

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Pediatría



**VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL
ADN EN LA INFANCIA Y SU
RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN
Y DIVERSAS PATOLOGÍAS**

Laura Moreno Galarraga
Granada 2007

VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN EN LA INFANCIA Y SU RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN Y DIVERSAS PATOLOGÍAS

Memoria presentada por la licenciada Dña. Laura Moreno Galarraga, para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Firmado: Laura Moreno Galarraga

Granada 11.4.2007

La Dra. M^a del Carmen Ramírez Tortosa, el Dr. Juan Luís Santos Pérez y el Dr. Luís Ortega Martos,

Certifican:

Que la tesis Doctoral que presenta la Licenciada Laura Moreno Galarraga "VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN EN LA INFANCIA Y SU RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN Y DIVERSAS PATOLOGÍAS" ha sido realizada bajo su dirección, habiendo sido adecuadamente revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Granada.

Fdo: Dra. M^a del Carmen Ramírez Tortosa

Fdo: Dr. Juan Luís Santos Pérez

Fdo: Dr. Luís Ortega Martos,

Granada, mayo de 2007

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

A: Adenina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADNmt: ADN mitocondrial
ADP: Adenosín difosfato
AGI: Ácidos grasos insaturados
AGM: Ácidos grasos monoinsaturados
AGP: Ácidos grasos poliinsaturados
AGS: Ácidos grasos saturados
AHA: (American Health Association) Asociación Sanitaria Americana
ARN: Ácido ribonucleico
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
FAO :(Food and Agriculture Organization) Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
FC: Frecuencia de Consumo
Fe: Hierro
G: Guanina
GPX: Glutation peroxidasa
GSH: Glutation reducido
H de C: Hidratos de Carbono
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
Hab: habitantes
HDL: (High Density Lipoprotein) Lipoproteína de Alta Densidad
I: Inosina
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IMC Índice de Masa Corporal
INE: Instituto Nacional de Estadística
IR: Ingesta Recomendada
LDL: (Low Density Lipoprotein) Lipoproteína de Baja Densidad
Min: minuto

O₂⁻: Anión superóxido

O₂: Oxígeno

OH \cdot : Radical hidroxilo

Pb: Pares de bases

RN: Recién nacido

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

seg: Segundo

SOD: Superóxido dismutasa

T: Timina

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

ÍNDICE:

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 21

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	23
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	23
1. EL DAÑO EN EL ADN: LA GENOTOXICIDAD	23
2. PRINCIPALES AGENTES GENOTÓXICOS	26
3. RELACIÓN GENOTOXICIDAD Y ENFERMEDAD:	27
OBJETIVOS	29
1. OBJETIVO PRINCIPAL DEL ESTUDIO:	29
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS DEL ESTUDIO:	29

INTRODUCCIÓN 31

I. ESTRUCTURA DEL ADN 33

MECANISMOS DE DAÑO CROMOSÓMICO Y REPARACIÓN	33
CONCEPTOS GENERALES:	33
1. CARIOTIPO, CROMOSOMA Y GENES	33
2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	35
3. ESTRUCTURA DEL ADN	35
4. INTRONES Y SECUENCIAS REPETIDAS	39
5. FUNCIONAMIENTO DEL CÓDIGO GENÉTICO	40
5.1. PROCESO DE REPLICACIÓN DEL ADN:	41
5.2. PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN DEL ADN:	42
5.3. PROCESO DE TRADUCCIÓN DEL ADN:	43
6. EL ADN, ALMACÉN DE INFORMACIÓN:	44
7. MUTACIONES EN EL ADN:	44
7.1 CLASIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES:	46
7.2 ETIOLOGÍA DE LAS MUTACIONES	48

7.2.1	MUTACIONES ESPONTÁNEAS:	48
7.2.1.1	ERRORES EN LA REPLICACIÓN	49
7.2.1.2	LESIONES O DAÑOS FORTUITOS EN EL ADN	49
7.2.2	MUTAGÉNESIS INDUCIDA.	51
7.3	MECANISMOS DE MUTAGÉNESIS	53
8	REPARACIÓN DE LOS DAÑOS EN EL ADN	55
8.1	SISTEMAS QUE EVITAN LOS ERRORES ANTES DE QUE OCURRAN	57
8.2	REPARACIÓN DIRECTA DE LAS LESIONES EN EL ADN	57
8.3	SISTEMAS DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN	58
8.4	REPARACIÓN POSTERIOR A LA REPLICACIÓN	58
	II. RELACIÓN ENTRE DAÑO EN EL ADN Y ENFERMEDAD	60
	MUTACIONES QUE AFECTAN A LA LÍNEA GERMINAL:	61
2.1.	ENFERMEDADES HUMANAS DEBIDAS A DEFICIENCIAS EN REPARACIÓN	64
	MUTACIONES QUE AFECTAN A CÉLULAS SOMÁTICAS:	67
	III RADICALES LIBRES Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	69
	EL BALANCE OXIDATIVO:	69
	EL PAPEL DE LA DIETA EN EL BALANCE OXIDATIVO:	70
	LOS RADICALES LIBRES:	70
1.	LA MITOCONDRIA COMO FUENTE DE ENERGÍA CELULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO	70
2.	TIPOS DE RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	72
2.1	ANIÓN SUPERÓXIDO	73
2.2	PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	73
2.3	RADICAL HIDROXILO	74
2.4	OTROS RADICALES LIBRES	75
3.	DAÑOS CELULARES PRODUCIDOS POR LOS RADICALES LIBRES.	75
3.1	EFFECTOS SOBRE LOS LÍPIDOS. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (PL)	75
3.2	EFFECTOS SOBRE LAS PROTEÍNAS	76
3.3	EFFECTOS SOBRE LOS HIDRATOS DE CARBONO	77
3.4	EFFECTOS SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO	77
4.	IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS RADICALES LIBRES.	78
	SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	79
	MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	80
1.	SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)	80

2. CATALASA (CAT)	80
3. GLUTATION PEROXIDASAS	81
4. VITAMINA E	81
5. COENZIMA Q	82
ANTIOXIDANTES EN EL ENVEJECIMIENTO Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	83
IV. RELACIÓN ENTRE LA NUTRICIÓN Y LA SALUD:	86
EL PROBLEMA ACTUAL DE LA NUTRICIÓN EN ESPAÑA:	86
ENFERMEDADES RELACIONADAS CON FACTORES NUTRICIONALES:	88
TENDENCIAS ACTUALES Y RECOMENDACIONES EN NUTRICIÓN	92
V. MÉTODOS DE VALORACIÓN NUTRICIONAL	94
LA ANAMNESIS BÁSICA:	95
LA EXPLORACIÓN FÍSICA Y LA ANTROPOMETRÍA	96
PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS	96
CÁLCULOS OBTENIDOS A PARTIR DE ESTAS MEDICIONES:	98
1. LOS ÍNDICES PONDERALES	98
2. ÍNDICE DE WATERLOW	99
3. DENSIDAD CORPORAL (DC) Y % GRASA CORPORAL	100
4. ÁREA GRASA DEL BRAZO (AGB)	100
5. ÍNDICES RELATIVOS A LA DISTRIBUCIÓN DE LA GRASA	102
LA ANALÍTICA: PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	102
ESTIMACIÓN DE CONSUMO DE ALIMENTOS	105
1. DATOS DE DISPONIBILIDAD DE ALIMENTOS	105
2. DATOS DE CONSUMO DE ALIMENTOS	106
2.1. ENCUESTAS DE PRESUPUESTOS FAMILIARES	106
2.2. ENCUESTAS INDIVIDUALES	106
3. INFORMACIÓN DE INGESTA ACTUAL	107
3.1. REGISTRO DE ALIMENTOS	107
3.2. RECUERDO 24 HORAS	108
4. INFORMACIÓN DE INGESTA HABITUAL	108
4.1. HISTORIA DIETÉTICA	108
4.1. FRECUENCIA DE CONSUMO (FC)	109
5. DIETAS DUPLICADAS	109
ERRORES Y SESGOS DE LA ESTIMACIÓN DE CONSUMO	110
CONVERSIÓN DE ALIMENTOS A ENERGÍA Y NUTRIENTES	111
VI. MÉTODOS PARA LA VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN	113
ENSAYO COMET:	113

1. SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS	113
2. ENSAYO COMET ALCALINO	115

MATERIAL Y MÉTODOS **121**

MATERIAL **123**

1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA	123
2. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	126
DISTRIBUCIÓN POR EDAD	126
DISTRIBUCIÓN POR SEXO	127
DISTRIBUCIÓN POR PATOLOGÍAS	128
DISTRIBUCIÓN POR AGRUPACIÓN DE PATOLOGÍAS	128
3. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	129
4. MATERIALES PARA LA ANTROPOMETRÍA	130
5. MATERIALES PARA EL ENSAYO COMET	130

MÉTODOS **133**

VALORACIÓN NUTRICIONAL	133
1. RECOGIDA DE DATOS PERSONALES Y ANTROPOMÉTRICOS:	133
2. VALORACIÓN NUTRICIONAL	134
2.1. ANAMNESIS BÁSICA:	135
2.2. EXPLORACIÓN FÍSICA Y ANTROPOMETRÍA	135
2.3. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS	136
2.4. CÁLCULOS ESTIMADOS A PARTIR DE DATOS ANTROPOMÉTRICOS	139
2.5. REGISTRO DE ALIMENTOS	142
3. ANALÍTICA:	143
3.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	143
3.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS:	145
4. COMET TEST	145
5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	152

RESULTADOS **155**

RESULTADOS: **157**

1. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DEL NIÑO Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO	159
--	-----

2. RELACIÓN ENTRE EL SEXO Y EL DAÑO EN EL ADN:	164
3. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO DE SALUD Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA	167
4. RELACIÓN ENTRE LA TOMA DE MEDICACIÓN Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA	182
<u>5</u> RELACIÓN ENTRE EL ESTADO NUTRICIONAL Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA.	187

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES **205**

DISCUSIÓN	207
1. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DEL NIÑO Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO.	209
2. RELACIÓN ENTRE EL SEXO Y EL DAÑO EN EL ADN:	212
3. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO DE SALUD Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA	214
4. RELACIÓN ENTRE LA TOMA DE MEDICACIÓN Y EL DAÑO CELULAR EN LA INFANCIA	234
5. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO NUTRICIONAL Y EL DAÑO CELULAR EN LA INFANCIA.	237
CONCLUSIONES	246

BIBLIOGRAFÍA **249**

**JUSTIFICACIÓN Y
OBJETIVOS DEL
ESTUDIO**

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

1. EL DAÑO EN EL ADN: LA GENOTOXICIDAD

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 en pacientes adultos con diabetes mellitus 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.

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 nuestro estudio esta es la técnica que se utiliza para valorar y cuantificar el daño en el ADN de linfocitos de sangre periférica.

El daño oxidativo en el ADN juega también un papel muy importante en el envejecimiento celular, de hecho existen diversas teorías del envejecimiento que basan la causa de este deterioro en un desbalance entre los agentes oxidantes y los antioxidantes (Kadioglu *et al.*, 2004). El afán por encontrar la causa y el remedio contra el envejecimiento celular ha proporcionado una gran cantidad de teorías. Entre las cerca de 300 teorías catalogadas, una de las más aceptadas actualmente es la teoría del estrés oxidativo donde la mitocondria ocupa un papel primordial por ser uno de los orgánulos más afectados

durante este proceso siendo los efectos deletéreos causados por las especies reactivas del oxígeno (procedentes principalmente de la mitocondria) los responsables del deterioro funcional asociado a la senescencia.

La evidencia experimental producida en los últimos años de investigación indica que los oxidantes son determinantes en el envejecimiento celular. Estos hechos tienen en el campo de la nutrición una evidente interacción puesto que ésta puede ejercer una clara influencia desde una perspectiva preventiva, lo que ha llevado a la cultura del consumo de antioxidantes, y a lo que se ha dado en llamar "ortorexia" o preocupación excesiva por "comer sano" (Martínez Velasco, 2003).

Por otra parte, se conoce el importante papel de la grasa de la dieta en la epidemiología de diversas enfermedades, como las de origen cardiovascular. Los lípidos que componen las membranas celulares y que en último término, vienen condicionados por la composición de la grasa administrada en la dieta y los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de membrana modulan las propiedades fisicoquímicas de la misma, siendo responsables de parámetros tales como la fluidez y permeabilidad, así como su susceptibilidad al ataque oxidativo (Ibáñez Quiles, 2003).

La nutrición está teniendo cada vez un papel mas importante en relación con la salud. Los hábitos nutricionales y sus trastornos influyen sobre la respuesta del organismo a otros niveles. En este sentido es conocida la relación entre respuesta inmunitaria y nutrición (Miller, 2000). Por ejemplo, determinadas alteraciones en la producción de citocinas en pacientes VIH, que condicionan una alteración en la inmunidad de estos pacientes, parecen relacionarse con las alteraciones nutricionales propias

de la enfermedad, asociando así mayor afectación inmunológica con mayor grado de desnutrición (Johann-Liang *et al.*, 2000).

Se han descrito también múltiples alteraciones del sistema endocrino que están relacionadas con la malnutrición. Por ejemplo la leptina y adiponectina son secretadas en el tejido adiposo, y regulan el metabolismo graso, la homeostasis de los lípidos y glucosa y la sensibilidad a la insulina. Recientemente se ha atribuido un papel regulador de la leptina en la modulación de la respuesta inmune (Sánchez-Margalet *et al.*, 2002). Por esto es uno de los parámetros analíticos que utilizamos para valorar el estado nutricional de nuestros pacientes.

2. PRINCIPALES AGENTES GENOTÓXICOS

Existen 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 (Focet *et al.*, 2002).
- Las radiaciones ionizantes (Garaj-Vrhovac *et al.*, 2003).
- Algunos fármacos (Dundaroz *et al.*, 2002).

Existen por otra parte sustancias capaces de disminuir el daño del ADN celular, como los antioxidantes de la dieta. Existe una relación demostrada entre la dieta y su composición en nutrientes, y la estabilidad del ADN cromosómico (Szeto, Benzoe, 2002. Collins *et al.*, 2001). 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).

3. RELACIÓN GENOTOXICIDAD Y ENFERMEDAD:

Existe una evidente y demostrada relación entre la mayor susceptibilidad cromosómica con la mutagénesis y el cáncer. (Starcervic *et al.*, 2003).

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 el daño en el ADN cuantificado en mujeres, está relacionado con un mayor riesgo de presentar cáncer de mama (Smith *et al.*, 2003).

Todos estos datos y estudios previamente mencionados, ponen de manifiesto que existe una relación entre la dieta, las enfermedades y el daño oxidativo en el ADN. Esta es la base en la que se centra nuestro proyecto.

Se ha realizado un estudio en niños (con edades comprendidas entre 0 y 14 años) y se ha estudiado el daño en el ADN cromosómico mediante la técnica del comet para determinar la relación existente entre diversas patologías en la infancia y el daño genético.

A su vez los niños han sido sometidos a un estudio nutricional completo, para ver si la nutrición de estos niños guarda también relación con el daño en el ADN celular.

El estudio nutricional de nuestros pacientes se analizó mediante datos antropométricos, datos bioquímicos y registros de ingestas.

El análisis de los valores antropométricos (peso, talla, perímetro cefálico, principales pliegues y perímetros), así como los índices nutricionales derivados de ellos, son de gran valor en la estimación del desarrollo. Las medidas de composición corporal, calculadas según los datos recogidos en la antropometría, permiten conocer el estado nutricional de nuestros pacientes.

La valoración de la ingesta en niños se realiza a través de encuestas nutricionales, que registran la ingesta estimada de alimentos analizando al menos 2 días, incluyendo uno festivo. Igualmente se han tenido en cuenta hábitos de vida y actividad física, parámetros socioeconómicos y culturales.

La valoración analítica incluye hemograma completo y fórmula, parámetros bioquímicos básicos y parámetros nutricionales (ferritina, prealbúmina, albúmina, proteína transportadora de retinol). Un estudio endocrinológico que incluye GH, T3, T4, TSH, y un estudio inmunológico (IgG, IgA, IgM).

OBJETIVOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL DEL ESTUDIO:

Valorar si existe una relación entre las diversas patologías y el estado nutricional de los niños con el grado de genotoxicidad.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS DEL ESTUDIO:

1. Buscar qué tipo de patologías, agudas o crónicas, afectan más al daño celular, y si existe alguna enfermedad en concreto con mayor poder genotóxico.
2. Estudiar la relación entre la edad (envejecimiento) y el daño celular, para ver si también en la infancia la edad influye en el daño oxidativo.
3. Analizar si existe una relación entre el sexo y el daño celular.
4. Valorar la relación entre diversos tratamientos y el grado de genotoxicidad.
5. Encontrar biomarcadores específicos entre los parámetros bioquímicos y nutricionales indicadores del daño en el ADN en los niños.

INTRODUCCIÓN

I. ESTRUCTURA DEL ADN

MECANISMOS DE DAÑO

CROMOSÓMICO Y REPARACIÓN

«Casi todo los aspectos de la vida se organizan en el nivel molecular, y si no entendemos las moléculas nuestra comprensión de la vida misma será muy incompleta». Francis Crick.

CONCEPTOS GENERALES:

Para poder comprender realmente la genotoxicidad es preciso conocer la estructura básica del ADN, sus principales fenómenos de lesión y sus mecanismos reparadores

1. CARIOTIPO, CROMOSOMA Y GENES

El cariotipo es todo el conjunto cromosómico completo de un individuo. Cada cariotipo es distinto respecto a forma, tamaño y número de cromosomas, y se perpetúa normalmente en la descendencia. Cada especie presenta un determinado cariotipo por el que se diferencia de las demás.

