,07927
otmsangre	fototerapia	22	,1144	,04897	,01044
	normal	11	,1243	,05657	,01706
cometmucosa	fototerapia	23	11,4531	8,04950	1,67844
	normal	12	10,3401	11,07307	3,19652
otmmucosa	fototerapia	23	,1496	,12841	,02677
	normal	12	,1431	,21384	,06173

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
cometsangre	Se han asumido varianzas iguales	,893	,352	-,479	31	,636	-,67919	1,41896	3,57318	2,21480
	No se han asumido varianzas iguales			-,496	22,060	,625	-,67919	1,37048	3,52095	2,16257
otmsangre	Se han asumido varianzas iguales	,286	,596	-,520	31	,607	-,00989	,01903	-,04871	,02893
	No se han asumido varianzas iguales			-,495	17,711	,627	-,00989	,02000	-,05196	,03217
cometmucosa	Se han asumido varianzas iguales	,033	,858	,341	33	,735	1,11298	3,26507	5,52986	7,75582
	No se han asumido varianzas iguales			,308	17,246	,762	1,11298	3,61039	5,49599	8,72195
otmmucosa	Se han asumido varianzas iguales	,468	,499	,112	33	,911	,00647	,05768	-,11088	,12381
	No se han asumido varianzas iguales			,096	15,258	,925	,00647	,06729	-,13674	,14967

16.-ENSAYO COMET EN FUNCIÓN DEL TIPO DE NUTRICIÓN RECIBIDA.

La tabla de resultados 16.1 muestra los resultados del análisis estadístico realizado en los recién nacidos en función de si habían recibido leche materna o leche artificial, determinando la relación entre el tipo de nutrición y el daño celular comparando los resultados del ensayo comet en ambos tipos de células (mucosa oral y linfocitos).

Los resultados encontrados mediante prueba de T de *student* para evaluar la diferencia entre grupos no detectan diferencias estadísticamente significativas entre el daño en el ADN cromosómico y la alimentación con leche materna o fórmula adaptada para lactantes.

Tabla de resultados 16.1: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según las variables cuantitativas porcentaje de ADN en cola y el OTM para ambos tipos de muestra expresados con valores medios y el error estándar de la muestra.

Estadísticos de grupo

	lechematerna	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
cometsangre	leche materna	35	10,1992	4,52227	,76440
	formula infantil	17	10,1369	4,04436	,98090
otmsangre	leche materna	35	,1166	,06283	,01062
	formula infantil	17	,1215	,06285	,01524
cometmucosa	leche materna	37	9,4372	4,22378	,69439
	formula infantil	19	12,4657	11,12594	2,55247
otmmucosa	leche materna	37	,1151	,06703	,01102
	formula infantil	19	,1777	,21010	,04820

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
cometsangre	Se han asumido varianzas iguales	2,317	,134	,048	50	,962	,06232	1,29337	-2,53549	2,66014
	No se han asumido varianzas iguales			,050	35,221	,960	,06232	1,24358	-2,46170	2,58635
otmsangre	Se han asumido varianzas iguales	,401	,529	-,266	50	,791	-,00494	,01858	-,04225	,03237
	No se han asumido varianzas iguales			-,266	31,779	,792	-,00494	,01858	-,04279	,03291
cometmucosa	Se han asumido varianzas iguales	4,078	,048	-1,472	54	,147	-3,02852	2,05774	-7,15405	1,09701
	No se han asumido varianzas iguales			-1,145	20,706	,265	-3,02852	2,64523	-8,53433	2,47730
otmmucosa	Se han asumido varianzas iguales	6,113	,017	-1,666	54	,101	-,06258	,03756	-,13788	,01272
	No se han asumido varianzas iguales			-1,266	19,903	,220	-,06258	,04944	-,16575	,04059



DISCUSIÓN Y
CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

En el presente estudio el objetivo principal a investigar es crear un modelo de ensayo comet en células de la mucosa bucal (comparado con los linfocitos de sangre periférica) para valorar y cuantificar el daño en el ADN con una mínima invasión en neonatos.

El ensayo comet ha sido un método estándar para evaluar el daño a nivel de DNA en la última década, con aplicaciones en epidemiología molecular y biomonitorización humana, comprobación de genotoxicidad, ecogenotoxicidad, así como en la investigación básica de daño y reparación del ADN (Collins, *et al.*, 2004).

El ensayo cometa es el método de elección para medir el daño del ADN, en las células humanas, como los linfocitos obtenidos en el curso de los estudios basados en la población de la exposición ambiental y ocupacional a los diferentes agentes genotóxicos, como la radiación, productos químicos y el estrés oxidativo. Se destaca por su versatilidad y la amplitud de sus posibles aplicaciones. En términos de simplicidad, costo, una pequeña cantidad de material requerido, sensibilidad y fiabilidad, la prueba del cometa en sus diversas modificaciones tiene pocos competidores serios.

Estandarizado y validado, la prueba del cometa puede proporcionar información muy valiosa en las áreas de identificación de peligros y evaluación de los riesgos de la exposición ambiental y ocupacional, las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (por ejemplo, diabetes y enfermedades cardiovasculares), la nutrición, el control de la

eficacia del tratamiento médico y la investigación de la variación individual en la respuesta al daño del ADN que puede reflejar las influencias genéticas o ambientales. La información obtenida podría llevar a asesoramiento individual sobre los cambios de estilo de vida para promover la salud y, especialmente, sobre los riesgos relativos de exposición a la contaminación del medio ambiente genotóxico. (Dusinska M, Collins A R, 2008).

El ensayo cometa no es la única manera de medir el daño oxidativo del ADN, pero es uno de los más sensible y preciso, siendo relativamente libre de artefactos. Se trata de una herramienta valiosa en la supervisión de la población, por ejemplo en la evaluación del papel del estrés oxidativo en la enfermedad humana, y en el seguimiento de los efectos de los antioxidantes dietéticos. Puede proporcionar información importante sobre las interacciones entre la variación genética y los factores ambientales en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. (Collins A R, 2009).

Las células más comúnmente usadas en el ensayo cometa son los linfocitos, existe la necesidad de encontrar una célula humana alternativa que pueda ser recogida con una mínima invasión. Las células de la mucosa bucal son las células fácilmente accesibles para las células tipo del tejido epitelial humano y han sido usadas para la valoración citogenética de individuos expuestos a mutágenos medioambientales (Surrallé's, *et al.*, 1997; Karahalil, *et al.*, 1999; Salama, *et al.*, 1999; Lucero, *et al.*, 2000). Hay estudios donde se ha realizado el ensayo de electroforesis en gel de células individuales derivadas de la mucosa bucal, (Rojas, *et al.*, 1996; Valverde, *et al.*, 1997; Eren, *et al.*, 2002; Dhillon, *et al.*, 2004), la baja viabilidad celular, la contaminación de bacterias saprofitas y sus

membranas celulares especializadas, que hacen difícil la lisis de las células, contribuyen a hacer de las células de la mucosa bucal una célula más complicada de analizar en comparación con los leucocitos.

Siguiendo el protocolo de Östling y Johanson (Östling y Johanson, *et al.*, 1984) las células de la mucosa bucal mostraban un daño masivo debido al elevado pH usado, pero con un pH bajo eran extremadamente resistentes a la lisis, un paso esencial en el ensayo comet. El éxito de la lisis fue alcanzado usando una lisis mixta (Szeto Y T, *et al.*, 2005).

También hay un estudio donde se investiga si las células de la mucosa bucal están disponibles para la electroforesis en gel de células unicelulares, y los resultados indicaron que sólo unas pocas células de la muestra produjeron cometas (Pinhal, *et al.*, 2006).

Recientemente otros estudios sugieren que la recogida y almacenamiento de muestras bucales, son factores críticos para la evaluación de daños en el ADN. Además, los leucocitos parecen ser una fuente más fiable de tejido humano para evaluar el daño del ADN (Muñiz J F, *et al.*, 2009).

Nuestros resultados muestran que el protocolo de ensayo del cometa para las células epiteliales orales de los recién nacidos desarrollado en nuestro laboratorio origina una buena densidad de cometas válidos (Imagen 14.1) de resultados.

En los resultados obtenidos también se muestran mayores niveles de daño en el ADN de células bucales, probablemente como consecuencia de la lisis celular fuerte y la exposición de estas células a factores externos.

No obstante, niveles similares de los parámetros más notables del ensayo de cometa, se encontraron sin diferencias estadísticamente significativas entre las células epiteliales orales y linfocitos (figuras A y B).

Figura A: representación gráfica del % de DNA en la cola del cometa en las células epiteliales orales y linfocitos de sangre periférica. Los valores se expresan como media \pm sem.

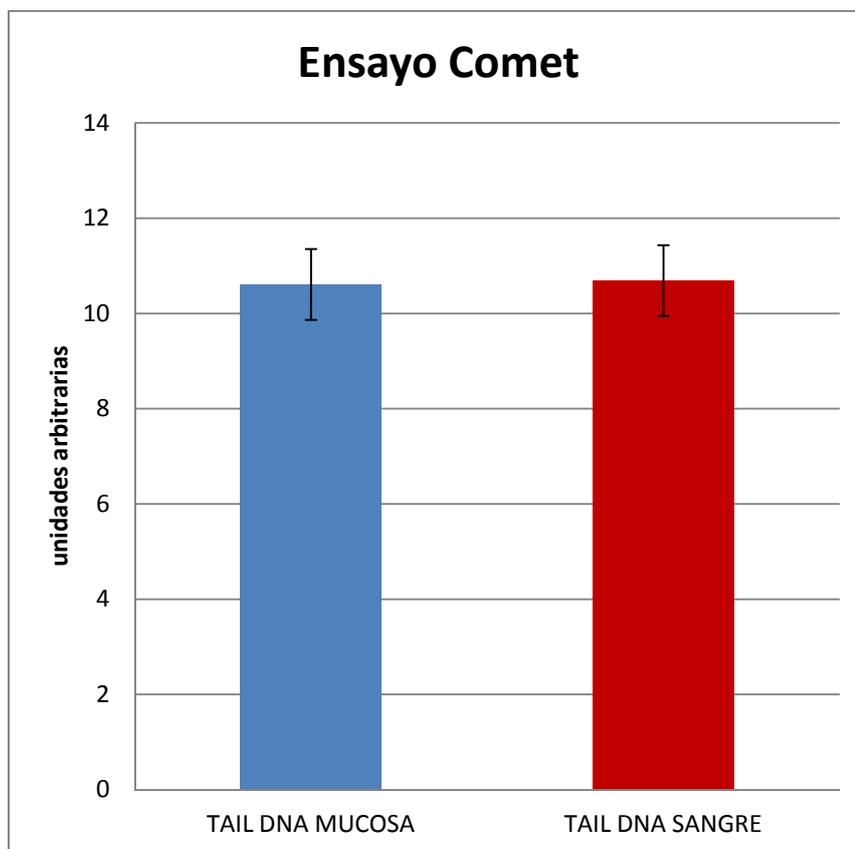
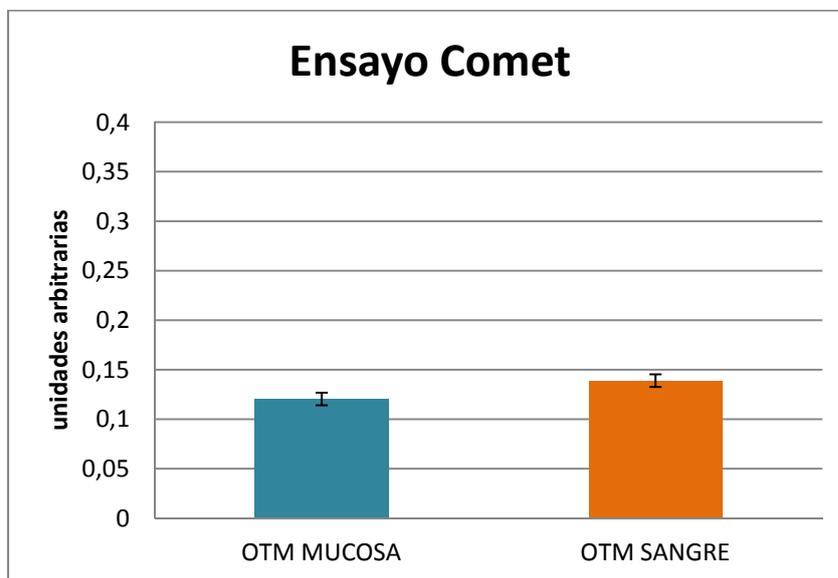


Figura B: representación gráfica del Olive Tail Moment del cometa en las células epiteliales orales y linfocitos de sangre periférica. Los valores se expresan como media \pm sem.