Los cromosomas son cada uno de los corpúsculos en forma de bastoncillo en que se divide la cromatina del núcleo celular en la mitosis, miden entre 5 y 15 micrómetros, y para identificarlos hay que observar la célula en fase de división celular, especialmente durante la metafase o profase tardía. El número de cromosomas es distinto para cada especie, aunque es constante para todas las células de la misma (ley de la constancia numérica de los cromosomas), excepto para las células reproductoras, que tienen una constitución cromosómica mitad (haploide) con respecto a las células somáticas (diploide). En la especie humana este número es de 46, de los cuales 44 son autosómicos y 2 sexuales. Los cromosomas están constituidos por cadenas lineales de ácido desoxirribonucleico (ADN) y por proteínas, denominadas histonas. Están formados por dos mitades longitudinales o cromátidas y un centrómero, que separa las dos porciones laterales, los brazos del cromosoma. Según la posición del centrómero se determinan distintos tipos morfológicos de cromosomas como metacéntricos (brazos iguales), submetacéntricos (brazos ligeramente distintos) y telocéntricos (brazos muy desiguales en longitud).

Gen es la unidad de herencia, la partícula de material genético que determina la herencia de una característica determinada, o de un grupo de ellas. Cada gen ocupa en el cromosoma una posición determinada, o locus. Las cadenas de ADN están estructuradas en genes, cada uno de los cuales posee por término medio del orden de 1.000 a 2.000 pares de nucleótidos. Hay dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). La información del código genético que está contenida en los tripletes del ADN, se transcribe en los tripletes de ARN-mensajero (ARNm), y ésta información en forma de ARN se

traduce en la célula en forma de aminoácidos (Watson y Crick, 1953; Klug, 2006; Hartwell, 2006).

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El ADN fue identificado inicialmente en 1868 por Friedrich Miescher, en los núcleos de las células del pus y en el espermatozoide 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.



3. 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 nucleico 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.

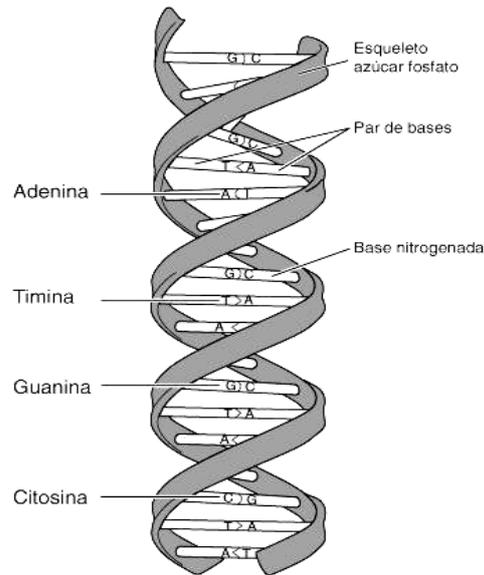
La molécula de ADN está formada por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una estructura en doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí por enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas.

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 2.1: 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, 1953.)

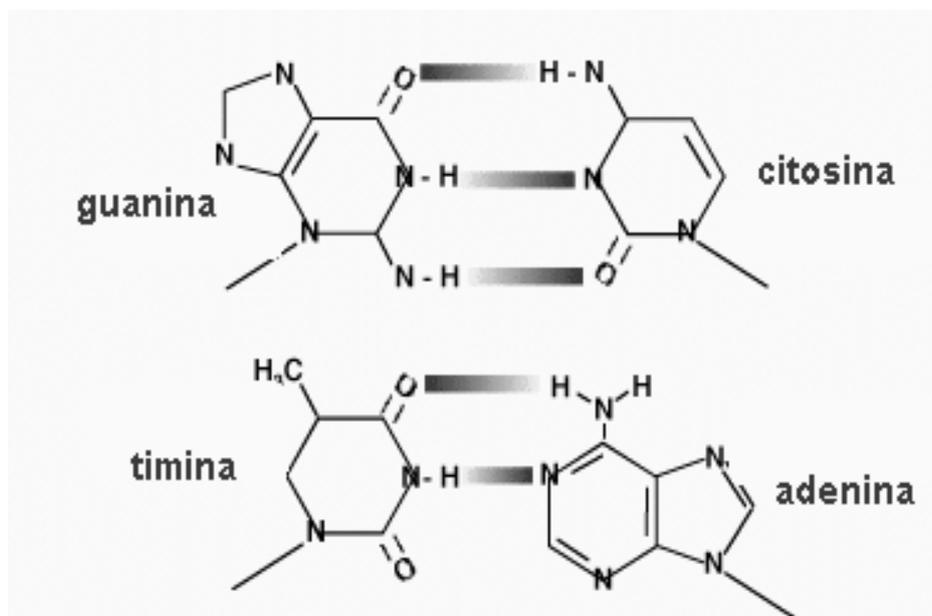
La estructura del ADN se halla muy condensada. Este empaquetamiento se basa en nucleosomas. El ADN está enrollado alrededor de cada nucleosoma formando una estructura en forma de rosario. Entonces la estructura se

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 2.2: 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.

4. INTRONES Y SECUENCIAS REPETIDAS

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, 2006. Hartwell, 2006))

5. 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).

5.1. PROCESO DE REPLICACIÓN DEL ADN:

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

Es un proceso mediante el cuál 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, semiconservadora, 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.

5.2. 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 poli ribosoma o polisoma. En los ribosomas se da paso al siguiente proceso la traducción del código genético.

5.3. 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. 1996).

6. EL ADN, ALMACÉN DE INFORMACIÓN:

EL ADN se puede considerar como un almacén de información, que se trasmite 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.

7. 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 generado una seria inestabilidad genómica y múltiples patologías como por ejemplo la Ataxia telangiectasia. La Ataxia telangiectasia (A-T) es una enfermedad degenerativa rara causada por mutaciones en el gen *atm* (Ataxia Telangiectasia Mutated), que codifica para una proteína-quinasa involucrada en procesos de reparación de daños a ADN. Su mutación produce defectos neurológicos e inmunológicos graves en edades tempranas, terminando con la muerte de los pacientes (Poder y Sedgwick, 1958; Savitsky *et al.*, 1995).

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, 2006; Hartwell, 2006)

7.1 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.

7.2 ETIOLOGÍA DE LAS MUTACIONES

La etiología de las mutaciones depende como se explica en la clasificación anterior de si son mutaciones espontáneas o mutaciones inducidas por agentes genotóxicos.

7.2.1 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.

7.2.1.1 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.

7.2.1.2 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.

7.2.2 MUTAGÉNESIS INDUCIDA.

Existen, como se comenta en el capítulo previo, 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 acumulo de radicales libres y aumentan consiguientemente el estrés celular (Focet *et al.*, 2002)

- 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, 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, 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, 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.

7.3 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, 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.

8 REPARACIÓN DE LOS DAÑOS EN EL 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, 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 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").

8.1 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.

8.2 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.

8.3 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 dos 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. 2003)

8.4 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 cual 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.

II. RELACIÓN ENTRE DAÑO EN EL ADN Y ENFERMEDAD

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 et al, 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.

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, el 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, 2006, Hartwell, 2006) Algunos ejemplos de enfermedades producidas 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 el 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.

2.1. ENFERMEDADES HUMANAS DEBIDAS A DEFICIENCIAS EN REPARACIÓN

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, de entre ellas cabe destacar la ataxia telangiectasia, dado el alto número de sujetos en nuestro estudio afectados de esta enfermedad.

La Ataxia-Telangiectasia (AT)

En este estudio presentamos varios casos de niños con esta enfermedad, por lo que dentro de todas las enfermedades genéticas con fallos en el sistema de reparación del ADN, nos centramos en describir esta.

La Ataxia-Telangiectasia (AT) es una enfermedad hereditaria, multisistémica, autosómica recesiva, con una incidencia de 1:40.000-1:80.000. Se caracteriza por una inmunodeficiencia primaria asociada a ataxia progresiva y telangiectasias de piel y mucosas. La inmunodeficiencia es variable, involucrando respuestas inmunes alteradas tanto celulares (linfocitos T) como humorales (linfocitos B),

provocando un aumento de infecciones. Los pacientes afectados de AT padecen una predisposición a ciertas clases de cáncer, padecen una inestabilidad cromosómica por presentar alteraciones en los mecanismos reparadores del daño en el ADN. También los pacientes portadores de la enfermedad (heterocigotos para el gen ATM) tienen una mayor predisposición a ciertos tipos de cáncer (Swift *et al.*, 1990).

La base genética de esta patología se encuentra en la mutación del gen ATM que está implicado en la reparación del ADN. El gen responsable de la AT se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 en 11q22-23. Éste controla la producción de una enzima del tipo - fosfatidilinositol- 3- kinasa involucrada en respuestas celulares y control de ciclo celular (Poder y Sedgwick 1958; Savitsky y Bar-Shira, 1995).

Los pacientes afectados de Ataxia-Telangiectasia y los portadores heterocigotos del gen a.m. tienen una mayor incidencia de procesos neoplásicos que la población general, debido a la inestabilidad cromosómica y a los defectos en la reparación del ADN (Swift *et al.*, 1990).

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 anormales 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 cardiacas. 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 y González, 2002. Armstrong y Bofetta, 1999.)

III RADICALES LIBRES Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

EL BALANCE OXIDATIVO:

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, 1993; Cheeseman y Slater, 1993; Liu y cols, 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, 1993; Schon *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Sastre *et al.*, 1999; Lenaz, 1998; De la fuente, 2002).

EL PAPEL DE LA DIETA EN EL BALANCE OXIDATIVO:

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. 2003)

LOS RADICALES LIBRES:

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 y Ames 1998, Ibáñez Quiles 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 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 y Richardson, 2001; Ibáñez Quiles 2003).

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 y Slater, 1993).

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, 1983; Cheeseman y Slater, 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, 1998; Finkel y Holbrook, 2000).

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, 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 y Slater, 1993).

2.3 RADICAL HIDROXILO

El radical hidroxilo es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula (Halliwell y Gutteridge, 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.

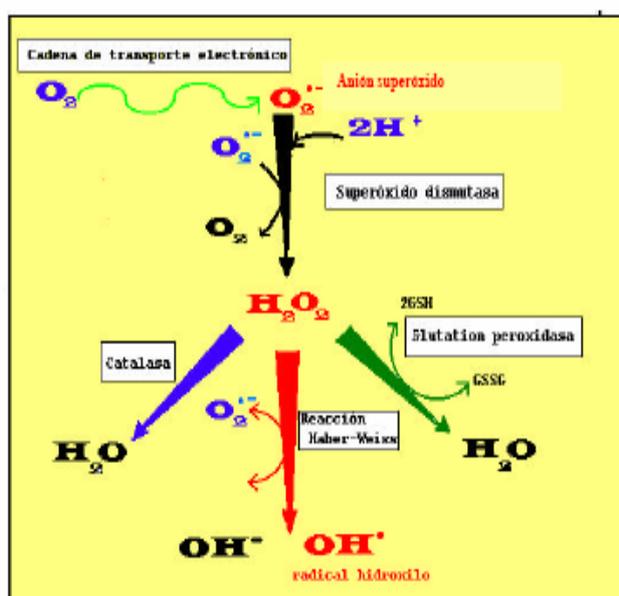
(b) Cuando se exponen los tejidos a radiaciones, la mayor parte de la energía captada es absorbida por el agua de las células. Se produce entonces la separación de una de las uniones covalentes entre el oxígeno y el hidrógeno del agua, dejando un único electrón en el hidrógeno, formando el radical hidroxilo.

(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 y Anson, 1999; Sastre *et al.*, 1999; Ibáñez Quiles, 2003)

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.



3. DAÑOS CELULARES PRODUCIDOS POR LOS RADICALES LIBRES.

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 y Hochstein, 1985; Halliwell y Chirico, 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, 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, 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, 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.

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, 1993; Melov, 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, 2003)

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, 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 y Oberley, 1986).

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.

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 y Rupper, 1997).

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

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, glutatión peroxidasas y la catalasa, entre otras. También otros sistemas importantes son las reacciones de regeneración y el sistema del glutatión (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, 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 y Slater, 1993; Viña *et al.*, 1993)

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, 2003) Este tema ha sido con anterioridad motivo de diversas revisiones por lo que aquí nos referimos sólo a algunos de ellos.

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.

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, 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 y Slater, 1993).

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

4. VITAMINA E

Bajo el término de vitamina E se engloba un conjunto de 8 nutrientes solubles en grasa (Papas, 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 y Halliwell, 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 peroxilo 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, 1998. Ibáñez Quiles, 2003).

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 y cols., 2002; Milgram y cols., 2002, Ibáñez Quiles S. 2003)

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, 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 mayor 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 1 *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, 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).

IV. RELACIÓN ENTRE LA NUTRICIÓN Y LA SALUD: EL PROBLEMA ACTUAL DE LA NUTRICIÓN EN ESPAÑA:

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, 2002; Urieta Guijarro 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, 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, 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).

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON FACTORES NUTRICIONALES:

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.*, 1999a). 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.*, 1999b; 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.*, 1999c; 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, 2003, Ferro Luzzi y James, 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, 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 melitus en la madurez, aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, ciertos

cánceres y muerte prematura por aumento del riesgo de hipertensión (Byrne, 2001; Urieta Guijarro 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 y James, 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 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 y Bondy, 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, 2000). Aunque hay varias teorías para explicar el efecto antienvjecimiento 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, 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 y Gutteridge, 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.

TENDENCIAS ACTUALES y RECOMENDACIONES EN NUTRICIÓN

En la actualidad, pese a las grandes mejoras en el nivel socioeconómico de nuestro país en las últimas décadas, el patrón alimentario todavía presenta grandes deficiencias. Generalizando las tendencias en nutrición se podrían resumir en los siguientes puntos:

- ___ El consumo de frutas y verduras es todavía muy bajo.
- ___ La ingesta de energía de la grasa y especialmente de grasa saturada, es demasiado elevada.

___ El consumo de cereales ha bajado, mientras que el consumo de carne ha aumentado.

___ Existen deficiencias de hierro, yodo y folato.

Estos hechos hacen que las ingestas recomendadas y las guías alimentarias estén en constante evolución y revisión y se modifiquen en función de los resultados de los estudios más recientes (Urieta Guijarro 2004). Recientemente se ha publicado una nueva propuesta de pirámide de alimentación que es un buen reflejo de la adaptación de las recomendaciones a los cambios en los hábitos de vida (Willet y Stampferpfer, 2003).

Como base para el desarrollo de esta estrategia, la WHO lanzó en 2003 un informe sobre dieta, nutrición y la prevención de las enfermedades crónicas (WHO, 2003). El informe recoge recomendaciones específicas sobre la dieta tales como la necesidad de limitar la ingesta de grasa a entre el 15 y el 30% de la ingesta diaria total de energía y la ingesta de grasas saturadas a menos de un 10%. Además, los hidratos de carbono deberían aportar la mayoría de la energía necesaria (entre un 55 y un 75%) y los azúcares refinados simples deberían suponer menos de un 10%. También recomienda que la sal consumida sea yodada y que se limite a 5 g, mientras que la ingesta de frutas y verduras debería ser de al menos 400 g diarios. (Urieta Guijarro 2004)

V. MÉTODOS DE VALORACIÓN NUTRICIONAL

La valoración nutricional permite determinar el estado de nutrición de un individuo y valorar las necesidades o requerimientos nutricionales. Para valorar el estado nutricional se precisan tres parámetros fundamentales una anamnesis básica dirigida, unos parámetros antropométricos y unos parámetros bioquímicos elementales

Existen múltiples y diferentes técnicas para valoración de la composición corporal. Esta amplia variedad surgió a raíz de las dificultades para valorar el estado de nutrición y para poder obtener medidas reproducibles así poco a poco fueron apareciendo y empleándose técnicas más o menos sofisticadas capaces de medir los distintos componentes corporales. Entre ellas están, la dilución isotópica, el análisis de activación de neutrones, los isótopos estables, la bioimpedancia eléctrica, la absorciometría, la densitometría, la tomografía axial computarizada, la ultrasonografía y la resonancia magnética.

Sin embargo no debemos olvidar las técnicas iniciales, más básicas y sencillas como la antropometría básica ,la medición de la grasa con el lipocalibrador , el índice de masa corporal...

Estas técnicas han demostrado una gran representación del estado nutricional siendo técnicamente mucho más sencillas, no invasivas y mucho más económicas. (Leis Trabazo y Sierra Salinas, 2004)

LA ANAMNESIS BÁSICA:

Como en todo acto médico, la anamnesis es parte fundamental para el correcto estudio de un paciente. El interrogatorio directo al paciente, o bien al familiar encargado en caso de niños, va dirigido en el caso de la valoración nutricional a obtener información principalmente sobre los siguientes aspectos:

Antecedentes personales: enfermedades agudas o crónicas, cirugía previa, y otras situaciones que modifiquen el apetito, la tolerancia digestiva o requieran modificaciones específicas de la dieta (diabetes, celiaquía, hiperlipemias, insuficiencia renal, hepática, pancreática, etc.).

Antecedentes familiares.

Anamnesis por aparatos.

Funcionalidad del aparato digestivo y apetito: hábito intestinal, reflujo gastroesofágico, vómitos, intolerancias digestivas, alergias, capacidad masticatoria y deglutoria...

Tratamiento farmacológico: medicación actual incluidos suplementos vitamínicos etc....

Hábitos Tóxicos: tabaco, alcohol, drogas.

Actividad física – deportiva.

LA EXPLORACIÓN FÍSICA y LA ANTROPOMETRÍA:

Para una correcta valoración antropométrica es preciso realizar previamente una exploración física básica, centrándose en los aspectos más relacionados con la nutrición, como son:

Aspecto ponderal: Obesidad, normo peso, delgadez o caquexia y distribución de grasa corporal.