De la misma manera, los estudios de correlación también han mostrado que no hay ninguna diferencia significativa para los parámetros estudiados en esta investigación (tabla 1).

Tabla 1: Correlación encontrada entre los parámetros (% de DNA en cola y OTM) mediante el ensayo comet en células de mucosa oral y linfocitos de sangre periférica.

	N	Correlación	Sig.
Par 1 TAILDNAM y TAILDNAS	96	-,001	,989
Par 2 OTMM y OTMS	94	,034	,746

En general, este hecho nos lleva a pensar que las células epiteliales orales son una buena alternativa y mínimamente invasiva para evaluar la genotoxicidad sistémica en los humanos a través del ensayo cometa alcalino.

RELACIÓN ENTRE EL ESTADO DE SALUD Y EL DAÑO EN EL ADN

Es sabido, por estudios previos realizados, que un desbalance en el sistema oxidantes - antioxidantes de cada individuo, que genere un aumento de los agentes lesivos, agentes oxidantes, o que disminuya los agentes protectores, agentes antioxidantes, produce un daño celular a nivel del ADN.

Son múltiples y muy variados los agentes con capacidad para producir esta lesión en el ADN, denominados genotóxicos (Blasiak, *et al.*, 2004). Por ejemplo las radiaciones ionizantes (Garaj-Vrhovac, *et al.*, 2003), algunos fármacos (Dundaroz, *et al.*, 2002), la fototerapia en niños hiperbilirrubinemicos (Tatlí M M, *et al.*, 2.008), la oxigenoterapia (Vento M, *et al.*, 2009).

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados que les confieren gran reactividad química, esto les conducirá a interactuar rápidamente con cualquier molécula biológica con la que entren en contacto. Por su avidez para aceptar electrones de las moléculas diana, los radicales libres pueden modificar la estructura y/o la función de éstas, pudiendo actuar así sobre componentes estructurales como la membrana plasmática y sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos (Halliwell y Chirico, *et al.*, 1993; Cheeseman y Slater, *et al.*, 1993; Liu y cols, *et al.*, 2002).

Sin embargo, en nuestro organismo existe un sistema de defensa antioxidante para evitar el daño que puede llegar a producir en él un aumento de los radicales libres. Debiendo existir un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y el de producción de radicales, que se conoce como balance

oxidativo, que al inclinarse hacia la producción de radicales da lugar a lo denominado estrés oxidativo (Halliwell, *et al.*, 1992; Halliwell y Chirico, *et al.*, 1993; Schon, *et al.*, 1996; Lee, *et al.*, 1997; Sastre, *et al.*, 1999; Lenaz, 1998; De la fuente, *et al.*, 2002; Hiroshi y Kazuaki, *et al.*, 2006).

En la edad pediátrica cada vez son más los hallazgos significativos en los que se implica al estrés oxidativo como daño en mayor o menor grado. De hecho, ya el recién nacido está expuesto a un mayor grado de estrés oxidativo, debido a su inmadurez orgánica y al cambio brusco de concentración de oxígeno, de un medio como el útero, pobre en dicho gas en comparación con el medio ambiente (Molina A, *et al.*, 2002). No obstante, los neonatos a término cuentan con mecanismos de protección más adecuados frente a los efectos de los radicales oxigenados libres que los adultos o los prematuros, debido a un mayor nivel, fundamentalmente a nivel plasmático, de antioxidantes y un menor contenido en lípidos oxidables. (Wiedemann M, *et al.*, 2003).

Pese a lo que cabría esperar, que es un claro aumento lineal y progresivo del daño celular conforme avanza la edad del paciente, hecho ampliamente estudiado y confirmado con las teorías del envejecimiento, en la edad pediátrica, no existe una clara progresión lineal reflejando que a mayor edad, mayor daño celular, si no que existe una edad más sensible al daño celular que es la primera infancia, tras la cual el daño se estabiliza (hacia los 3 años) para luego ir aumentando progresivamente. (Moreno Galarraga L, *et al.*, 2007).

A su vez, los recién nacidos prematuros, deben soportar un grado de estrés oxidativo mayor que los nacidos a término, y con un sistema antioxidante inmaduro aún (Buonocore G, *et al.*,

2002). Esta mayor exposición del recién nacido prematuro a la acción de radicales libres derivados del oxígeno (Saugstad O D, *et al.*, 2001) motiva una participación de éstos en procesos como la broncodisplasia pulmonar, la retinopatía de la prematuridad, el daño hepatocelular o la fibroplasia retroventral (Weinberger B, *et al.*, 2002; Lackmann G M, *et al.*, 1996).

La maduración prenatal de los sistemas antioxidantes no es simultánea en todos los órganos y sistemas, siendo más precoz en corazón, seguido pulmón y por último riñón, lo que explica la mayor vulnerabilidad de éste último al estrés oxidativo (Hayashibe H, *et al.*, 1990). Lo cual unido a una mayor susceptibilidad al daño producido por radicales libres, predispone a los pacientes prematuros a una mayor incidencia de patologías.

Existe una clara relación entre enfermedad y afectación del material genético y esta relación que existe es bidireccional, entendiéndose por esto que hay enfermedades que ocurren por una alteración primaria en el ADN que es lo que condiciona la enfermedad, y que hay otras enfermedades que son ellas mismas las que provocan un daño secundario en el ADN.

ENFERMEDAD <-----> DAÑO ADN

Enfermedades como por ejemplo la diabetes o el asma, producen un aumento del estrés oxidativo celular que produce a su vez un aumento del daño genético.

Existen estudios que mediante el ensayo comet demuestran este aumento del daño en el ADN en pacientes adultos con diabetes mellitus tipo I (Migliore, *et al.*, 2002; Aslan, *et al.*, 2007), con asma, o con síndrome de Down (Maluf, *et al.*,

2001), entre otras alteraciones, pero existen muy pocos estudios realizados en pacientes pediátricos.

Es conocido también, que los procesos inflamatorios crónicos ocasionan acumulación de radicales libres y aumentan consiguientemente el estrés celular (Forcet, *et al.*, 2002) Recientemente se ha estudiado también el aumento del daño celular en enfermedades cardíacas, infarto, angina, y síndrome X (Gur, *et al.*, 2006) y en enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide (Altindag, *et al.*, 2007).

En todas estas enfermedades la enfermedad es la que aparece primero en el tiempo y al alterar la balanza del daño oxidativo, genera un daño secundario en el ADN.

Además existe un amplio grupo de enfermedades en las que una mutación inicial en el individuo, bien sea en la línea germinal o a nivel somático produce una enfermedad.

Algunos ejemplos son: la anemia falciforme, la alcaptonuria, la encefalopatía mitocondrial, la enfermedad de Fabry, el síndrome X-frágil, la Corea de Huntington y muchas más enfermedades hereditarias generadas por una mutación en el material genético que genera algún tipo de proteína anómala, que es disfuncionante y causa una enfermedad.

Es importante destacar de entre este tipo de patologías varias enfermedades genéticas humanas, que se heredan como autosómicas recesivas y cuyas mutaciones afectan específicamente a las proteínas encargadas de la reparación del ADN.

En todas ellas, evidentemente, el ADN es más susceptible a mutágenos y por tanto los pacientes tienen un llamativo

aumento del daño celular y desarrollan con gran frecuencia distintos tipos de neoplasias malignas.

Son enfermedades de este tipo las siguientes: Xeroderma pigmentosum, Ataxia telangiectasia, Síndrome de Bloom, Síndrome de Cockayne y la anemia de Fanconi.

Sin embargo existen muy pocos estudios realizados en pacientes pediátricos que demuestren la existencia de una relación entre enfermedades en la infancia y daño en el ADN (Dundaroz, *et al.*, 2003; González, *et al.*, 2002).

En base a todo lo expuesto podemos ver la necesidad e importancia de encontrar una célula alternativa (célula de la mucosa oral) para la determinación de genotoxicidad humana mediante la realización del ensayo comet.

En nuestro estudio, no se han detectado diferencias, estadísticamente significativa, entre el ensayo comet realizado en mucosa y sangre, tanto en la muestra experimental completa como en la muestra dividida en grupos.

Por otra parte cuando realizamos el ensayo comet en distintos grupos según si han recibido o no han recibido: reanimación, oxigenoterapia, fototerapia y antibioterapia, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el daño en el ADN cromosómico medido mediante el comet test para ninguno de los grupos investigados en nuestro estudio como se puede observar en las tablas de resultados de los diferentes grupos expuestas en resultados.

Estos resultados no concuerdan con las evidencias previas, seguramente debido a la disminución del tamaño muestral y la heterogeneidad de la muestra. Por lo que podemos concluir que no es posible establecer con los datos de nuestro estudio la

verdadera relación entre los parámetros analizados y su grado de genotoxicidad.

RELACIÓN ENTRE EL ESTADO NUTRICIONAL Y EL DAÑO EN EL ADN

La evidencia experimental producida en los últimos años de investigación indica que la nutrición juega un papel cada vez más importante en el estado de salud. Surgen las ideas de nutrición como prevención de determinadas enfermedades, ya que la dieta puede ejercer una clara influencia en la balanza oxidativa, según la cantidad de agentes antioxidantes que incluyamos en la alimentación (Martínez Velasco, 2003).

Entre dichos antioxidantes caben destacar la vitamina E, C, el ácido fólico, el coenzima Q, extractos ricos en flavonoides y los polifenoles (Halliwell y Gutteridge, 1999; Sastre, *et al.*, 2000). Es también importante y conocido el papel de la grasa ingerida en diversas enfermedades como las de origen cardiovascular, estimándose que más de un tercio de las muertes por enfermedades cardiovasculares en gente menor de 65 años es atribuible a la dieta (Ferro Luzzi y James, 1997). Los lípidos que componen las membranas celulares condicionan las propiedades físico-químicas y su susceptibilidad al estrés oxidativo, y estos lípidos dependen de la ingesta de grasas (Ibáñez Quiles, 2003).

Trabajos previos en la literatura apoyan la existencia de una relación entre la dieta y la composición de nutrientes, sobre la estabilidad del ADN cromosómico (Szeto y Benzoe, 2002; Collins, *et al.*, 2001). También varios estudios epidemiológicos

muestran los efectos preventivos de los antioxidantes en diversas enfermedades (Moller y Loft, 2002).

Existen también trabajos que relacionan la nutrición con el cáncer. Se estima que entre un 30 y un 40% de los cánceres pueden prevenirse mediante una dieta adecuada y con actividad física y peso corporal correcto. Existe un consenso internacional en considerar la elevada ingesta energética y el consumo de alcohol excesivo, como factores de riesgo de ciertos tipos de cáncer (boca, faringe, laringe, esófago e hígado) mientras que una dieta rica en verduras y frutas está asociada a un menor riesgo de cáncer de boca, faringe, esófago, estómago y pulmón. (Byrne, 2001; Urieta Guijarro, 2004). El consumo de carotenoides, de té, de soja, de dietas ricas en fruta y verdura protege frente al daño oxidativo (Porrini, *et al.*, 2002), lo cual se relaciona con un menor riesgo de cáncer (Astley, *et al.*, 2002) y otras patologías.

Aunque múltiples y variados estudios ponen de manifiesto la relación entre daño en el ADN, oxidación celular y dieta, poco se ha estudiado respecto a la influencia de la alimentación en la infancia.

Es evidente que la edad infantil es un periodo crítico en el crecimiento y en la maduración celular. Estos fenómenos se encuentran relacionados directamente con una elevada síntesis del material genético, con actividad aumentada de endonucleasas y otras enzimas que regulan estos procesos a nivel del núcleo celular.

La relación entre crecimiento, nutrición y reparación de ADN no está suficientemente aclarada en la edad infantil.