Estado de hidratación de piel y mucosas.

Coloración de piel y mucosas

Temperatura corporal

PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

El estado nutricional se determina por la asociación de múltiples parámetros., ya que no existe uno sólo que por sí mismo tenga valor patognomónico de desnutrición. Los métodos antropométricos mas sencillos, fácilmente pueden ser aplicados a cualquier nivel y permiten un buen grado de valoración nutricional, pero es importante la experiencia y correcta técnica del recopilador de datos.

Se entiende por antropometría la valoración de las dimensiones corporales incluyendo longitud, masa y segmentos corporales (pliegues y perímetros)

Posteriormente con estos datos y mediante ecuaciones de predicción obtenidas estadísticamente a partir de otros métodos de referencia, se puede calcular los diversos componentes corporales, la densidad corporal, la masa grasa y la masa no grasa etc... (Leis Trabazo y Sierra Salinas, 2004)

Longitud o Talla: relacionado con la edad y el sexo es un parámetro nutricional muy válido en etapas de desarrollo. Se utiliza para su valoración la comparación con tablas específicas y el canal percentilar en relación con tallas previas y con el peso.

Peso: Entre los parámetros antropométricos, la evolución del peso es el más útil. Pudiendo compararse con pesos previos o con el peso ideal para edad y sexo y con su canal percentilar.

Perímetros o circunferencias:

Perímetro del brazo: Colocando el brazo en el plano horizontal con el antebrazo flexionado formando un ángulo de 90°. se mide el punto de mayor tamaño

Perímetro del antebrazo: Colocando en brazo en el plano horizontal con el antebrazo formando un ángulo de 180° se mide el punto de mayor tamaño.

Perímetro del muslo: Circunferencia tomada inmediatamente debajo del pliegue glúteo.

Perímetro de la pierna: Es la medida de la mayor circunferencia de la pierna derecha

Pliegues cutáneos los pliegues medidos con un plicómetro miden el tejido adiposo en la zona subcutánea

Pliegue tricipital: sobre la cara posterior del brazo en la línea media

Pliegue subescapular: en la parte inferior de la escápula separando el pliegue de forma que adquiera su inclinación natural, y que no es otra que aquella que va desde el punto inferior de la escápula hacia la base del cuello.

Pliegue supralíaco Sobre la zona superior de la espina ilíaca antero superior con una inclinación de 45° sobre la horizontal.

Pliegue abdominal en la parte derecha de la zona umbilical con una inclinación de 90° sobre la horizontal.

Pliegue muslo: En posición de sentado con la pierna flexionada en 90° sin apoyar sobre el suelo. Siguiendo el trayecto del fémur. En el punto medio del muslo.

Pliegue pierna: En la misma posición que el del muslo. Se realiza la medición del pliegue siguiendo el trayecto de la tibia en la cara interna de la pierna, en la zona media.

CÁLCULOS OBTENIDOS A PARTIR DE ESTAS MEDICIONES:

Existen múltiples índices que relacionan peso y talla, desde los trabajos de Waterlow se admite que las variaciones de talla con relación a la edad miden la malnutrición crónica mientras que las variaciones de peso refleja malnutrición reciente y actual.

Algunos han sido descritos para valorar la malnutrición calórica proteica, como el peso para la talla en percentil 50 (Waterlow) y otros como el IMC y el Índice de Shukla se orientan más a la estimación de sobrepeso y obesidad. (Leis Trabazo y Sierra Salinas, 2004)

1. LOS ÍNDICES PONDERALES

Estos índices relacionan el peso con alguna potencia de la talla o ala inversa, son sencillos rápidos y económicos, en general el índice de masa corporal o índice de Quetelet es considerado el más recomendable.

El IMC es un índice que expresa una relación entre el peso y la altura de cualquier individuo, constante y similar en todas las poblaciones.

Se calcula mediante la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg.)} / \text{Talla}^2 \text{ (metros)}$$

No existe un criterio uniforme para delimitar los intervalos de normo-peso y sobre-peso, según los valores del IMC.

Se tienden a aceptar, como punto de corte para definir la obesidad, valores para el IMC mayores de 30. La WHO ha propuesto una clasificación del grado de obesidad utilizando este índice ponderal como criterio (WHO, 1998):

- Bajo Peso : <18.5
- Peso adecuado: 18.5 - 24.9
- Sobrepeso u Obesidad grado I: 25 - 29.9
- Obesidad grado II: 30 - 34.9
- Obesidad grado III: 35 - 39.9
- Obesidad grado IV: >40.

Por su parte la SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad) en su último documento de consenso, publicó una revisión de la clasificación del sobrepeso y obesidad según el IMC, que incluye 2 categorías para el sobrepeso y otras 4 para la obesidad (SEEDO, 2000).

2. ÍNDICE DE WATERLOW

El índice de Waterlow también es muy utilizado en la antropometría infantil y consta de dos partes:

W1: porcentaje de peso esperado para la talla en percentil 50. Su reducción es indicativa de malnutrición aguda o wasting en inglés. Expresa el peso de un individuo respecto al peso medio de individuos de la misma talla.

W2: porcentaje de la talla para la edad en percentil 50. Su reducción es indicativa de malnutrición crónica o stunting en inglés. Establece la relación entre la longitud actual del paciente y el percentil 50 de longitud para su edad.

3. DENSIDAD CORPORAL (DC) Y % GRASA CORPORAL

EL porcentaje de masa grasa se puede calcular según la ecuación propuesta por Siri (Siri, 1956) con la densidad corporal (DC) en la que intervienen los cuatro pliegues cutáneos ($\Sigma 4PI$), según la fórmula de Brook modificada para niños. (Brook, 1972).

$$DC \text{ varones} = 1,1690 - 0,0788 \times \log \Sigma 4PI.$$

$$DC \text{ mujeres} = 1,2063 - 0,0999 \times \log \Sigma 4PI.$$

Fórmula de Siri: porcentaje de grasa total (%GCT)

$$\% \text{ GCT} = (4.95/DC - 4.5) \times 100.$$

La grasa total (GT) en Kg. se calcula del siguiente modo:

$$GCT = \text{peso} \times (4.95/DC - 4.5).$$

4. ÁREA GRASA DEL BRAZO (AGB)

Estos índices informan sobre los cambios que se producen en los componentes magro y graso del brazo, y se consideran representantes de lo que ocurre globalmente en el organismo. Se considera que el área muscular mide la reserva proteica, mientras que el área grasa mide la reserva energética, por lo

que tienen interés en el estudio de la malnutrición energético-proteica. (Leis Trabazo y Sierra Salinas, 2004)

Ésta se calcula según la fórmula siguiente:

AREA GRASA BRAZO = A. DEL BRAZO - A. MUSCULAR.

$$AGB = AB - AM$$

El área muscular del brazo (AMB) se determina con la fórmula:

$$AMB = \frac{(CB - \pi PT)^2}{4\pi}$$

Donde:

CB: circunferencia del brazo (en cm.).

PT: pliegue tricpital (en cm.). (Tanner, 1978)

El área del brazo se determina con la fórmula:

$$AB = \frac{(CB)^2}{4\pi}$$

El AGB se clasifica en los canales de percentiles según los valores nacionales de referencia.

El ÍNDICE ADIPOSEO MUSCULAR se obtiene de dividir el área grasa del brazo entre el área muscular del brazo, este índice sigue un curso paralelo con el porcentaje de grasa corporal y con la masa muscular de un individuo para una determinada edad, es por tanto un buen parámetro para definir obesidad, no una desnutrición (Leis Trabazo y Sierra Salinas, 2004)

$$IAM = AGB / AMB.$$

EL COCIENTE ADIPOSEO MUSCULAR, aporta una información parecida y se obtiene de dividir el grosos del pliegue del triceps (PL T) por el perímetro del brazo (PB).

$$\text{CAM} = \text{PL. T} / \text{P B.}$$

5. ÍNDICES RELATIVOS A LA DISTRIBUCIÓN DE LA GRASA

Las medidas generales de obesidad como el IMC o la DC, en ocasiones son insensibles como indicadores de riesgo de complicaciones metabólicas y enfermedad, siendo preciso utilizar otro tipo de índices que den importancia a dónde se localiza la grasa dentro del cuerpo.

Son índices de este tipo el índice cintura/cadera, que relaciona el perímetro de la cintura con el de la cadera y que se correlaciona con el patrón lipídico y con la tasa de mortalidad. Sin embargo se necesitan más estudios en niños para la utilización de este índice, ya que la morfología corporal varía mucho durante la infancia, no apreciándose los tipos de obesidad tipo androide o ginecoide hasta la pubertad.

De estos tipos de índices, el que es considerado un buen índice de distribución de grasa en la infancia es el índice tronco - extremidad, que se obtiene del cociente entre pliegue subescapular y pliegue del tríceps y que tiene una correlación positiva con el riesgo cardiovascular.

LA ANALÍTICA: PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Existen múltiples y variados análisis analíticos encaminados a determinar el estado nutricional.

ANALÍTICA BÁSICA

*Hemograma: la serie roja permite valorar anemias, y el volumen corpuscular medio permite sospechar el déficit que genera la anemia. La anemia por déficit de hierro es microcítica, mientras que la anemia por déficit de b₁₂ es macrocítica. En la serie blanca, una linfopenia en ausencia de enfermedades hematológicas e infecciones, puede sugerir déficit inmunitario por desnutrición.

* Función renal: urea y creatinina indican función renal con vistas al aporte hídrico y proteico de la dieta. En su caso es también un indicador de hipercatabolismo. Así mismo la excreción urinaria de creatinina es un marcador de reserva muscular (masa magra).

* Glucemia: la diabetes condiciona el aporte energético, tipo de dieta y el fraccionamiento en su distribución.

* Proteínas plasmáticas: la Albúmina, cuando no existe cirugía reciente, insuficiencia hepática y nefropatía, es un parámetro interesante en la desnutrición crónica por gozar de una vida media de 20 días. Valores entre 3,5-2,8 g/dl sugieren desnutrición leve, entre 2,7-2,1 g/dl desnutrición moderada y por debajo de 2,1 g/dl desnutrición grave. Las lipoproteínas se encuentran disminuidas en la desnutrición. La prealbúmina, posee una vida media de solo 2 días y es por tanto útil para monitorizar depleción aguda, sirviendo como factor pronóstico. La proteína transportadora de retinol, tiene una vida media de 12 horas, presentando por tanto características similares a la prealbúmina, pero por su gran sensibilidad al estrés y por su alteración con la función renal es de poca utilidad clínica

* Hierro y ferritina: junto con la valoración de la serie roja (hematíes, Hb, Hto, VCM y VCMH) permiten presumir la

presencia y tipo de anemia. La transferrina es una globulina beta que transporta hierro en el plasma, tiene una vida media de 8-10 días, pero posee escaso valor como marcador nutricional.

* **Función hepática:** transaminasas, bilirrubina, γ -GT, F. alcalina y la protrombina son indicadores de función hepática. Para poder valorar las alteraciones en las proteínas como la albúmina, la transferrina o la prealbúmina es necesaria una función hepática conservada.

* **Equilibrio hidroelectrolítico:** permite detectar desequilibrios electrolíticos y del agua para su posterior modificación dietética.

* **Vitaminas y minerales:** Pese a que no son utilizados con frecuencia, también son indicadores bioquímicos del estado nutricional, soliendo afectarse en los casos de malnutrición. Las vitaminas en especial el complejo B y las vitaminas A, D y C, los minerales y elementos traza fundamentalmente calcio, fósforo, cinc, cobre, selenio, magnesio y yodo suelen disminuir en casos de malnutrición.

VALORACIÓN INMUNOLÓGICA:

Como se detalla en capítulos anteriores existe una relación entre el estado nutricional y el estado inmunológico de un individuo. El estado inmune se puede medir de diversas formas, una clásica es mediante un test cutáneo de hipersensibilidad.

Una anergia cutánea o un retraso de la respuesta a la inyección intradérmica de antígenos es significativo de malnutrición moderada o severa.

También la inmunidad celular se afecta en casos de malnutrición, por lo que es útil en la valoración del estado nutricional calcular el número de linfocitos, o sus poblaciones, la relación $CD4/CD8$, las inmunoglobulinas y la función del

complemento. De hecho la malnutrición es la causa más frecuente de inmunodeficiencias secundarias.

ESTIMACIÓN DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Se incluyen en este apartado diversos métodos encaminados a determinar los niveles de ingesta de nutrientes para poder estimar su adecuación. Las Ingestas Recomendadas pueden definirse como los niveles de ingesta de nutrientes esenciales que, sobre la base del conocimiento científico, se juzgan adecuados para mantener los requerimientos nutricionales de prácticamente todas las personas sanas (NRC, 1989).

En principio, para valorar el consumo de alimentos, se pueden utilizar datos de disponibilidad de alimentos, datos de consumo (a nivel familiar e individual) y dietas duplicadas. (Kroes *et al.*, 2002, Urieta Guijarro 2004).

1. DATOS DE DISPONIBILIDAD DE ALIMENTOS

Los datos de desaparición de alimentos facilitan unas estimaciones anuales groseras de la disponibilidad nacional de alimentos. Estos datos se calculan en Hojas de Balance que recogen la producción nacional, exportaciones, importaciones, almacenamiento y utilización agrícola e industrial. El resultado es una estimación media per. cápita independientemente de factores como el sexo o la edad. En general, los datos de disponibilidad de alimentos, suponen una sobre-estimación grosera del consumo medio potencial.

A pesar de sus limitaciones, las Hojas de Balance son útiles porque indican los aspectos inadecuados de la disponibilidad de alimentos y facilitan indicaciones de cambios indeseables en términos de un efecto potencialmente adverso sobre la salud. Como consecuencia de su uso a lo largo de la historia, son especialmente útiles para evaluar tendencias y la exposición a residuos de plaguicidas y contaminantes. (Urieta Guijarro, 2004)

2. DATOS DE CONSUMO DE ALIMENTOS

2.1. ENCUESTAS DE PRESUPUESTOS FAMILIARES

Aunque las Encuestas de Presupuestos Familiares también estiman disponibilidad de alimentos, más que consumo de alimentos, a diferencia de las Hojas de Balance, en las Encuestas de Presupuestos Familiares se puede obtener información sobre patrones de consumo de alimentos (y nutrientes) en subgrupos de hogares. La mayoría de ellas, incluyen sólo los gastos en comidas realizadas en el hogar. Este tipo de datos ocupan una posición intermedia entre las Hojas de Balance y las encuestas individuales de consumo de alimentos.

2.2. ENCUESTAS INDIVIDUALES

A diferencia de las hojas de balance y las encuestas familiares, las encuestas individuales facilitan información relativa al consumo medio de alimentos y nutrientes y su distribución en grupos de individuos bien definidos. Estos datos reflejan más adecuadamente el consumo real.

Para recoger datos de ingesta de alimentos a nivel individual se pueden utilizar varios métodos.

Estos pueden dividirse en 2 categorías: registro y recuerdo.

Los métodos de registro recogen información relativa al consumo actual de alimentos durante uno o más días. El paciente va anotando la ingesta de alimentos que realiza incluyendo medidas de consumo.

Los métodos de recuerdo reflejan el consumo pasado y pueden variar desde el consumo durante el día anterior (recuerdo de 24 horas) al consumo habitual de alimentos (historia dietética o frecuencia de consumo) (Biró *et al.*, 2002; Urieta Guijarro, 2004.).

3. INFORMACIÓN DE INGESTA ACTUAL

3.1. REGISTRO DE ALIMENTOS

El registro de alimentos o diario de alimentos se mantiene durante un período de tiempo determinado, normalmente de 1 a 7 días. Si se necesita conocer la ingesta total de energía y nutrientes, será necesario incluir todos los alimentos consumidos durante las comidas y entre horas de forma cuantitativa. En general, se considera recomendable realizar un registro de 3 días cuidando la distribución aleatoria de los días considerados, de manera que puedan apreciarse las variaciones estacionales y entre los días de la semana (Bingham *et al.*, 1988). Se ha demostrado que los dos primeros días de registro dan resultados válidos para todos los nutrientes estudiados, excepto las proteínas. La validez mejora al incluir un día festivo, ya que en muchos casos la dieta de los días festivos difiere de la seguida los días laborables por lo que se mejora la estimación del consumo de proteínas (Gersovitz *et al.*, 1978). En un método de registro preciso, el participante anota el peso de todos los ingredientes utilizados en la preparación de las comidas, así como de las partes no comestibles, el peso total cocinado de la

porción individual y el peso del plato. Este método es considerado a menudo como el método de evaluación de la ingesta dietética más exacto y por eso suele emplearse como método de referencia para validar otras técnicas. Los mejores resultados se obtienen cuando los alimentos ingeridos en el hogar se cuantifican por pesada y los ingeridos fuera del hogar, se describen utilizando medidas caseras (Kim *et al.*, 1984; Pao y Cypel, 1996). Sin embargo, requiere un gran esfuerzo por parte de los participantes y existe tendencia a modificar e incluso disminuir la ingesta habitual de alimentos durante el proceso de registro (Biró *et al.*, 2002; Urieta Guijarro 2004).

3.2. RECUERDO 24 HORAS

En el recuerdo de 24 horas, el sujeto es interrogado por un entrevistador entrenado con el fin de que recuerde y describa los alimentos y bebidas consumidos en un pasado reciente, normalmente un periodo máximo de 24 o 48 horas. Las cantidades se registran utilizando medidas domésticas, modelos de alimentos o fotografías. Es un método rápido y barato, aplicable a la mayor parte de las poblaciones y de tasas de respuesta elevadas. Los dos inconvenientes principales de este tipo de registro son: la susceptibilidad a los problemas de memoria y la elevada variación intra-individual o diaria en un mismo individuo (Serra y Ribas, 1995; Urieta Guijarro 2004).

4. INFORMACIÓN DE INGESTA HABITUAL

4.1. HISTORIA DIETÉTICA

Con la ayuda de la historia dietética, un entrevistador preparado puede establecer la ingesta de alimentos usual y el patrón de consumo del individuo. El participante facilita información relativa a su patrón de consumo de alimentos

durante un período de tiempo concreto (normalmente una semana típica.) y también relativa a los alimentos realmente consumidos las 24 horas anteriores. Además, el entrevistador completa una lista de alimentos consumidos normalmente (Hulshof *et al.*, 2003).

4.1. FRECUENCIA DE CONSUMO (FC)

Un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos consiste en una lista estructurada de alimentos individuales o grupos de alimentos. El objetivo es conocer la frecuencia con la que se consumen estos alimentos durante un periodo de tiempo concreto (diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. Las ventajas de este método pueden resumirse diciendo que es una herramienta útil para tipificar el consumo habitual en una población determina, es relativamente fácil de utilizar y no altera los hábitos de los participantes (Biró *et al.*, 2002).

5. DIETAS DUPLICADAS

El método de dieta duplicada difiere de los anteriores en que la estimación de la ingesta no depende de datos de tablas de composición o bases de datos nutricionales. La concentración de los nutrientes de interés se mide mediante análisis químico de la dieta duplicada. Este método es especialmente útil para estimar la ingesta de nutrientes cuando no se dispone de datos de consumo de alimentos nacionales o cuando se lleva a cabo una investigación relativa a un sub-grupo de la población (WHO, 1999). Junto al método de registro de alimentos, la dieta duplicada es el que refleja de una forma más precisa la medición del consumo actual de los individuos (WHO, 1985). Sin embargo, este método requiere un gran esfuerzo por parte de

los participantes y durante su realización existe el riesgo de que se modifiquen los hábitos de consumo (Kroes *et al.*, 2002).

ERRORES Y SEGOS DE LA ESTIMACIÓN DE CONSUMO

Cualquier estimación de consumo de alimentos, lleva asociada ciertos errores que pueden ser sistemáticos o aleatorios (Kroes *et al.*, 2002). Independientemente del método empleado, el hecho de medir el consumo de alimentos altera el comportamiento de los participantes y por tanto su consumo (Livingstone *et al.*, 1990). Además, la infravaloración observada en determinados grupos, varía para diferentes componentes de la dieta. Así por ejemplo, el alcohol y la grasa son componentes susceptibles de ser infraestimados.

Se pueden producir errores en la cuantificación por pesos equivocados de alimentos o errores por afectación de memoria o por errores en la codificación, o errores por la variación estacional, por sesgo de muestreo...etc. etc.

Los errores se introducirán, por ejemplo, al convertir los alimentos en nutrientes utilizando tablas de composición de alimentos.

La evidencia sugiere que no se pueden obtener estimaciones de consumo de alimentos retrospectivas sin sesgo (Bingham, 1987; Urieta Guijarro 2004).

Los diferentes métodos pueden llevar asociados diferentes tipos de errores. Así por ejemplo, los métodos basados en la memoria como el de recuerdo de 24 horas, son más susceptibles a errores en las respuestas, los métodos basados en registro

pueden llevar asociados cambios en la dieta, etc. (Biró *et al.*, 2002).

Con el fin de poder garantizar que el método utilizado mide lo que dice estar midiendo, es necesario validar el método empleado.

El método de referencia empleado suele ser el de registro de alimentos (Kigutha, 1997, Kroke *et al.*, 1999). Sin embargo, los biomarcadores son potencialmente las mejores medidas para validar un método de estimación de consumo de alimentos y pueden asociarse con menores errores aleatorios que los encontrados cuando se observa la ingesta dietética de los individuos. (Urieta Guijarro, 2004)

CONVERSIÓN DE ALIMENTOS A ENERGÍA Y NUTRIENTES

Las tablas de composición de alimentos son una de las herramientas esenciales en los estudios de epidemiología nutricional, tanto de carácter etiológico como aplicados a la nutrición comunitaria (Mataix y Llopis, 1995).

Incluyen alimentos tanto crudos como preparados para su consumo y los describen en cuanto a su composición nutricional es decir, reflejan la cantidad de nutrientes de la porción comestible de los mismos. Los nutrientes analizados varían de unas tablas a otras pero fundamentalmente incluyen macronutrientes (grasa, proteína, hidratos de carbono), minerales, oligoelementos y vitaminas.

En España, las tablas de composición más utilizadas por los profesionales de la Nutrición son las del Instituto de Nutrición (Instituto de Nutrición (CSIC),).

Actualmente, sin embargo, la mayoría de ellas se encuentran en formato informático y se denominan Bases de Datos de composición de alimentos.

VI. MÉTODOS PARA LA VALORACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

ENSAYO COMET:

1. SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS

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.

De todos estos procedemos a explicar el Comet test, que es el que hemos utilizado en nuestro trabajo para la medición del daño en el ADN celular en los linfocitos de nuestros pacientes

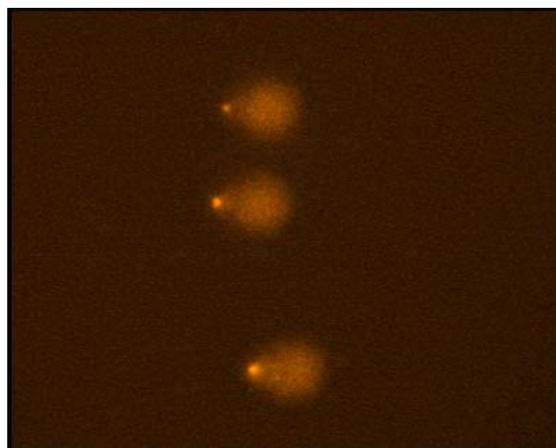
El ensayo de electroforesis en gel de células individuales (single-cell gel electrophoresis assay) o "Ensayo Comet" es un método simple, rápido y sencillo para medir daño en el ADN de

células eucariotas (animales y vegetales) individuales, así como en pequeñas muestras de tejido (Duthie, 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, 2004).

Se trata de un método adaptado de la técnica de electroforesis en microgel de Östling y Johanson (Östling y Johanson, 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.

Imagen 2.3: Fotografía de tres cometas resultante de la migración del ADN dañado de linfocitos de sangre periférica (Ensayo Comet Alcalino)



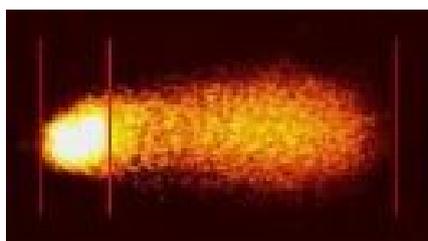
Las variantes más comunes de ensayo comet son: comet alcalino, comet neutro, y uso de enzimas lesión-específicas. El ensayo comet alcalino es el resultado de la modificación llevada a cabo por Singh y colaboradores (Singh *et al.*, 1988), quienes optimizaron la desnaturalización alcalina del ADN y las 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, 2003; Collins, 2004).

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

2. ENSAYO COMET ALCALINO

La técnica usada en nuestro estudio es el Ensayo Comet Alcalino (Alkaline single-cell gel electrophoresis). De forma general, el ensayo comet alcalino cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporar la 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 2.4: Estructura del cometa



Cuando se embebe 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, 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, 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 etidio (BE) es probablemente el más usado, seguido del 4,6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (Collins, 2004). También hay otros colorantes como el ioduro de propidio, naranja de acridina, Hoechst 33258 (Duthie, 2003), SYBR Green I y YOYO-I (Hartmann *et al.*, 2003).

Imagen 2.5: Diferentes grados de daño en el ADN



La medida de los cometas se puede llevar a cabo mediante un recuento manual o bien haciendo un análisis de imagen. El recuento mediante análisis de imagen se hace a través de una serie de paquetes de software disponibles en el mercado. En nuestro estudio el análisis se realizó con una cámara Hitachi (Standard Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK).

Imagen 2.6: resultados gráficos obtenidos mediante programa informático.

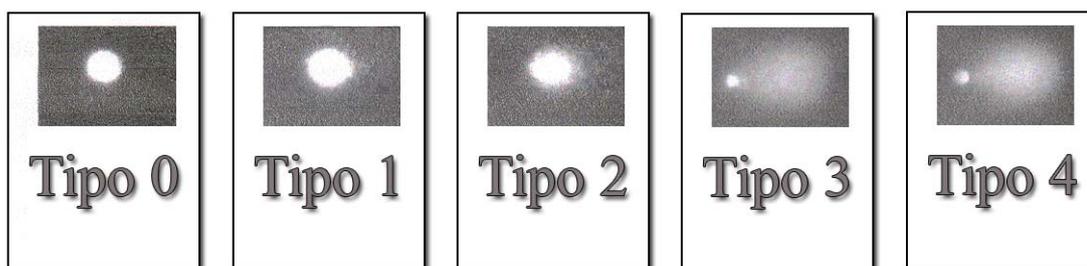


Estos programas nos dan una gran variedad de parámetros relativos a los cometas. Los más usados son la longitud de la cola, intensidad relativa de fluorescencia (normalmente expresado como porcentaje de ADN en la cola), momento de la cola (producto del porcentaje del ADN en la cola y la longitud de la 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, 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 2.7: 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 que en los anteriores y con una intensidad mucho menor, 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, 2003; Collins, 2004).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. Selección 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 a estudio. 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 90 niños, con edades comprendidas entre los 0 y 14 años, atendidos en el servicio de Pediatría del Hospital Materno Infantil (HMI) del Hospital Universitario Virgen de las Nieves en Granada.

Los niños se catalogaron en tres grupos, según su estado de salud - enfermedad. La selección de los niños con enfermedades agudas se realizó aleatoriamente entre los niños ingresados en las salas de Lactantes y Preescolares del HMI. Los niños con enfermedades crónicas se seleccionaron aleatoriamente entre los niños atendidos por las consultas externas de este mismo hospital. Los niños del grupo control, donde se incluyeron pacientes sanos, fueron seleccionados entre familiares de los niños de los otros grupos experimentales. Generalmente se utilizaron como grupo control, hermanos o familiares próximos de pacientes ingresados en nuestro hospital, que habían sido seleccionados como controles, aunque en algunos casos se incluyeron también como controles voluntarios sanos.

Se consideró criterio de exclusión del grupo control el padecer alguna de las siguientes enfermedades crónicas: cáncer, diabetes, insuficiencia renal, enfermedades hepáticas: insuficiencia hepática grave, enfermedad del aparato digestivo: mal absorción, resección de parte del aparato digestivo, enfermedad celíaca, síndrome de colon irritable..., o el consumo de fármacos que pudiesen interferir con los resultados del estudio por modificar el apetito o la ingesta de alimentos. Las enfermedades agudas infecciosas también fueron criterio de exclusión, y se considero como tiempo límite para la inclusión en el grupo de control la no presencia de enfermedad aguda en los últimos 30 días.

Se recolectaron casos hasta la obtención de un total de 90 niños, admitiendo 30 niños por grupo, pero posteriormente debido a falta de seguimiento, incumplimiento de citas, pérdida de muestras, o alta voluntaria del estudio solo un total de 75 niños se incluyeron en el análisis estadístico final.

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

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 los pacientes firmaron un consentimiento informado. (Anexo 1)

Al tratarse de menores de edad este formulario fue firmado por el padre o representante legal, pero se disponía de un modelo de consentimiento informado par el "menor mayor ", donde se le explica al niño y se le hace participe de la decisión de entrar o no en el estudio. Estos formularios han sido revisados y aceptados por el comité de ética de nuestro hospital.

El trabajo de campo, las entrevistas con los pacientes, la realización de las diversas pruebas complementarias, la exploración física y la antropometría, se llevó a cabo entre enero de 2004 y diciembre de 2005.

En todos los casos, como compensación por el esfuerzo que supone para los niños y los padres el incluirse en el estudio, someterse a las pruebas físicas y antropométricas y rellenar el cuestionario, se ofreció a los padres un informe individualizado sobre las características de la dieta (ingesta de alimentos, energía y nutrientes y comparación con las ingestas recomendadas) y unas recomendaciones básicas sobre las posibles mejoras que se podían introducir para conseguir una

mejora de la alimentación, así como los resultados analíticos y antropométricos cuando se solicitaron.

2. Características de la muestra

La muestra final se componía de un total de 75 niños distribuidos como queda reflejado en las siguientes tablas y figuras gráficas

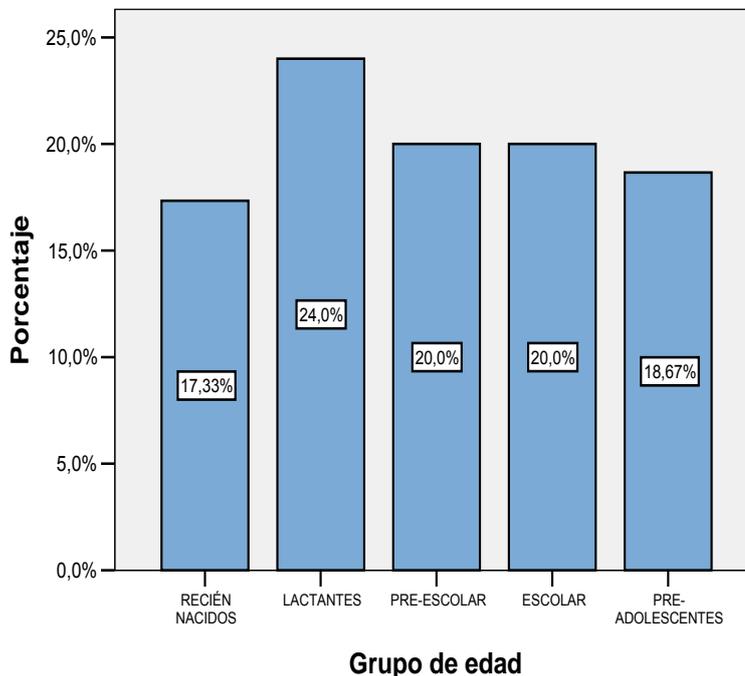
DISTRIBUCIÓN POR EDAD

1. Recién Nacidos: desde el nacimiento al mes de vida.
2. Lactantes: del mes de vida a los 23 meses.
3. Preescolares: de los 2 a los 5 años
4. Escolares: de los 6 a los 10 años.
5. Preadolescentes: de los 11 a los 15 años.

Tabla 3.1: Distribución de la muestra por edad

	Frecuencia	Porcentaje (%)
RECIÉN NACIDOS	13	17,3%
LACTANTES	18	24,0%
PRE-ESCOLAR	15	20,0%
ESCOLAR	15	20,0%
PRE-ADOLESCENTES	14	18,7%
Total	75	100%

Figura 3.1: Distribución gráfica de la muestra por edad

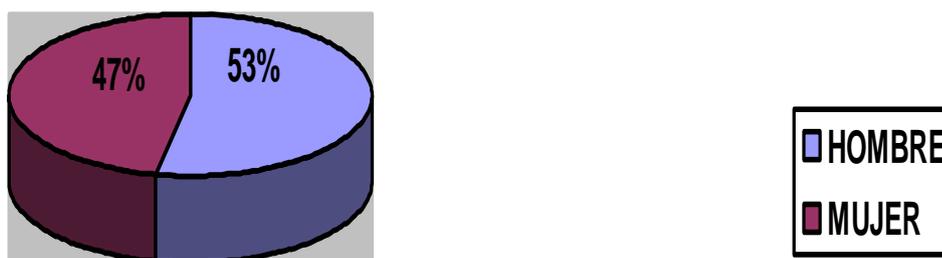


DISTRIBUCIÓN POR SEXO:

Tabla 3.2: Distribución por sexo.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	mujer	35	46,7%
	hombre	40	53,3%
	Total	75	100,0%

Figura 3.2. Distribución gráfica por sexo.



Distribución por patologías

Tabla 3.3: Distribución por patologías.

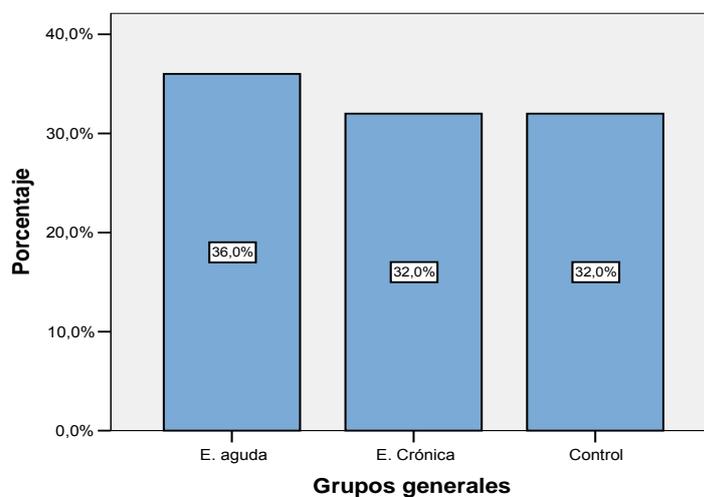
	Frecuencia	Porcentaje
ENF. INFECC. AGUDA	19	25,3%
VIH	4	5,3%
ALT. SISTEMA INMUNE	3	4,0%
ATAXIA TELANGIECTASIA	6	8,0%
ENF. CRÓNICAS	7	9,3%
DIABETES MELLITUS	2	2,7%
CONTROL	19	25,3%
RN	6	8,0%
CONVULSIONES	6	8,0%
Total	75	100%

Distribución por agrupación de patologías

Tabla 3.4: Distribución por agrupación de patologías.