Un trabajo de investigación llevado a cabo por Dundaroz, et al., describe en lactantes la influencia del tipo de leche (lactancia materna vs. lactancia artificial) en el estrés oxidativo, obteniendo como resultado que aquellos lactantes alimentados a pecho tienen un menor daño a nivel cromosómico. (Dundaroz, *et al.*, 2003).

En nuestro estudio, se busca una relación entre el grado de daño celular y el estado nutricional de la muestra dividida entre los que habían recibido leche materna (45) y los que estaban alimentados con leche artificial (22), como se muestra en la tabla 10.1. (ver resultados).

Como podemos observar en los resultados del ensayo cometa en mucosa y en sangre no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los que habían sido alimentados con leche materna y los alimentados con fórmula adaptada. Este hecho merece ser investigado mediante proyectos adecuados con el suficiente número de pacientes y con seguimiento temporal para poder ser demostrado. De ahí la importancia una vez más de obtener un método no invasivo para la determinación de daño en el DNA.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio nos llevan a las siguientes conclusiones:

1. El ensayo comet en células de la mucosa oral de neonatos da lugar a mayor daño en el ADN que el observado en los linfocitos de sangre periférica, pero cuando se comparan los valores medios obtenidos en mucosa con los linfocitos de sangre periférica no hay diferencias significativas entre ambos para los parámetros del ensayo comet estudiados, lo cual conduce a pensar que existe un tipo de célula humana alternativa para realizar el ensayo cometa alcalino, obteniéndose por tanto un método mínimamente invasivo para la determinación de genotoxicidad en humanos.

2. Al realizar subgrupos de la muestra experimental, se observa cómo no existen diferencias significativas ni entre las variables estudiadas como reanimación, oxigenoterapia, fototerapia, antibioterapia y tipo de leche, y el daño en el DNA de células de la mucosa oral y linfocitos de sangre periférica. Lo cual lleva a pensar que sería conveniente aumentar el tamaño muestral (N) de neonatos para encontrar diferencias estadísticamente significativas.

3. El método no invasivo encontrado en esta tesis doctoral nos permitirá llevar a cabo estudios de genotoxicidad en neonatos según distintas patologías y estados nutricionales. Incluso realizar fácilmente un seguimiento temporal en la infancia para determinar la capacidad para dañar el DNA de determinadas sustancias como: el oxígeno, radiaciones ionizantes y determinados medicamentos.



REFERNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFÍA

A

- Agudo A, González C A. Potenciales cancerígenos de la dieta y riesgo de cáncer. *Medicina Clínica*, 2002; 15:579-589.
- Ailion M, Inoue T, Weaver, C I, Holdcraft R W, Thomas J H. "Neurosecretory control of aging in *Caenorhabditis elegans*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96:7394–7397.
- Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*, 2007; 40:167-171.
- Al-Turk W A, Sthohs S J, EL-Rshidy F H, Othman S. "Changes in glutathione its metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes with age". *J. Pharmacol*, 1987; 39:13-16.
- Angelis K J, Dusinska M, Collins A R. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*, 1999; 20:2133–2138.
- Armstrong B, Bofetta P. Measurement of exposure and outcome in epidemiological studies used for quantitative estimation and prediction of risk quantitative estimation and prediction of human cancer risks. In: Quantitative Estimation and Prediction of Human Cancer Risks. *Scientific Publication*, 1999; 131:75-102.
- Asamblea general de la asociación Medica Mundial, Helsinki, (Finlandia 1964) Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.
- Aslan M, Sabuncu T, Kocyigit A, Celik H, Selek S. Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2007.
- Astley S B, Elliott R M, Archer D B, Southon S. Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks after oxidative challenge. *Nutr Cancer*, 2002; 43:202-213.
- Aust S D, Morehouse L A, Thomas C E. "Role of metals in oxygen radical reactions". *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1985; 1:3-29.

B

- Beckman K B, Ames B N. "The free radical theory of aging matures". *Physiol. Rev.*, 1998; 78:547-581.
- Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewosk. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *J.Mutat Res.*, 2004; 554:297-304.
- Boder E, Sedgwick R P. Ataxia-telangiectasia: A familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics*, 1958; 21:526-554.
- Bohr V A, Anson R M. "Mitochondrial DNA repair pathways". *J. Bioenerg. Biomemb.*, 1999; 31:391-398.
- Bondy S C, Yang Y E, Walsh T J, Gie Y W, Lahri D K. "Dietary modulation of age-related changes in cerebral prooxidant status". *Neurochem. Int.*, 2002; 40:123-130.
- Buonocore G, Perrone S, Longini M, Vezzosi P, Marzocchi B, Paffeti, Bracci R. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr. Res.*, 2002; 52:46-49.
- Byrne D, Food Safety, Health and Nutrition. *Geneva*, 2001.

C

- Cheeseman K H, Slater T F. "Free radical in medicine". *British Council Bulletin*, 1993; 49:481-93.
- Collins A R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 2004; 26:249-261.
- Collins B H, Horska A, Hotten P M, Riddoch C, Collins A R. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr Cancer*, 2001; 39:148-153.
- Collins A R, Dusinska M, Gedik C M, Stetina R. Oxidative damage to ADN: do we have a reliable biomarker?. *Environ Health Perspect.*, 1996; 3:465-469.

Courtemanche C, Huang A C, Elson-Schwab I, Kerry N, Ng B Y, Ames B N. Folate deficiency and ionizing radiation cause DNA breaks in primary human lymphocytes: a comparison. *FASEB J*, 2004; 18:209-211.

D

Dantas F J, de Mattos J C, Moraes M O, Boasquevisques E, Rodriguez M P, Lage C A, Cabral-Neto J B, Leitao A C, Bernardo-Filho M, Bezerra R J, Carvalho J J, Caldeira-de-Araujo A. DNA damage in peripheral blood nuclear cells assessed by comet assay from individuals submitted to scintigraphic examinations. *Cell Mol Biol*, 2002; 48:789-791.

De la Fuente M. "Effects of antioxidants on immune system ageing". *Eur .J. Clin. Nutr.*, 2002; 56:5-8.

Dhillon V S, Thomas P, Fenech M. Comparison of DNA damage and repair following radiation challenge in buccal cells and lymphocytes using single-cell gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol*, 2004; 80:517-528.