	Frecuencia	Porcentaje
E. aguda	27	36,0
E. Crónica	24	32,0
Control	24	32,0
Total	75	100,0

Figura 3.4 Distribución por agrupación de patologías.



3. Programas informáticos

Además de los programas de ofimática habituales (Microsoft Word, Excell, Power point), se han utilizado los siguientes programas informáticos

___Programa encuestas alimentarias: *Alimentación y salud ASDE*.

___Programa estadístico: *SPSS versión 14.0 para Windows*

___Programa del Comet: *software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK)*.

4. MATERIALES PARA LA ANTROPOMETRÍA

La variable peso se midió con una báscula SECA (SECA, Hamburg, Germany) con precisión de hasta 100 gr.

La variable talla se midió en los lactantes y recién nacidos en horizontal con tallímetro específico y en niños más grandes se midió en posición vertical, descalzos y con un tallímetro Holtain (Holtain Ltd, Dyfed, UK) con precisión de fracciones de 0,1cm.

Los pliegues grasos (bicipital, tricipital, suprailíaco y subescapular) se midieron por triplicado con un lipómetro Jonh Bull Skinfold Caliper (British Indicators LTD, England) con amplitud de 0 a 59 mm. Graduación de 0,2 mm y presión constante de 10gr/mm.

Los perímetros y circunferencias se midieron también por triplicado con una cinta métrica flexible e inextensible milimetrada (Fiber Glass, China.)

5. MATERIALES PARA EL ENSAYO COMET

Para la realización del comet test se utilizó un microscopio-UV Leica DMLS con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400. El análisis se realizó con una cámara Hitachi (Standard

Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Como fuente de alimentación se empleó Consort E802 Electrophoresis power supply.

Imagen 3.1: Obtención en el ordenador del ensayo Comet



MÉTODOS

VALORACIÓN NUTRICIONAL

1. RECOGIDA DE DATOS PERSONALES Y ANTROPOMÉTRICOS:

Para la recogida de datos, se realizó una encuesta personal a los familiares de los niños incluidos en el estudio utilizando un cuestionario estandarizado, específicamente creado para este trabajo de investigación. (Anexo 1)

En dicho cuestionario se recogía información básica sobre:

___Datos personales: Se recogió nombre, apellidos, número de historia, dirección y teléfono de los padres

___Datos antropométricos: Peso, talla, Pliegue bicipital, pliegue tricipital, pliegue suprailíaco y pliegue subescapular. Perímetro craneal, circunferencia de cintura y cadera y circunferencia de muñeca y brazo. Las medidas antropométricas en miembros superiores se realizaron sobre el miembro no dominante y en caso de no lateralización (menores de 6 meses) en el brazo izquierdo. Se realizaron tres determinaciones

repetidas, con objeto de disminuir la variabilidad intraobservador, aceptándose como válido el valor medio de las mismas

__Situación fisiológica: Estado de salud y patologías concomitantes.

__Consumo de medicación o suplementos alimenticios y poli vitamínicos

__Actividad física.

__Datos Socio-económicos

__Encuestas alimentarias

2. VALORACIÓN NUTRICIONAL

La valoración nutricional es aquella que permite determinar el estado de nutrición de un individuo, valorar las necesidades o requerimientos nutricionales y pronosticar los posibles riesgos de salud que pueda presentar en relación con su estado nutricional.

Como se explica en capítulos anteriores estas diferentes técnicas de valoración de la composición corporal surgieron a raíz de las dificultades para valorar el estado de nutrición, sobretudo en pacientes enfermos y obesos. Para valorar el estado nutricional se precisa una anamnesis básica dirigida,

unos parámetros antropométricos y unos parámetros bioquímicos elementales.

2.1. ANAMNESIS BÁSICA:

El interrogatorio se realizó en presencia del niño al familiar encargado de la alimentación del niño, madre o abuela, se realizó un cuestionario básico dirigido a obtener información sobre los siguientes aspectos:

- **Apetito:** presencia de anorexia o intolerancia a los alimentos.
- **Masticación y deglución:** capacidad de masticar, estado de la dentadura, función deglutoria y consistencia de alimentos que se toleran.
- **Funcionalidad del aparato digestivo:** presencia de diarrea/ estreñimiento, vómitos, intolerancias digestivas (reflujo gastroesofágico, intolerancia a PLV., etc).
- **Enfermedad actual:** que pueda indicar un tipo determinado de dieta terapéutica y la forma de su administración.
- **Antecedentes personales:** cirugía previa, especialmente digestiva, que pueda limitar la pauta dietética (gastrectomías, ostomías, resecciones intestinales, bridas, etc) y otras enfermedades crónicas de base que modifiquen el apetito, la tolerancia digestiva o requieran modificaciones específicas de la dieta (diabetes, celiaquía, hiperlipemias, insuficiencia renal, hepática, pancreática, respiratoria o cardíaca, etc).
- **Tratamiento farmacológico:** medicación gastrotóxica, anorexígenos u otros que deban tenerse en cuenta. Consumo de suplementos (vitaminas hierro...)

2.2. EXPLORACIÓN FÍSICA Y ANTROPOMETRÍA

Para una valoración antropométrica es preciso realizar una exploración física básica, centrándose en los aspectos más relacionados con la nutrición.

A todos los niños se les realizó una exploración física general y por aparatos, para detectar la presencia de posible patología orgánica no detectada previamente. Se hizo especial interés en:

Aspecto ponderal: Obesidad, normo peso, delgadez o caquexia.

Es importante mencionar que el exceso de peso no es sinónimo de buen estado nutricional ya que existen procesos agudos hipercatabólicos que comportan depleción proteica permaneciendo elevado el compartimiento graso. También el sobrepeso puede ser compatible con carencias nutricionales a causa de una dieta hipercalórica desequilibrada.

Estado de hidratación: Necesario para establecer el aporte de agua de la dieta, incluso la necesidad de complementar con sueroterapia. Debe observarse las mucosas, el signo del pliegue y la diuresis.

Coloración de mucosas: piel y mucosas orientan sobre presencia de anemia.

2.3. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

Son múltiples y variados los parámetros de valoración nutricional que pueden aplicarse pero en cualquier caso, ni los más sofisticados son más útiles que los simples, ni existe parámetro alguno que por sí mismo tenga valor patognomónico de desnutrición. El estado nutricional debe valorarse por un conjunto de parámetros donde la experiencia observadora juega

un papel fundamental cuando los medios disponibles son limitados. Es muy importante el entrenamiento y la minuciosidad del explorador en la toma de las medidas para su validez. (Fernández-Tardáguila, 2004)

La realización de las mediciones se llevo a cabo de la siguiente manera:

- **Peso:** el individuo colocado de pie, encima de la plataforma de una báscula de precisión previamente equilibrada, desprovisto de ropa a excepción de la ropa interior s. Se anotó la medida en kilogramos con dos decimales.
- **Talla:** de pie, con los pies desnudos y juntos de forma que contacten los maleolos internos o estén lo más próximos posible. Los brazos deben estar relajados, con las palmas de las manos mirando hacia los muslos. La posición de la cabeza debe situarse con el plano de Frankfurt, que une el borde inferior de la órbita de los ojos y el superior del meato auditivo externo, paralelo al suelo. Los talones, nalgas y espalda deben estar en contacto con la pieza vertical del aparato medidor. Para realizar la medida se desliza la tabla horizontal del tallímetro de precisión hasta tocar la cabeza del sujeto y aplastar el pelo. La talla se anotó en centímetros, con un decimal.
- **Pliegues cutáneos:** mediante el compás de presión constante de Holtain, cuya precisión es de 0.2 mm. Se anotó la media de dos determinaciones en milímetros, con un decimal.

Imagen 3.2: Demostración del uso del lipocalibrador.



Se midió el grosor del tejido adiposo de los siguientes pliegues cutáneos:

- Pliegue tricpital: el individuo debe colocarse de pie, de espaldas al explorador, con el brazo y antebrazo en extensión y las palmas mirando a los muslos. Se marca el punto medio entre el olécranon y el acromion, pellizcando a un centímetro por encima de ese punto en la zona del tríceps (zona posterior del brazo) durante 1-2 segundos, comprendiendo solo el tejido graso subcutáneo.
- Pliegue bicipital: con el sujeto de cara al explorador, los brazos relajados y las palmas mirando hacia delante. El punto a medir es el situado a un centímetro del cruce entre la línea vertical que une el centro de la fosa antecubital y la cabeza del húmero y la circunferencia del brazo.
- Pliegue subescapular: el sujeto debe situarse de pie, de espaldas al explorador, con hombros y brazos relajados. El pliegue se mide justo por debajo del ángulo inferior de la escápula, en la línea vertical que este determina.
- Pliegue suprailíaco: de pie, de cara al explorador y con los brazos flexionados. Se toma la medida un

centímetro por encima y dos por dentro de la espina suprailíaca anterior.

- Perímetro braquial: con el sujeto de pie y estando el antebrazo en flexión 90 grados se traza una línea perpendicular al eje del brazo, equidistante entre el olécranon y el acromion. Sobre esa línea y ya con los brazos extendidos, relajados, se coloca la cinta métrica flexible rodeando toda la circunferencia del brazo, sin comprimir los tejidos.
- Perímetro craneal: rodeando la cabeza del niño con la cinta métrica se toma el valor situándose entre las prominencias de las mastoides, consiguiendo el perímetro mayor posible.
- Cintura: el individuo debe colocarse de pie, de espaldas al explorador, con los brazos ligeramente separados del cuerpo, se rodea la cintura del paciente por encima de ambas crestas iliacas, y se toma la medida en centímetros.
- Cadera: el niño debe colocarse de pie, de espaldas al explorador, con los brazos ligeramente separados del cuerpo, se rodea la cadera del paciente por debajo de ambas crestas iliacas, en horizontal a la línea de suelo, y rodeando los glúteos, sin presionarlos se toma la medida en centímetros.(Fernández-Tardáguila, 2004)

2.4. CÁLCULOS ESTIMADOS A PARTIR DE DATOS ANTROPOMÉTRICOS

- Una vez realizada la antropometría podemos obtener diversos índices nutricionales, con los parámetros recogidos. Existen multitud de Índices que aportan valiosa información, pero solo se describirán aquellos que por ser d

de mayor interés en el campo de la pediatría se han utilizado en este trabajo.

El **índice de masa corporal** o **índice de Quetelet** relaciona el peso y la altura. Es el cociente que resulta de dividir el peso (expresado en kilogramos) entre la altura (expresada en metros) elevada al cuadrado. En la infancia es el que representa mejor el peso relativo y aunque al inicio de la pubertad es más exacto el índice P/T^3 , incluso en esta etapa el índice de Quetelet se correlaciona ampliamente con la grasa corporal y se considera adecuado.

Pero tanto el peso como la talla o el IMC, IN o IW nos hablan de globalidad pero no especifican qué componente varía. Puede aumentar o disminuir el peso o el IMC y no ser a expensas de la masa grasa si no de la musculatura. Para ello nos guiamos por los pliegues cutáneos y el perímetro braquial. Estos informan acerca de los cambios producidos en los componentes grasos del tejido celular subcutáneo y magro de la región anatómica explorada. Dando una idea muy aproximada de la composición total del organismo.

A partir del perímetro braquial y del pliegue graso tricipital se puede estimar el componente magro y graso del brazo mediante un cálculo sencillo. Obtendremos así el área muscular del brazo, que mide la reserva proteica y el área grasa del brazo, que estima indirectamente la reserva energética. A través de estas áreas podemos calcular el Índice Adiposo Muscular (área grasa/área muscular) y el Cociente Adiposo Muscular (pliegue tricipital/perímetro braquial). El área muscular del brazo es el que mejor se correlaciona como índice de masa muscular en niños.

$$\text{Área del brazo (AB cm}^2\text{)} = \frac{PB^2}{4\pi}$$

$$\text{Área muscular del brazo (AMB cm}^2\text{)} = \frac{(PB - \pi PT)^2}{4\pi}$$

$$\text{Área grasa del brazo (AGB cm}^2\text{)} = \text{AB} - \text{AMB}.$$

El pliegue subescapular estima la grasa del tronco y obesidad central, mientras que el pliegue tricpital valora la obesidad periférica. El pliegue suprailíaco es representativo del tejido graso subcutáneo de las caderas.

La grasa subcutánea total (que constituye el 50% de la grasa corporal) se representa mediante la suma de los cuatro pliegues cutáneos. Esta suma permite calcular la densidad corporal, masa grasa y masa magra.

Tabla 3.5. Valores de densidad corporal distribuidos por edad y sexo. Fórmulas según Brook, 1971.y Durnin y Rahaman, 1967.

Sexo	Edad (años)	Densidad corporal
Varón	1-11	1.1690-0.0788 x log suma de 4 pliegues
	12-16	1.1533-0.0643 x log suma de 4 pliegues
Mujer	1-11	1.2063-0.0999 x log suma de 4 pliegues
	12-16	1.1369-0.0598 x log suma de 4 pliegues

También usamos en este trabajo los cálculos de la grasa corporal total obtenidos de la siguiente manera Fórmulas según: Brook, 1971 y Siri, 1956.:

$$\% \text{ GCT} = [(4.95/\text{densidad corporal}) - 4.5] \times 100$$

$$\text{GCT} = [(4.95/\text{densidad corporal}) - 4.5] \times \text{peso}$$

$$\text{Masa magra} = \text{PESO} - \text{GCT}$$

2.5. REGISTRO DE ALIMENTOS

Para la recogida de datos de consumo de alimentos, se aplicó el método de registro de consumo de alimentos aplicado durante como mínimo la media de dos días, incluyendo un festivo.

Los datos se rellenaron en presencia del niño y del encargado de su alimentación (generalmente la madre). Para facilitar la encuesta se enseñaban a las madres fotografías de alimentos para estimar la cantidad, con platos de distintos tamaños y formas.

A continuación, se procedió al tratamiento informático de los datos dietéticos., mediante la conversión de los datos recogidos en la encuesta alimentaria a valores nutricionales concretos, como el número de kilocalorías consumidas, el porcentaje sobre las ingestas recomendadas y el consumo de los principales macro y micronutrientes (oligoelementos, iones y vitaminas).

3. ANALÍTICA:

Existen múltiples y variados análisis analíticos encaminados a determinar el estado nutricional, como hemos mencionado anteriormente. En nuestro estudio se obtuvieron los siguientes parámetros analíticos:

ANALITICA BÁSICA:

Hemograma completo con fórmula y bioquímica consistente en glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol total y fracciones GOT, GPT, GammaGT, CPK, pre-albúmina, hierro, ferritina, e iones (sodio, potasio y cloro).

ANÁLITICA ESPECÍFICA

Se realizó un estudio inmunológico básico, obteniendo inmunoglobulinas del tipo IGG, IGA, IGM, y también subpoblaciones linfocitarias. Así mismo se realizó un estudio hormonal básico obteniéndose hormona de crecimiento (GH basal e IGFB3) y perfil tiroideo (TSH basal, FT3 y FT4). También se analizó la leptina sérica.

3.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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.

La extracción se realizó en el laboratorio de extracciones del hospital materno infantil, y en la planta de pediatría 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.
- 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.
- 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.

3.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS:

Para la determinación del hemograma y la bioquímica básica se utilizó el material del laboratorio de urgencias del Hospital materno infantil de Granada.

Los datos de bioquímica más específicos y el perfil inmunológico 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.

Las subpoblaciones linfocitarias se obtuvieron en el Laboratorio de Inmunología y la analítica hormonal se realizó en el laboratorio de RIA de MEDICINA NUCLEAR de dicho centro.

La leptina sérica se determinó en un centro externo, en el Laboratorio Balagué en Barcelona.

4. COMET TEST

Con el fin de cuantificar el daño oxidativo presente en los linfocitos de sangre periférica de nuestros pequeños pacientes, 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).

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 una solución estéril de Suero bovino fetal al 10% (Sigma-Aldrich) y medio modificado RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) en proporción 1:9 respectivamente. Se agita todo de manera suave y se mantiene 30 minutos a 4°C y oscuridad. Transcurrido este tiempo, depositamos suavemente en el fondo del eppendorf 100µl de Histopaque-1077-1 (Sigma Diagnostics, INC) y llevamos a centrifugar a 200g durante 3 minutos (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 10x (GIBCO Invitrogen) a pH 7.4, acto seguido centrifugamos a 200g durante 3 minutos (4°C y oscuridad).

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% (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.

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 1h y a una temperatura de 4°C para eliminar las proteínas celulares.

4.- Tratamiento alcalino

Posteriormente se colocan 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, 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 electroforetico con un voltaje de entre 0.7 y 1.0 V/cm, con un amperaje no superior al 300mA. El tiempo de electroforesis no supera los 30 minutos y se mantienen los 4°C..