Dincer Y, Akcay T, Ilkiva H, Alademir Z, Ozbay G. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type 1 diabetes mellitus.

Dreosti J E. "Nutrition, cancer and aging". *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1998; 854: 371-377.

Dundaroz R, Turkbay T, Surer I, Gok F, Denli M, Baltaci V. DNA damage in children treated with imipramine for primary nocturnal enuresis. *Pediatr Int*, 2002; 44:617-621.

Dundaroz R, Ulucan H, Aydin H I, Gungor T, Baltaci V, Denli M, Sanisoglu Y. Analysis of DNA damage using the comet assay in infants fed cow's milk. *Biol Neonate*, 2003; 84:135-141.

Dundaroz R, Ulucan H, Denli M, Karapinar K, Aydin H I, Baltaci V. Evaluation of DNA damage using the comet assay in children on long-term benzathine penicillin for secondary prophylaxis of rheumatic fever. *Pediatr Int*, 2001; 43:276-280.

Dusinska M, Collins A R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 2008; 23:191-205.

Duthie S J. The comet assay: protective effects of dietary antioxidants against oxidative DNA damage measured using alkaline single cell gel

electrophoresis. Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in biological sciences, diagnostics and intervention. *World Scientific Publishing*, 2003; 309-323.

E

Eren K, Ozmeric N, Sardas S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine, *Clin. Oral Invest*, 2002; 150–154.

EURODIET, 2000. European Diet and Public Health: The Continuing Challenge. Working Party 1: Final Report.

F

Faust F, Kassie F, Knasmuller S, Boedecker R H, Mann M, Mesch Sundermann V. The use of alkaline Comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 2004; 566:209-229.

Ferro-Luzzi A, James P. Diet and Health. Nutrition in Europe, European Scientific and Technological Options Assessment, Directorate General for Research, 1997; 166:2-38.

Finkel T, Holbrook N J. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature*, 2000; 408:239-247.

Fridovich I. "Superoxide radical: and endogenous toxicant". *Pharmacol. Toxicol*, 1983; 239-257.

G

Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis*, 2003; 18:265-271.

Gedik C M, Boyle S P, Wood S G, Vaughan N J, Collins A R. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis*, 2002; 23:1441-1446.

- Gonzalez C, Najera O, Cortes E, Toledo G, Lopez L, Betancourt M, Ortiz R. Susceptibility to DNA damage induced by antibiotics in lymphocytes from malnourished children. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2002; 22:147-158.
- Gonzalez C, Najera O, Cortes E, Toledo G, Lopez L, Betancourt M, Ortiz R. Hydrogen peroxide-induced DNA damage and DNA repair in lymphocytes from malnourished children. *Environ Mol Mutagen*, 2002; 39:33-42.
- Grootveld M, Bell J D, Halliwell B. "Non transferrin-bound iron in plasma or serum from patient idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy". *J. Biol. Chem.*, 1989; 264:4417-4422.
- Gur M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Kocyigit A, Celik H, Aksoy N. Increased lymphocyte deoxyribonucleic acid damage in patients with cardiac syndrome X. *Mutat Res.*, 2006.
- Gutteridge J M C, Halliwell B. "Antioxidants in nutrition, health, and disease". *Oxford University Press*, 1994; 4:63-81.
- Guyton C A, Hall J E. Textbook of medical physiology. *McGraw-Hill Interamericana*, 1996; 3:29-41.

H

- Halliwell B. "Albumin, an important extracellular antioxidant?". *Biochem. Pharmacol*, 1988; 37:569-571.
- Halliwell B, Chirico S. "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993; 57:715-722.
- Halliwell B, Gutteridge J M, Cross C E. "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" *J. Lab. Clin. Med.*, 1992; 11:598-620.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. "Free radicals in biology and medicine". Third edition. *New York: Oxford University Press*, 1999.
- Hartmann A, Aguerri E, Beepers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 2003; 18:45-51.

Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test comet assay. *Toxicol Lett*, 1997; 90:183–188.

Hartwell L. Genetics. From genes to genomes. ISBN 9780071102155, 2006.

Hayashibe H, Asayama K, Dobashi K, Kato K. Prenatal Development of antioxidant enzymes in rat enzymes in rat lung, Kidney and heart: marked increase in immunoreactive superoxide dismutases, glutathione peroxidase, and catalase in the kidney. *Pediatr Res*, 1990; 27:472-475.

Hiroshi Kasai, Kazuaki Kawai. Oxidative DNA Damage: Mechanisms And Significance In health And Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006; 8:5-6. 2006.

Hu F B, Manson J E, Willett W C. Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 2001; 20:5-19.

Huertas J R, Martínez-Velasco E, Ibáñez S, López-Frías M, Ochoa J J, Quiles J L, Parenti Castelli G, Mataix J, Lenaz G. "Virgin olive oil and coenzyme Q10 protect heart mitochondria from peroxidative damage during aging". *Biofactors*, 1999; 9:337-343.

I

Ibáñez Quiles S. Efecto del tipo de grasa de la dieta (aceite de oliva y aceite de girasol) y la adición de coenzima Q10 sobre diversos aspectos del envejecimiento mitocondrial en hígado. Tesis Doctoral por la Universidad de Granada. Dep. Nutrición. Granada, 2003.

K

Kadenbach B, Hutteman M, Arnol S, Lee I, Bender E. "Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunit of cytochrome c oxidase". *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 29:211-221.

Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat Karakaya A. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers*, 2004; 9:203-209.

- Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res*, 1999; 442:29–35.
- Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 2000; 463:13–31.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.*, 1996; 363:89–96.
- Kleinsasser H, Wallner B C, Kastenbauer E R, Muenzenrieder R K, Harreus A. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestivetract using the Comet assay. *Mutat Res.*, 2000; 467:21–30.
- Klug, William. Conceptos de genética ISBN 9788420550145, 8ª ed. 2006.
- Krauss R M, Eckel R H, Howard B, Appel L J, Daniels S R, Deckelbaum R J, Erdman J W, Kris-Etherton P, Goldberg I J, Kotchen T A, Lichtenstein A H, Mitch W E, Mullis R, Robinson K, Wylie-Rosett J, St. Jeor S, Suttie J, Tribble D L, Bazzarre T L. AHA Scientific Statement: AHA Dietary Guidelines: Revision 2000: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Journal of Nutrition*, 2001; 131:132 - 146.