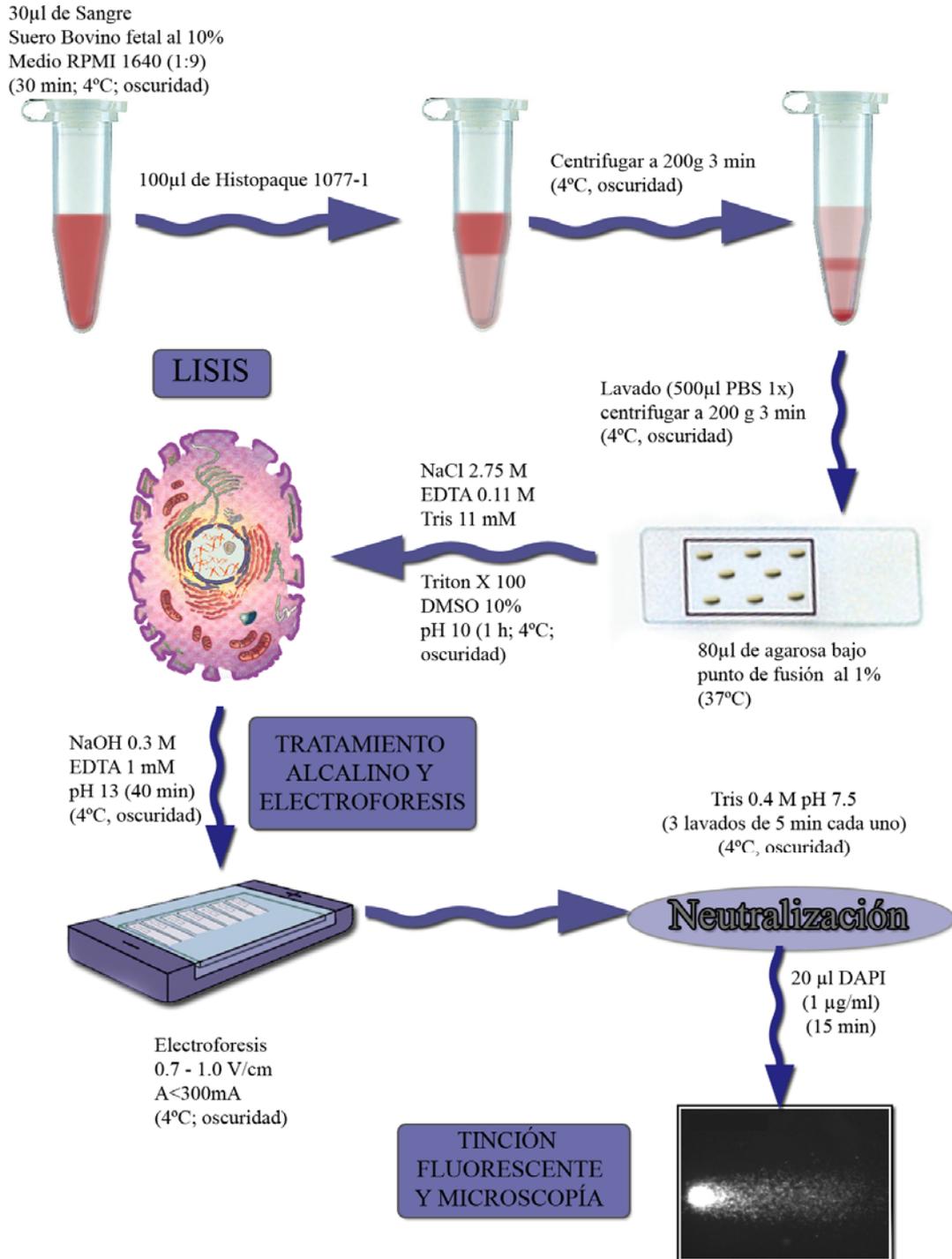
6.- Neutralización

Una vez terminada la electroforesis, se necesita neutralizar el álcali de los geles lavando los portaobjetos con una 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.

7.- Tinción del ADN y visualización de los cometas

Finalizado el proceso de neutralización, se realiza la tinción de las muestras usando 1mg/ml de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Quince minutos después de añadir el colorante fluorescente, se puede comenzar con el recuento de los cometas en el microscopio de fluorescencia.

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



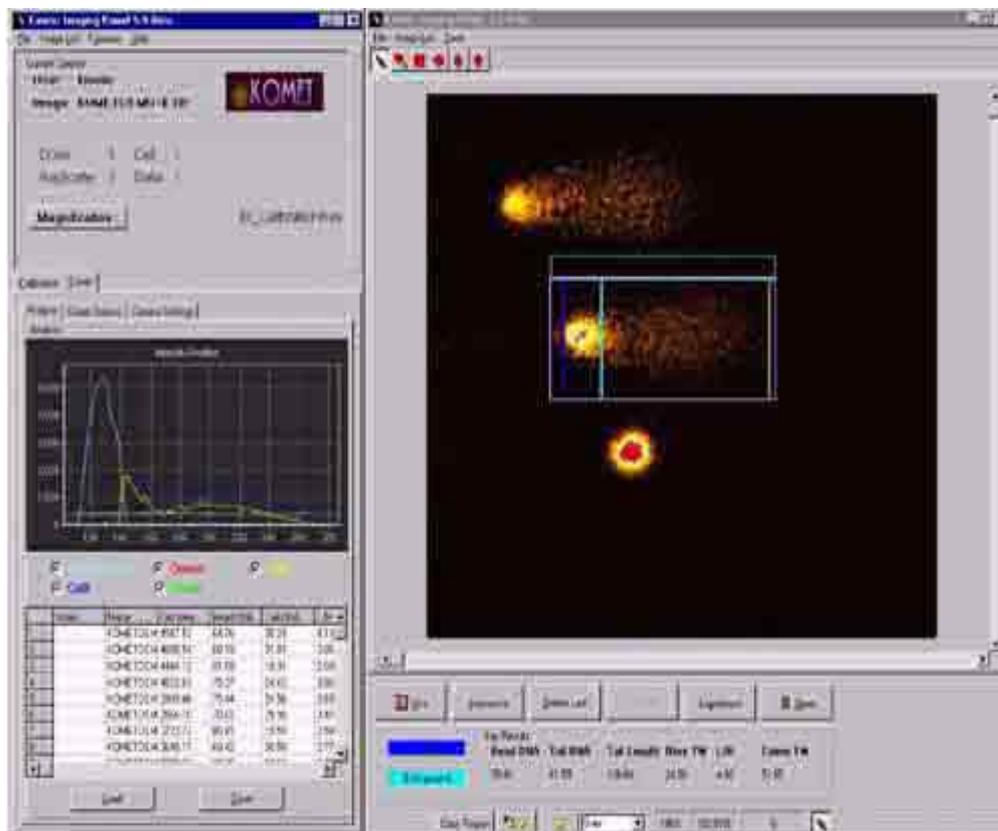
Finalmente la valoración del daño en el ADN cromosómico se puede realizar de diversas maneras como se explica previamente. La medida de los cometas se realiza mediante recuento manual o mediante análisis de imagen.

El cálculo del daño mediante análisis visual se basa en discriminar diferentes grados de daño en función del aspecto que presente el cometa. Existen cinco clases de cometas, numerados del 0 al 4 (Duthie, 2003; Collins, 2004), en función de la forma, tamaño, e intensidad de la cabeza y cola.

Para el análisis de imagen existe una gran variedad de parámetros medibles 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.

El porcentaje de ADN en la cola (% ADN COLA) es la variable comúnmente más utilizada por ser la más sensible y demostrativa. Cuanto mayor sea el porcentaje de ADN localizado en la cola del cometa, mayor es el daño en el ADN cromosómico.

Imagen 3.3: programa informático utilizado para la cuantificación del daño en el ADN en el ensayo comet.



5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para el tratamiento de los datos y discusión de los resultados, se ha seguido el siguiente método de trabajo.

En primer lugar, se ha realizado un tratamiento estadístico con el fin de obtener los parámetros que permiten describir la distribución de valores de las variables estudiadas.

Para determinar la validez de nuestras hipótesis se realizaron las pruebas de significación apropiadas en cada caso, según el número y la calidad de las variables a estudiar. La

prueba de significación informa sobre la probable existencia de un efecto. Cuanto más pequeño sea el valor P menos probable es que el efecto pueda haber sido producido por azar. Se tomaron como significativos valores de p inferiores a 0.05.

Hay que tener en cuenta que para poder plantear pruebas de hipótesis fiables, es necesario que las muestras sean grandes ($n > 30$) o que la distribución muestral siga la Ley Normal. Para algunas de las variables estudiadas, el número de sujetos incluidos es muy pequeño y por tanto se ha comprobado que se trata de una distribución normal mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilks.

A continuación se presentan los diferentes tipos de análisis que se llevaron a cabo para dar resultado a los objetivos y el diseño del estudio propuestos. Se realizó el Análisis Descriptivo para caracterizar a los sujetos de la muestra. El Análisis Bivariante, para el estudio de las posibles asociaciones entre las variables dependientes y las independientes.

Análisis descriptivo de los sujetos del estudio. Se calcularon medias, desviaciones típicas, máximos y mínimos, para las variables cuantitativas con distribución normal, y medianas y rangos intercuartílicos para las variables cuantitativas que no se distribuyen normalmente. Para las variables cualitativas se calcularon frecuencias absolutas y relativas.

Este análisis se hizo globalmente y segmentado por la variable estado de salud (enfermo/control).

Análisis Bivariante: Se aplicaron los test estadísticos necesario dependiendo de las variables a relacionar.

Para la asociación entre la variable dependiente % de ADN en cola (numérica) y las independientes cualitativas se hizo una comparación de medias, para lo que se usó el test de la T-Student o el ANOVA, dependiendo de si las categóricas tenían 2 ó más categorías respectivamente. Cuando la relación a estudio era con variables independientes cuantitativas se hicieron correlaciones.

Para la asociación entre la variable dependiente comet fin (categórica) y las independientes cuantitativas se hizo una comparación de medias, para lo que se usó el test de la T-Student al ser la variable cualitativa de dos categorías. Cuando la relación a estudio era con variables independientes cualitativas se hizo el test de la corrección por continuidad para tablas 2x2 y la Ji-cuadrado en otro caso.

RESULTADOS

RESULTADOS:

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

Los principales factores estudiados en este trabajo, en función de su relación con el daño en el ADN cromosómico, son los siguientes:

Factores analizados:

1. La edad
2. El sexo
3. El estado de salud
 - a. Grupos generales:(sano / enfermo)
 - b. Evolución de la enfermedad:(enf Aguda/enf. Crónica)
 - c. Tipos concretos de enfermedades (enf, infecciosas, neurológicas, inmunológicas....)
4. La toma de medicación
5. El estado nutricional :
 - a. Según parámetros antropométricos
 - b. Según ingesta estimada de nutrientes
 - c. Según parámetros analíticos

En todos estos factores se estudió su posible relación con el daño en el ADN celular estimado en linfocitos de sangre periférica mediante el ensayo comet.

Se usó una variable cualitativa del daño celular expresado según daño celular aumentado o no. Como no existían estudios previos realizados en niños que nos permitiesen establecer cual

es un valor normal de daño celular y cual es un nivel patológico realizamos dentro de nuestro propio estudio un análisis de todos los valores del ensayo comet obtenidos y calculamos un valor de corte para obtener, a partir de los valores numéricos del comet, una variable cualitativa que llamamos "comet fin" y que se define por dos variables: "sí daño" y "no daño". Para determinar la línea de corte en la cual considerábamos un valor como daño celular normal o aumentado se realizó la media del comet de todos los niños estudiados y se consideró como comet positivos, o daño celular aumentado, los que estuvieran por encima de dicha línea de corte y comet negativo o daño celular normal los que permanecen por debajo de ese nivel.

También se utilizó en el estudio una variable numérica cuantitativa del valor de daño celular que fue el % ADN EN COLA, que es un valor numérico que expresa el porcentaje de ADN del cometa que se encuentra en la cola respecto a la cantidad total de ADN, siendo directamente proporcional al daño celular. Como se explica previamente, cuanto más cola tenga el cometa, ya sea valorando la longitud de la cola o bien la cantidad de ADN en la cola, mayor es la fragmentación del material genético y, por tanto, mayor es el daño. Se optó por esta variable numérica del % de ADN en cola, y no por la otra variable estimada del comet que es el OTM (OLIVE TAIL MOMENT= producto de la longitud de la cola por la longitud total del cometa) por considerarse más fácilmente comprensible.

1. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DEL NIÑO Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO

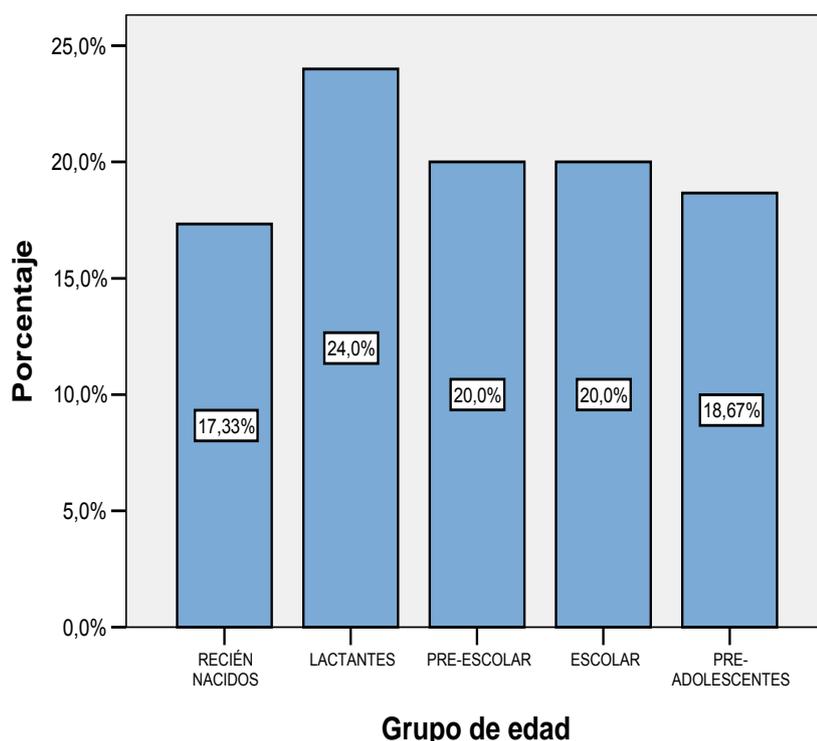
Como queda reflejado en la tabla de resultados 1.a los niños estudiados fueron divididos para realizar el estudio estadístico en cinco grupos según la edad:

Tabla de resultados 1.a: distribución de los grupos experimentales según rangos de edad

GRUPO DE EDAD	Número absoluto	Frecuencia %
RECIÉN NACIDOS	13	17%
LACTANTES	18	24%
PREESCOLARES	15	20%
ESCOLARES	15	20%
PREADOLESCENTES	14	18%
TOTAL	75	100%

Con estas clasificaciones se obtuvieron unos grupos muy homogéneos, cada uno conteniendo entre el 17% y el 24% del total de los niños estudiados.

Gráfico de resultados 1.b: distribución gráfica de los grupos experimentales según los rangos de edad.



El análisis para ver la influencia de la edad en el daño celular se realizó de dos maneras distintas. Con todos los niños juntos independientemente del estado de salud y previa segmentación de los niños según estuvieran sanos o enfermos, para evitar la confusión que la variable estado de salud pudiese crear.

Como queda reflejado en la tabla 1.c no existe ninguna evidencia estadísticamente significativa encontrada mediante la prueba estadística de chi cuadrado, que indique que existe una relación entre el grupo de edad y el daño celular encontrado, cuando analizamos el total de niños sin estratificar por estado de

salud. Mediante el análisis estadístico realizado con prueba de Chi-cuadrado no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad, con valores de p de 0.628 ($p > 0.05$).

Tabla de resultados 1.c: distribución de los valores de daño en el ADN según el rango de edad, representado en valores absolutos y relativos (frecuencia en %).

GRUPO DE EDAD	DAÑO EN EL ADN	NO DAÑO EN EL ADN	TOTAL NIÑOS
RECIÉN NACIDOS	8 (61.5%)	5 (38.5%)	13 (100%)
LACTANTES	8 (44.4%)	10 (55.6%)	18 (100%)
PREESCOLARES	9 (60.0%)	6 (40.0%)	15 (100%)
ESCOLARES	8 (53.3%)	7 (46.7%)	15 (100%)
PREADOLESCENTES	10 (71.4%)	4 (28.6%)	14 (100%)

La siguiente tabla, la tabla de resultados 1.d refleja que no existe ninguna evidencia estadísticamente significativa encontrada mediante la prueba estadística de chi cuadrado, que indique que existe una relación entre el grupo de edad y el daño celular encontrado, cuando analizamos los grupos estratificando según el estado de salud. Con valores de p superiores a 0.05 (0.42 y 0.94.)

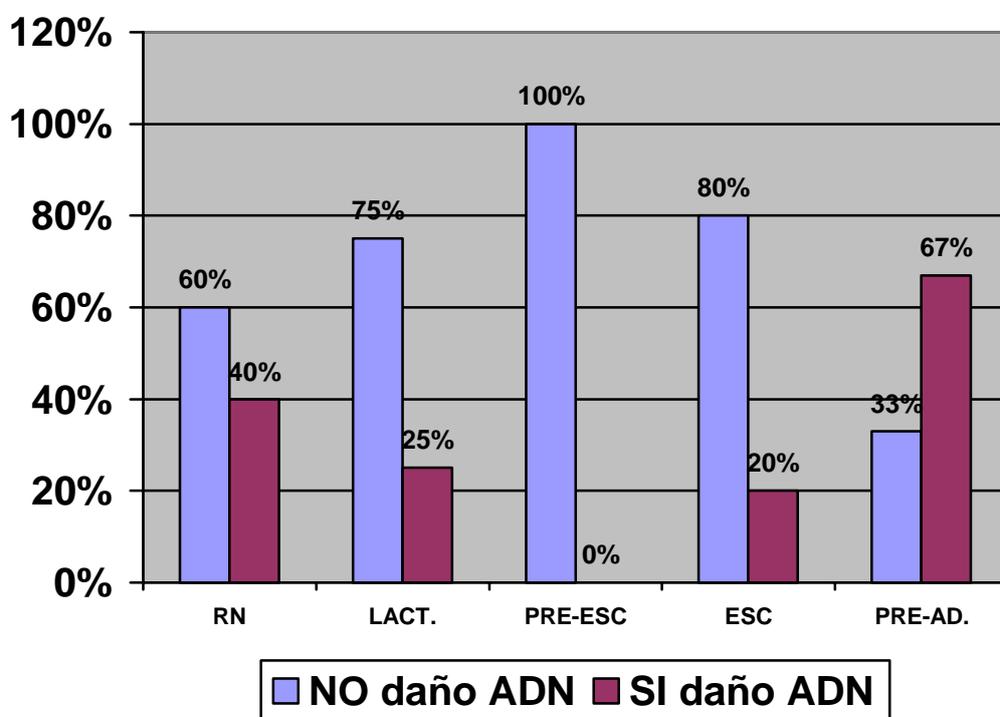
Tabla de resultados 1.d: Resultados de los valores del daño en el ADN según el rango de edad, estratificados por estado de salud, en lo niños estudiados.