L

- Lackmann G M, Hesse L, Tollner U. Reduced iron- associated antioxidants in premature newborns suffering intracerebral hemorrhage. *Free Radic Biol Med*, 1996; 20:407-409.
- Lee M C, Weindruch R, Aiken J M. "Age-associated alterations of the mitochondrial genome". *Free Rad Biol Med*, 1997; 22:1259-1269.
- Lenaz G. "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing". *Bioch. Biophys*, 1998; 1366:53-67.
- Lenaz G, Bovina C, Castelluccio M, Cavazzoni M, Estornell E, Fato R, Huertas J R, Merlo Pich M, Palloti F, Parenti-Castelli G, Ranchova H. "Modest of coenzyme Q functions in electron transfer". *Protoplasma*, 1995; 184:50-62.

Liu J, Atamna H, Kuratsune H, Ames B N. "Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 959:133-166.

Lunec J. "Free radicals: their involvement in disease processes." *Biochem. Clin*, 1992; 16:99-108.

Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T, Creus A, Marcos R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res*, 2000; 464:255-262.

M

Maluf S W, Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001; 124:71-75.

Mandavilli B S, Santos J H, Van Houten B. "Mitochondrial DNA repair and aging". *Mutat. Res.*, 2002; 509:127-151.

Martínez Velasco E. Efecto de distintas fuentes grasas sobre el envejecimiento mitocondrial en músculo esquelético y cardíaco. Tesis Doctoral por la Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Granada, 2003.

Mastaloudis A, Yu T W, O'Donnell R P, Frei B, Dashwood R H, Traber M G. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med*, 2004; 36:966-975.

Mataix J, Llopis J. Tablas de composición de alimentos: aplicaciones en salud pública. en *Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones*. Serra L., Aranceta J. y Mataix J. 1995 Masson, S.A.

Mataix J. "Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario". Universidad de Granada-PULEVA FOOD, 2001; 21:155-188.

Mataix J, Quiles J L, Huertas J R, Battino M, Mañas M. "Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation". *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; 24:511-521.

- McCay C M, Crowell M F, Maynard L A. "The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size". *Nutrition*; 1989; 5:155-171.
- McCord J M, Fridovich I. "Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (Hemocuprein)". *J. Biol. Chem.*, 1968; 244:6049-6055.
- McElvey-Martin V J, Geen M H L, Schmezer P, Pool-Zobel B L, De Meo M P, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): An European Review. *Mutation Research*, 1993; 288:47-63.
- Melov S, Adlard P A, Morten K, Johnson F, Golden T R, Hinerfeld D, Schilling B, Mavros C, Masters C L, Volitakis I, Li Q X, Laughton K, Hubbard A, Cherny R A, Gibson B, Bush A I. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One*, 2007; 2:536
- Menendez D, Rojas E, Herrera L A, Lopez M C, Sordo M, Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutat Res*, 2001; 478:153-8.
- Merry B J. "Calorie restriction and age-related oxidative stress". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000; 908:180-198.
- Migliore L, Petrozzi L, Lucetti C, Gambaccini G. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology*, 2002; 58:1809-15.
- Miquel J, Economos A C. "Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and the life span of *Drosophila* and mice". *Exp. Gerontol.*, 1979; 14:279-285.
- Molina A, Muñoz A, Uberos J, Contreras F. Patología por radicales libres en pediatría. En: Muñoz A, Melatonina: Realidad actual y posibilidades futuras en pediatría., 2002; 619.
- Moller P, Loft S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76:303-310.
- Moller P, Viscovich M, Lykkesfeldt J, Loft S, Jensen A, Poulsen H. Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers. *Eur J Nutr*, 2004; 43:267-274.

Moreno Galarraga L, Valoración del daño en el ADN en la infancia y su relación con la nutrición y diversas patologías. Tesis Doctoral por la Universidad de Granada. Facultad de Medicina. Granada, 2007.

Moreno-Galarraga L, Santos J L, Ramírez-Tortosa M C, Quiles J L, Granados S, Martínez de Victoria E, Ortega L. Evaluation of DNA damage in children with Ataxia-Telangiectasia and risk relatives with the Comet test. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007.

Multhaup G, Rupper T. "Reactive oxygen species and Alzheimer disease". *Biochem. Pharmacol*, 1997; 54:533-559.

Muñiz J F, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow Y W, Nazar-Stewart V, Kisby G E. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008; 227:97-107.

N

Nieto N. "Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas". Memorias de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia, 1993.

Niki E. "Antioxidants in relation to lipid peroxidation". *Chem. Phys. Lipids*, 1987; 44:227-253.

O

Oberley L W, Oberley T D. "Free radical, cancer, and aging and degenerative diseases". R Liss New York, 1986; 325-371.

Ochoa J J, Huertas J R, Quiles J L, Mataix J. "Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria". *J. Nutr. Biochem*, 2001; 12:357-364.

Östling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 123:291-298.

P

- Palyvoda O, Polanska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol*, 2003; 50:181-190.
- Papas A M. "Vitamin E and exercise: aspect of biokenetic and bioavailability. "Nutricion and fitness in healt and disease". *Nutr. Diet*, 1993; 72:165-176.
- Pinhal D, Gontijo A M, Reyes V A, Salvadori D M. Viable human buccal mucosa cells do not yield typical nucleoids: impacts on the single-cell gel electrophoresis/Comet assay. *Environ Mol Mutagen*, 2006; 47:117-126.
- Porrini M, Riso P, Oriani G. Spinach and tomato consumption increases lymphocyte DNA resistance to oxidative stress but this is not related to cell carotenoid concentrations. *Eur J Nutr*, 2002; 41:95-100.

Q

- Quiles J L, Huertas J R, Mañas M, Battino M, Mataix J. "Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil". *Br. J. Nutr.*, 1999; 81:21-24.
- Quiles J L, Ramírez-Tortosa M C, Huertas J R, Ibáñez S, Gómez J A, Battino M, Mataix J. "Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin". *Biofactors*, 1999; 9:331-336.
- Quiles J L, Ramírez-Tortosa M C, Ibáñez S, González A, Duthie G G, Huertas J R, Mataix J. "Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil". *Free Rad. Res*, 1999; 31:129-135.

R

Ramírez-Tortosa M C, López-Pedrosa J M, Suarez A, Ros E, Mataix J, Gil A. "Olive oil and fish oil enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study". *Br. J. Nutr*, 1999; 82:31-39.

Rojas E, Valverde M, Sordo M, Ostrosky-Wegman P. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 1996; 370:115–120.

Rosenfeldt F L, Pepe S, Linnane A, Nagley P, Rowland M, Ou R, Marasco S, Lyon W, Esmore D. "Coenzyme Q10 protects the aging heart against stress: studies in rats, human tissues, and patients". *Ann N. Y. Acad. Sci*, 2002; 959:355-359.

S

Salama S A, Serrana M, Au W W. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutat Res*, 1999; 436:99–112.

Sardas S, Yilmaz M, Oztok U, Cakir N, Karakaya A E. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat Res*, 2000; 490:123-9.

Sastre J, Pallardó F V, De La Asunción G J, Viña J. "Mitochondria, Oxidative Stress and Aging". *Free Rad. Biol. Med.*, 1999; 32:189-198.

Sauer F. Presentation as representative of the EU Commission at the. EU Conference on Obesity.. Copenhagen, 2002 (<http://www.obesity.dk>).

Saugstad O D. Chronic lung disease: oxygen dogma revisited. *Acta Paediatr*, 2001; 90:113-115.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S. A single ataxia-telangiectasia gen with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 1995; 268:1749-1753.

Sevaniam A, Hoschstein D. "Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological system". *Ann. Rev. Nutr.*, 1985; 5:365-390.

- Sharman E H, Bondy S C. "Effects of age and dietary antioxidants on cerebral electron transport chain activity". *Neurobiol. Aging*, 2001; 22:629- 634.
- Schon E A, Sciacco M, Pallotti F, Chen X, Bonilla E. "Mitochondrial DNA mutation and aging". Cellular aging and cell death, Ed., Wiley-Liss, Inc., 1996: 19-34.
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988; 175:184-191.
- Singh N P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res*, 2000; 455:111–127.
- Singh N P, Stephens R E. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat Res*, 1997; 383:167–175.
- Sloan P, Picardo M, Schor SL. The structure and function of oral mucosa. *Dental Update*, 1991; 18:208–216.
- Smith T R, Miller M S, Lohman K K, Case L D, Hu J J. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2003; 24:883-900.
- Stadman E R. "Protein oxidation and aging". *Science*, 1992; 257:1220-1224. Stryer, L. "Bioquímica". Ed. Reverté, 1995; 403-431.
- Starcevic S L, Diotte N M, Zukowski K L, Cameron M J, Novak R F. Oxidative DNA damage and repair in a cell lineage model of human proliferative breast disease (PBD). *Toxicol Sci*, 2003; 75:74-81.
- Steingrímisdóttir L, Ovesen L, Moreiras O, Jacob S. Selection of relevant dietary indicators for health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002; 56:8-11.
- Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J, Bahner U. Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis*, 2001; 38:296-301.
- Surrallés J, Autio K, Nylund L, Järventaus H, Norppa H, Veidebaum T, Sorsa M, Peltonen K. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene exposed workers. *Carcinogenesis*, 1997; 18:817–823.

Swift M, Chase CL, Morrell D. Cancer predisposition of ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Cancer Genet Cytogenet*, 1990; 46:21-27.

Szeto Y T, Benzie I F. Effects of dietary antioxidants on human DNA ex vivo. *Free Radic Res*, 2002; 36:113-118.

Szeto Y T, Benzie I F, Collins A R, Choi S W, Cheng C Y, Yow C M N, Tse M M Y. A buccal cell model comet assay: Development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutation Research*, 2005; 578:371–381.

T

Tatli M M, Minnet C, Kocyigit A, Karadag A. Phototherapy increases DNA damage in lymphocytes of hyperbilirubinemic neonates. *Mutat Res.*, 2008; 654:93-5.

Tietz N W. "Specimen Collection and Processing; Sources of Biological Variation," Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia, PA, 1994.

U

Urieta Guijarro I. Consumo de alimentos e ingesta de energía y nutrientes en adultos residentes en Vizcaya: condicionantes antropométricos y sociodemográficos. Tesis Doctoral por la universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia. Departamento de nutrición. Madrid, 2004. Isbn: 84-669-2520-1.

V

Valverde M, Lopez M C, Lopez I, Sanchez I, Fortoul T I, Ostrosky-Wegman P, Rojas E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen*, 1997; 30:147–152.

Van Remmen H, Qi W, Sabia M, Freeman G, Estlack L, Yang H, Mao Guo Z, Huang T T, Strong R, Lee S, Epstein C J, Richardson A. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2004; 36:1625-34.

Vento M, Moro M, Escrig R, Arruza L, Villar G, Izquierdo I, Arduini A, Escobar J J, Sastre J, Asensi M A. Preterm resuscitation with low oxygen causes less oxidative stress, inflammation, and chronic lung disease. *Pediatrics.*, 2009; 124:439-449.

Viña J, Sastre J, Anton V, Rivelles M, Bruseghini L, Esteras A, Asensi M. "Role of antioxidants in aging prevention". *J. Clin. Nutr. Gastroent.*, 1993; 8:30-33.

W

Watson D, Crick F H. A structure for deoxyribose nucleic acid . *Nature*, 1953.

Weinberger B, Watorek K, Strauss R, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit. Care*, 2002; 6:521-525.

WHO (World Health Organisation), 1998. Programme of Nutrition, Family and Reproductive Health. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Geneva 1998.

Wiedemann M, Kontush A, Finckh B, Hellwege H H, Kohlshutter A. Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma owing to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable fatty acids. *Pediatr. Res*, 2003.

Wilkins R C, Kutzner B C, Truong M, Sanchez-Dardon J, McLean J R. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. *Cytometry*, 2002; 48:14-19.

Y

Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Martyn J A. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem*, 2003; 51:873-85.