		GRUPOS DE EDAD					Total
		R.N.	LACT.	PRE-ESC.	ESC.	PRE-AD.	
CONTROL	no daño en ADN	3 60,0%	3 75,0%	3 60,0%	4 80,0%	1 33,3%	17 70,8%
	sí daño en ADN	2 40,0%	2 25,0%	0 0,0%	1 20,0%	2 66,7%	7 29,2%
	Total	5 100,0%	5 100,0%	3 100,0%	5 100,0%	3 100,0%	24 100,0%
ENFERMO	no daño en ADN	2 25,0%	4 40,0%	3 25,0%	3 30,0%	3 27,3%	15 29,4%
	sí daño en ADN	6 75,0%	6 60,0%	9 75,0%	7 70,0%	8 72,7%	36 70,6%
	Total	8 100,0%	8 100,0%	12 100,0%	10 100,0%	11 100,0%	51 100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

EDAD: análisis estratificado por estado de salud		Sig. asintótica (bilateral)
control	Chi-cuadrado de Pearson	,429
enfermo	Chi-cuadrado de Pearson	,945

Gráfico de resultados 1.d: Representación gráfica del daño en el ADN en los rangos de edad para niños sanos, controles



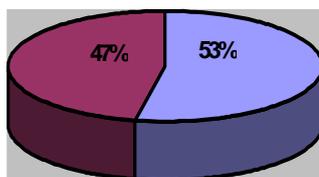
2. RELACIÓN ENTRE EL SEXO Y EL DAÑO EN EL ADN:

Nuestra muestra se divide en 35 mujeres y 40 hombres, como queda reflejado en la tabla de resultados 2.a.

Tabla de resultados 2.a: distribución de los grupos experimentales según sexo, representado con valores absolutos y relativos (frecuencia en %)

SEXO	Número absoluto	Frecuencia %
MUJER	35	46.7%
HOMBRE	40	53.3%
TOTAL	75	100%

Gráfico de resultados 2.a.: distribución gráfica de los grupos experimentales según sexo, representado mediante frecuencia.



La tabla de resultados 2.b refleja el análisis realizado relacionando la variable sexo (hombre/mujer) con el daño celular.

Como queda reflejado en el análisis realizado no obtuvimos resultados estadísticamente significativos mediante estadístico de chi-cuadrado (Valor de p :0.791)

Tabla de resultados 2.b: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según la variable sexo.

Tabla de contingencia

		Sexo del paciente		Total
		mujer	hombre	
cometfin	no daño en ADN	16 45,7%	16 40,0%	32 42,7%
	sí daño en ADN	19 54,3%	24 60,0%	43 57,3%
Total		35 100,0%	40 100,0%	75 100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,070	1	,791

La siguiente tabla (tabla de resultados 2.c) refleja el estudio realizado estratificando por estado de salud, para evitar la posible influencia de la enfermedad en el resultado, relacionando de nuevo la variable sexo (hombre/mujer) con el daño celular.

Como queda expuesto no obtuvimos resultados estadísticamente significativos mediante estadístico de chi-cuadrado (Con valores de p: 0.9 para controles y p: 0.6 para enfermos)

Tabla de resultados 2.c: Tabla de contingencia que compara el daño en el ADN según la variable sexo, previa estratificación por estado de salud y resultados del análisis estadístico realizado.

Tabla de contingencia

		SEXO DEL PACIENTE		Total
		mujer	hombre	
CONTROL	no daño en ADN	7 77,8%	10 66,7%	17 70,8%
	sí daño en ADN	2 22,2%	5 33,3%	7 29,2%
	Total	9 100,0%	15 100,0%	24 100,0%
ENFERMO	no daño en ADN	9 34,6%	6 24,0%	15 29,4%
	sí daño en ADN	17 65,4%	19 76,0%	36 70,6%
	Total	26 100,0%	25 100,0%	51 100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

SEXO: Análiss estratificado estado de salud.	Sig. asintótica (bilateral)
control	,908
enfermo	,600

3. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO DE SALUD Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA

1. COMPARACIÓN ENTRE SANOS / ENFERMOS.

Como queda reflejado en la tabla de resultados 3.a, para un estudio inicial, se dividieron los 75 niños en dos subgrupos según estuvieran sanos o enfermos.

Tabla de resultados 3.a: distribución de los grupos experimentales según la variable estado de salud (sano vs. enfermo), representado con valores absolutos y relativos (frecuencia en %)

ESTADO SALUD	Número absoluto	Frecuencia %
Sanos	25	33.3%
Enfermos	50	66.6%
Total	75	100%

La tabla de resultados 3.b expone el primer análisis realizado, inicialmente se realizó el estudio estadístico con la variable cualitativa del comet.

Las diferencias encontradas entre los dos grupos, son estadísticamente significativas, obteniendo mediante la prueba de Chi-cuadrado una p menor de 0.01.

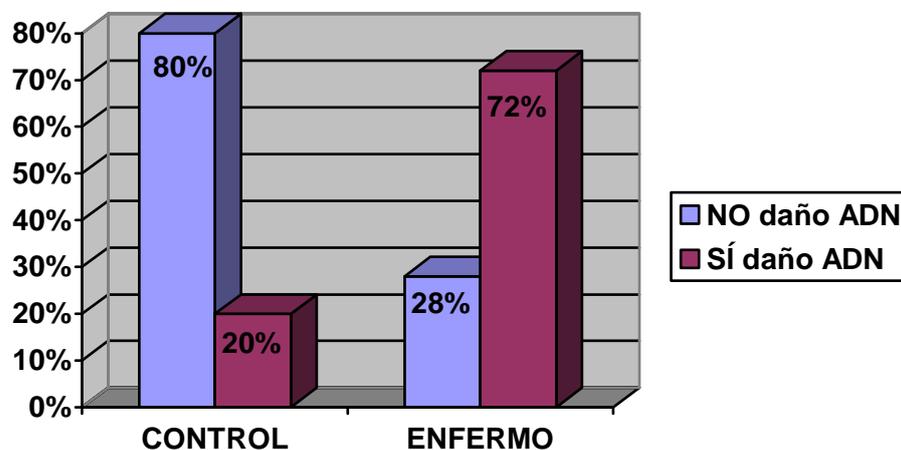
Tabla de resultados 3.b: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN estimado según la variable cualitativa del ensayo comet, con el estado de salud.

	ESTADO DE SALUD		Total
	control	enfermo	
no daño en ADN	19 79,2%	14 28,0%	33 44,6%
sí daño en ADN	5 20,8%	36 72,0%	41 55,4%
Total	24 100,0%	50 100,0%	74 100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,000

Gráfico de resultados 3.b: resultados gráficos comparando el daño en el ADN según la variable cualitativa, con el estado de salud.



En la siguiente tabla, la tabla de resultados 3.c, se realiza el estudio comparando la relación entre el estado de salud y el daño celular estimado mediante un valor numérico, la medida del daño celular expresado mediante el valor “% de ADN EN LA COLA”.

Los resultados encontrados mediante prueba de T de student para muestras independientes y sin asumir varianzas iguales detectan unas diferencias entre sanos y enfermos estadísticamente significativas, con valores de p inferiores a 0.001.

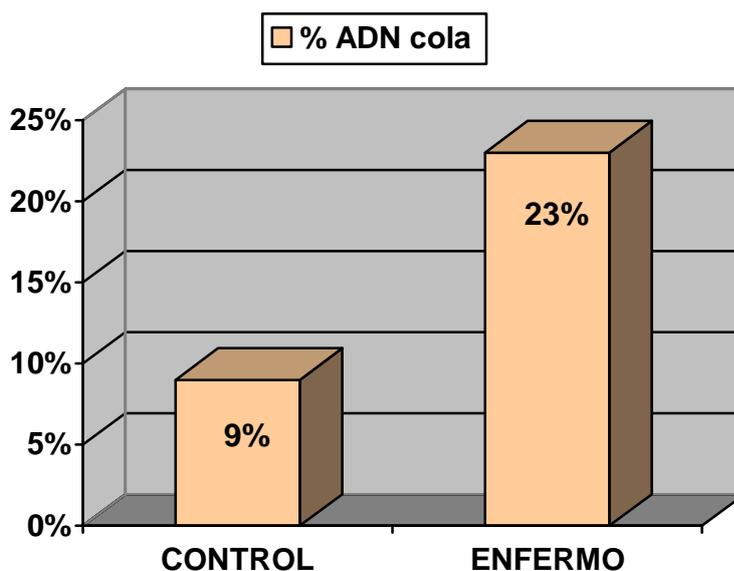
Tabla de resultados 3.c. resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según la variable cuantitativa (porcentaje de ADN en cola), con el estado de salud.

ESTADO DE SALUD		N	Media	Desviación típ.
% de ADN en cola	control	18	9,2%	4.07
COMET TEST	enfermo	39	23,1%	14.32

Prueba de muestras independientes

	Prueba T para la igualdad de medias		
	t	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias
% de adn en cola: No se han asumido varianzas iguales	-5,917	,000	13,849179

Gráfico de resultados 3.c: gráfico comparando el daño en el ADN según la variable cuantitativa (porcentaje de ADN en cola), en controles y enfermos



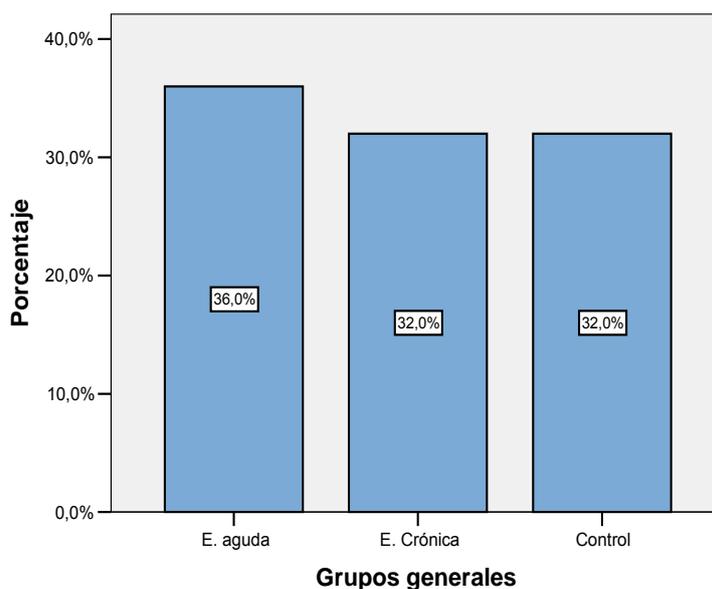
2. COMPARACIÓN ENTRE SANOS / ENF. AGUDA / ENF. CRÓNICA.

En los siguientes párrafos, se exponen los resultados obtenidos dividiendo a los niños en tres grupos según presentasen, enfermedad aguda, enfermedad crónica o fuesen controles sanos.

Tabla de resultados 3.d: distribución de los grupos experimentales según la variable tipo de enfermedad representado con valores absolutos y relativos (frecuencia en %)

	Nº absoluto	Frecuencia %
E. Aguda	27	36,0%
E. Crónica	24	32,0%
Control	24	32,0%
Total	75	100,0%

Gráfico de resultados 3.d: distribución gráfica de los grupos experimentales según la variable tipo de enfermedad.



Estos resultados, como queda expuesto en la tabla de resultados 3.f, son estadísticamente significativos obteniendo mediante la prueba de Chi.cuadrado una p menor de 0.001.

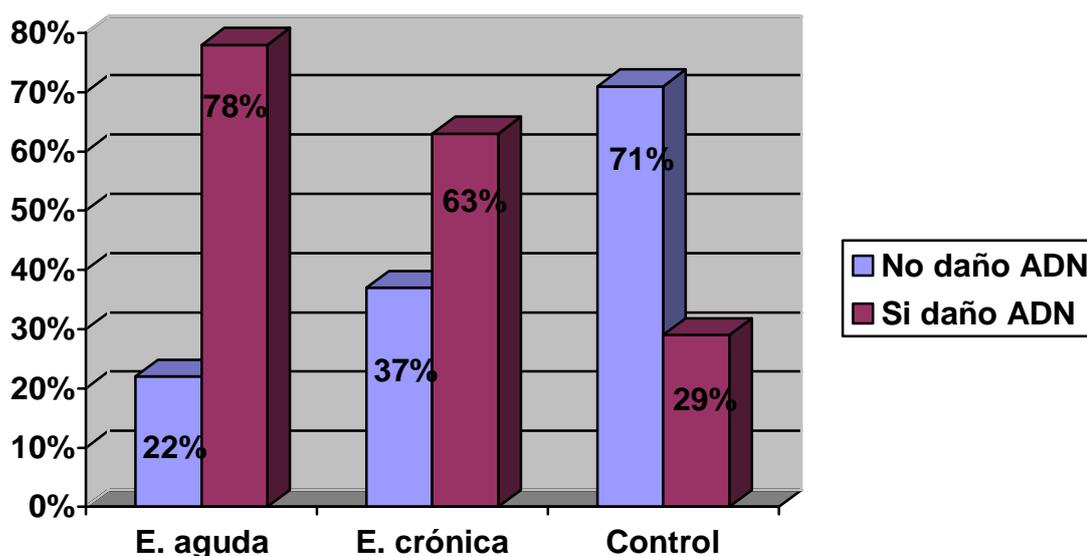
Tabla de resultados 3.e: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según la variable cualitativa, con el tipo de enfermedad.

	Grupos generales		
	E. aguda	E. Crónica	Control
no daño en ADN	22,2%	37,5%	70,8%
sí daño en ADN	77,8%	62,5%	29,2%

Pruebas de chi-cuadrado

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,000

Gráfico de resultados 3.e: representación gráfica comparando el daño en el ADN estimado según la variable cualitativa, con el tipo de enfermedad.



La Tabla de resultados 3.f muestra los resultados obtenidos al comparar, el daño celular medido cuantitativamente, expresado mediante el valor del comet de “% de ADN EN LA COLA” en los tres grupos según enfermedad.

Los niños sanos presentaban una media de % de ADN EN COLA de 9% los niños con enfermedades agudas de 24% y los niños con enfermedades crónicas de 21%, encontrando diferencias estadísticamente significativas, utilizando el test de ANOVA, para comparar más de dos medias. (T3 de Dunnett para varianzas no iguales.)

Tabla de resultados 3.f: resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según la variable cuantitativa (porcentaje de ADN en cola), con el tipo de enfermedad.

% de adn en cola COMET TEST

	N	Media	Desviación típica
E. aguda	21	24,06%	11,7118152
E. Crónica	18	21,95%	15,2630899
Control	18	9,25%	4,0790746

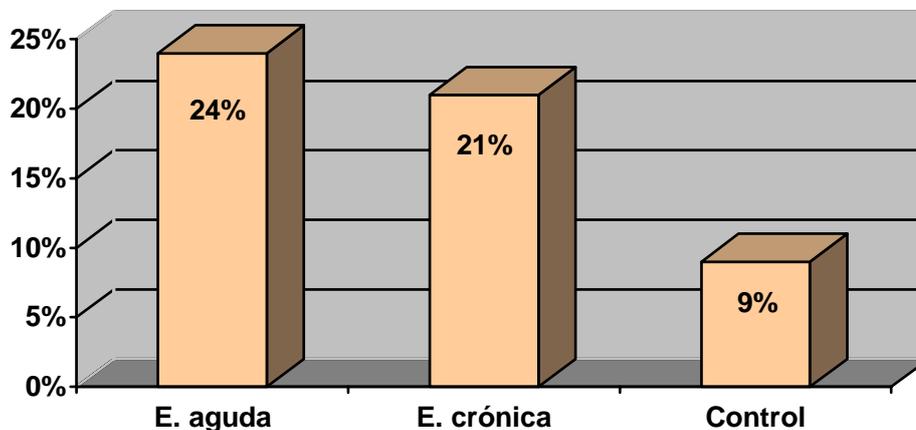
Comparaciones múltiples

Variable dependiente: % de adn en cola COMET TEST

T3 de Dunnett

		Error típico	Sig.
E. aguda	E. Crónica	4,41294	,948
	Control	2,73059	,000
E. Crónica	E. aguda	4,41294	,948
	Control	3,72380	,008
Control	E. aguda	2,73059	,000
	E. Crónica	3,72380	,008

Gráfico de resultados 3.f: representación gráfica reflejando el daño en el ADN según la variable cuantitativa (porcentaje de ADN en cola), según el tipo de enfermedad.



Existen diferencias estadísticamente significativas entre controles y enf. aguda y entre controles y enf. crónica pero no existen diferencias estadísticamente significativas entre enf. aguda y enf. crónica.

3. COMPARACIÓN ENTRE LOS DIVERSOS SUBGRUPOS DE PATOLOGÍAS.

Las distintas enfermedades que presentaban los niños del estudio formaban un grupo muy heterogéneo, como se refleja a continuación en la tabla de resultados 3.g.

Tabla de resultados 3.g: distribución de los grupos experimentales según las diversas patologías ordenadas por índice alfabético, representado con valores absolutos y relativos (frecuencia en %).

ENFERMEDADES	Nº absoluto	Frecuencia (%)
ANOREXIA	1	1,3%
ATAXIA TELANGIECTASIA.	6	8,0%
CARDIOPATÍA	1	1,3%
CELULITIS	2	2,7%
CONVULSIÓN FEBRIL	5	6,7%
ENCEFALITIS	1	1,3%
CONV. TONICICLÓNICA	1	1,3%
ENF. DI GEORGE	1	1,3%
NEUMONÍA	5	6,7%
DÉFICIT PEROXIDASA	1	1,3%
DERMATITIS ATÓPICA	1	1,3%
DIABETES MELLITUS	2	2,7%
GASTROENTERITIS	3	4,0%
HIPOTIROIDISMO	1	1,3%
BRONQUIOLITIS	1	1,3%
OSTEOMIELITIS	1	1,3%
RN. SANO	3	4,0%
RN.CON INFECCIÓN AGUDA	2	2,7%
SÍNDROME R.O.W.	4	5,3%
TALASEMIA	1	1,3%
VIH	4	5,3%

Las enfermedades se unieron en subgrupos, para poder realizar el análisis quedando los grupos de patologías de esta forma:

Tabla de resultados 3h: distribución de los grupos experimentales según subgrupos de patologías, representado con valores absolutos y relativos (frecuencia en %).

GRUPOS DE PATOLOGÍAS	Nº absoluto	Frecuencia (%)
ENF. INFECCIOSA AGUDA	19	25,3%
VIH	4	5,3%
ALT. SISTEMA INMUNE	3	4,0%
ATAXIA TELANGIECTASIA	6	8,0%
ENF. CRÓNICAS	7	9,3%
DIABETES MÉLLITUS	2	2,7%
CONTROL	19	25,3%
RECIÉN NACIDOS	6	8,0%
CONVULSIONES	6	8,0%
Total	75	100%

La tabla de resultados 3.i expone las diferencias entre el daño en el ADN celular (medido según la variable cualitativa "comet-fin") encontradas en los distintos subgrupos de patologías estudiados.

Estos resultados son estadísticamente significativos, con valor de p obtenido mediante estadístico de chi-cuadrado de $p=0.019$.

Tabla de resultados 3.i: resultados estadísticos obtenidos comparando el daño en el ADN según la variable cualitativa, con los distintos subgrupos de patologías.

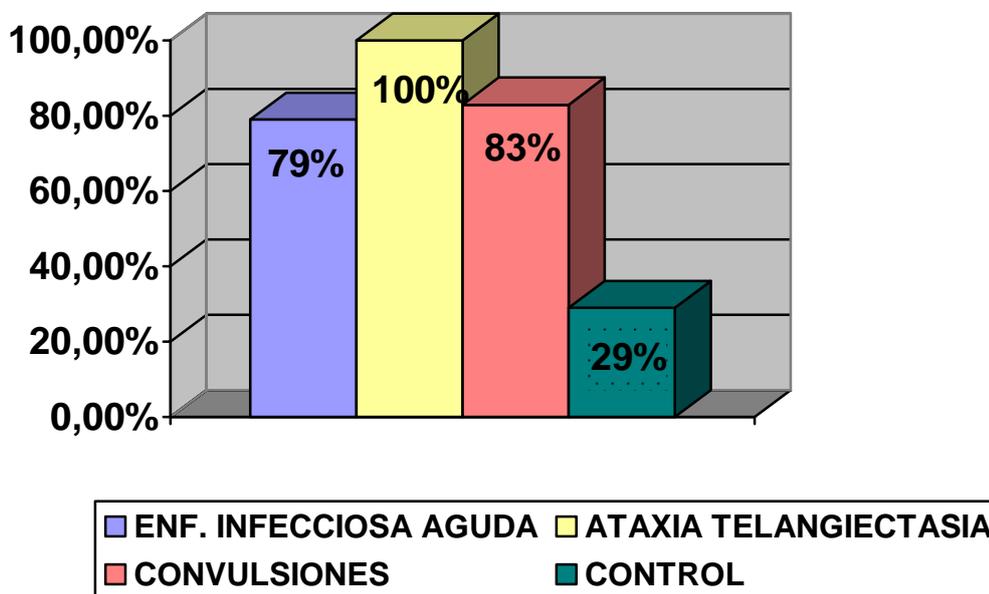
AGRUPACIÓN PATOLOGÍAS	NO DAÑO ADN	SÍ DAÑO ADN
ENF. INFECC. AGUDA	21.1%	78.9%
VIH	25.0%	75.0%
ENF. INMUNES	66.7%	33.3%
ATAXIA TELANGIECTASIA	0%	100%
ENF. CRÓNICAS	57.1%	42.9%
DIABETES MELLITUS	50%	50%
CONVULSIONES	16.7%	83.3%
RN	50%	50%
CONTROL	70.8%	29.2.%

Pruebas de chi-cuadrado

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,019

En el siguiente gráfico se representan las tres enfermedades que más afectan al daño en el ADN cromosómico, comparando el % de niños con ADN dañado en cada grupo de enfermedad con el daño encontrado en niños sanos.

Gráfico de resultados 3.j: Porcentaje de niños con daño en el ADN cromosómico en cada grupo de patología



Las siguientes tablas (tabla de resultados 3.k) muestran los resultados obtenidos del análisis del daño en el ADN celular medido según el valor numérico del comet (% de ADN en cola).

También aquí, mediante el test estadístico de ANOVA encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los subgrupos de enfermedades. (Valor de p menor de 0.001).

Tablas de resultado 3.K resultados estadísticos comparando el daño en el ADN según la variable cuantitativa (% de ADN en cola), con el subgrupo de patología.

% de adn en cola COMET TEST

	% ADN EN COLA
ENF.INFECC.AGUDA	20,074867
VIH	10,800000
ATAXIA TELANGIECTASIA	36,394000
ENF.CRÓNICAS	13,997143
DIABETES MELLITUS	27,600000
CONTROL	8,825333
RN	14,470000
CONVULSIONES	34,300000

Prueba de homogeneidad de varianzas

% de adn en cola COMET TEST

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,823	7	49	,002

ANOVA

% de adn en cola COMET TEST

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5050,435	7	721,491	8,142	,000
Intra-grupos	4342,209	49	88,617		
Total	9392,644	56			

La tabla de resultados 3.1, es una tabla de comparaciones múltiples donde se exponen las diferencias entre el grupo control y cada subgrupo de patología, valorando el daño celular mediante la variable cuantitativa del ensayo comet el % de ADN en la cola.

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de enfermedades infecciosas agudas, y entre el grupo control y el grupo de las convulsiones. El resto de las enfermedades no tiene diferencias estadísticamente significativas respecto al daño en el ADN cromosómico comparado con el daño encontrado en el grupo control.

Tabla de resultados 3.1: resultados del análisis estadístico realizado mediante comparaciones múltiples según el % ADN en cola en los diversos subgrupos de patologías.

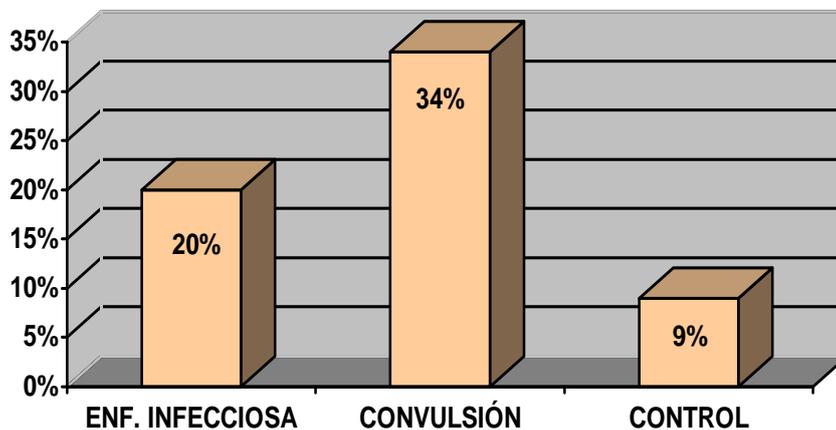
Comparaciones múltiples

Variable dependiente: % de adn en cola COMET TEST

T3 de Dunnett

		Diferencia de medias	Error típico	Sig.
CONTROL	ENF.INFECC.AGUDA	-11,2495333	2,7505093	,018
	VIH	-1,9746667	,9726566	,689
	ATAXIA TELANGIECTA	-27,5686667	6,6290766	,133
	ENF.CRÓNICAS	-5,2386667	3,1711966	,888
	DIABETES MELLITUS	-18,7746667	16,423948	,940
	RN	-5,6446667	4,8123758	,936
	CONVULSIONES	-25,4746667	4,0685043	,016

Gráfico de resultados 3.1: representación gráfica de los resultados estadísticamente significativos donde se refleja el valor medio de porcentaje de ADN en cola del cometa en cada grupo



4. RELACIÓN ENTRE LA TOMA DE MEDICACIÓN Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA

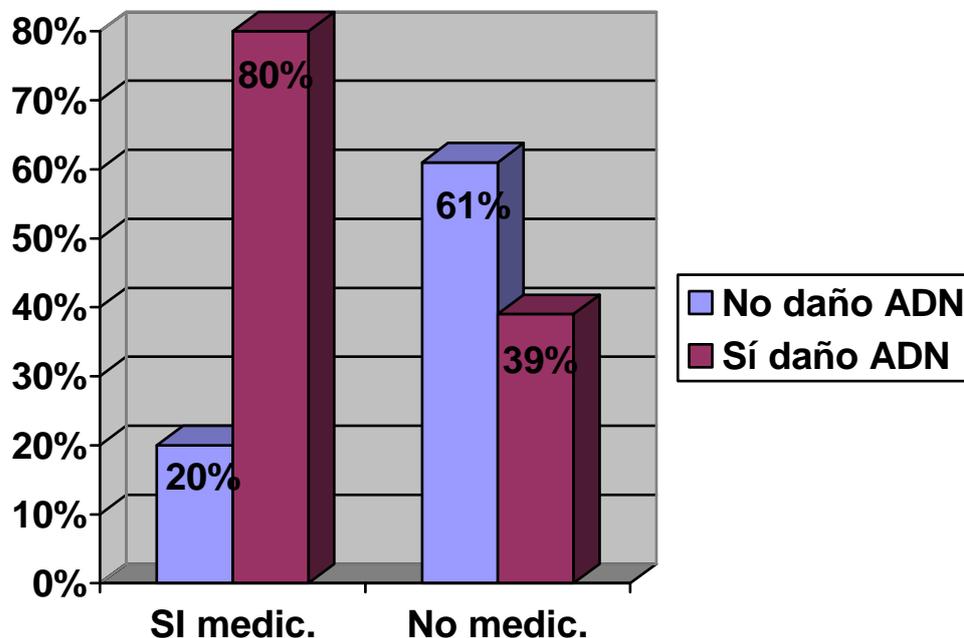
La tabla de resultados 4.a muestra los resultados de un primer análisis realizado sin estratificación sobre el total de todos los niños, determinando la relación entre la toma de medicación y el daño celular. De los 75 niños estudiados, 41 tomaban medicación y 34 no tomaban medicación.

Obtuvimos con estos datos y mediante análisis estadístico de chi-cuadrado un valor de p de 0.001 que indica que las diferencias observadas entre estos grupos son estadísticamente significativas.

Tabla de resultados 4.a: resultados estadísticos según relación entre el daño en el ADN y la toma de medicación.

		MEDICACIÓN:	
		no toma medicación	si toma medicación
no daño en ADN	Recuento	25	7
	% de Toma tratamiento actual	61,0%	20,6%
sí daño en ADN	Recuento	16	27
	% de Toma tratamiento actual	39,0%	79,4%
Recuento		41	34

Gráfico de resultados 4.a: resultados gráficos según relación entre el daño en el ADN y la toma de medicación.



ESTRATIFICANDO POR ESTADO DE SALUD:

La tabla de resultados 4.b muestra un segundo análisis realizado previa estratificación por estado de salud (Enfermos vs. Controles)

En este análisis no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el daño en el ADN cromosómico estimado por la variable cualitativa (si/no daño) y la toma o no de medicación, con valores de p superiores a 0.05. (valores de p: 0.2 para controles y valores de p:0.1 para enfermos)

Tabla de resultados 4.b resultados estadísticos según la relación entre el daño en el ADN (variable cualitativa) y la toma de medicación, previa estratificación por estado de salud.

		MEDICACIÓN		Total
		no toma medicación	si toma medicación	
CONTROL	no daño en ADN	19 82,6%	0 ,0%	19 79,2%
	sí daño en ADN	4 17,4%	1 100,0%	5 20,8%
	Total	23 100,0%	1 100,0%	24 100,0%
ENFERMO	no daño en ADN	7 41,2%	7 21,2%	14 28,0%
	sí daño en ADN	10 58,8%	26 78,8%	36 72,0%
	Total	17 100,0%	33 100,0%	50 100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

MEDICACIÓN: Análisis estratificado por estado de salud	Sig. exacta (bilateral)
control	,208
enfermo	,187

RELACIÓN CON EL TIPO DE MEDICACIÓN:

La tabla de resultados 4.c es un descriptivo de los subgrupos de fármacos que se tuvieron en cuenta y de sus frecuencias absolutas y porcentajes.

Tabla de resultados 4.c: distribución de los niños que toman medicación según el tipo de fármaco, representado con valores absolutos y relativos (frecuencia en %)

MEDICACIÓN	Nº absoluto	Frecuencia
Antibióticos	17	51,5%
Antivirales	6	18,2%
Insulina	2	6,1%
Gammaglobulinas	6	18,2%
Antiepilépticos	1	3,0%

La tabla de resultados 4.d refleja el nivel de daño en el ADN cromosómico encontrado en los pacientes según el tipo de fármaco que tomasen, valorado mediante la variable cuantitativa del comet “% ADN en cola”.

Realizando un análisis estadístico con Prueba de Kruskal - Wallis, se demuestra que globalmente existen diferencias estadísticamente significativas entre el daño celular encontrado en los distintos grupos de fármacos, con valores de p inferiores a 0.05.

Tabla de resultados 4.d: Comparación del daño en el ADN medido mediante la variable cuantitativa (%ADN en cola) en los distintos grupos de fármacos.

% de adn en cola COMET TEST

Grupos de Fármacos	% ADN en cola (media)
antibioticos	20,533583
antivirales	14,512500
insulina	27,600000
gammaglobulinas iv	36,394000
Total	22,900958

En la tabla de resultados 4.e se expone la relación entre el grupo de fármaco y la variable cualitativa del comet "comet fin" pero no es posible calcular un estadístico dado que al haber tantas categorías de fármacos, y pocos sujetos tomando medicación, existen muchos valores cero.

Tabla de resultados 4.e: Comparación del daño en el ADN medido mediante la variable cualitativa, en los distintos grupos de fármacos.

				Total
		no daño en ADN	sí daño en ADN	
Grupos de fármaco	antibioticos	5 29,4%	12 70,6%	17 100,0%
	antivirales	0 ,0%	6 100,0%	6 100,0%
	insulina	1 50,0%	1 50,0%	2 100,0%
	gammaglobulinas iv	0 ,0%	6 100,0%	6 100,0%
	antiepilepticos	0 ,0%	1 100,0%	1 100,0%
Total		7 20,6%	27 79,4%	34 100,0%

4. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO NUTRICIONAL Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA.

1. RELACIÓN CON PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS:

La tabla 4.a es un descriptivo de las principales variables numéricas obtenidas de la antropometría.

Tabla de resultados 4.a: descriptivo de las principales variables antropométricas en controles y enfermos.

	ESTADO DE SALUD					
	CONTROL			ENFERMO		
	Mediana	Percentiles		Mediana	Percentiles	
		25	75		25	75
Edad (años)	3,00	1,00	7,75	4,00	2,00	10,00
Peso (Kg)	15,75	9,00	28,65	18,80	12,48	29,85
Talla (m)	1,06	,93	1,47	1,12	,90	1,35
Pl. bicipital	5,63	4,00	10,38	5,50	4,38	6,33
Pl. subescapular	6,50	4,69	10,25	5,50	4,50	7,50
Pl. suprailiaco	6,88	4,00	10,81	5,38	4,00	10,00
Grasa Corp. Total	3,26	1,85	7,39	2,96	2,10	7,40
Indice adip/musc.	3,00	1,80	6,42	2,50	1,62	4,54
Distribución grasa	,73	,66	1,02	,72	,59	,79

La siguiente tabla (tabla 4.b) expone la relación entre el grado de daño celular medido mediante la variable cuantitativa % de ADN en la cola y el estado nutricional de los niños, estimado según diversos parámetros antropométricos como el peso, talla, el IMC, y los principales pliegues y perímetros corporales.

Tabla de resultados 4.b: Relación entre el %de ADN en cola y datos antropométricos

Correlaciones

ANTROPOMETRÍA		% de adn en cola COMET TEST
BMI	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,068 ,619
Perimetro muñeca	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,376 ,808
Perimetro cadera	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,272 ,059
Perimetro cintura	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,213 ,142
Perimetro craneal	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,217 ,119
Perimetro braquial	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,290 ,430
Pliegue cutaneo. tricipital	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,049 ,737
Pliegue cutaneo. bicipital	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,120 ,410
Pliegue cutaneo. subescapular	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,172 ,237
Pliegue cutaneosuprailiaco	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,071 ,632

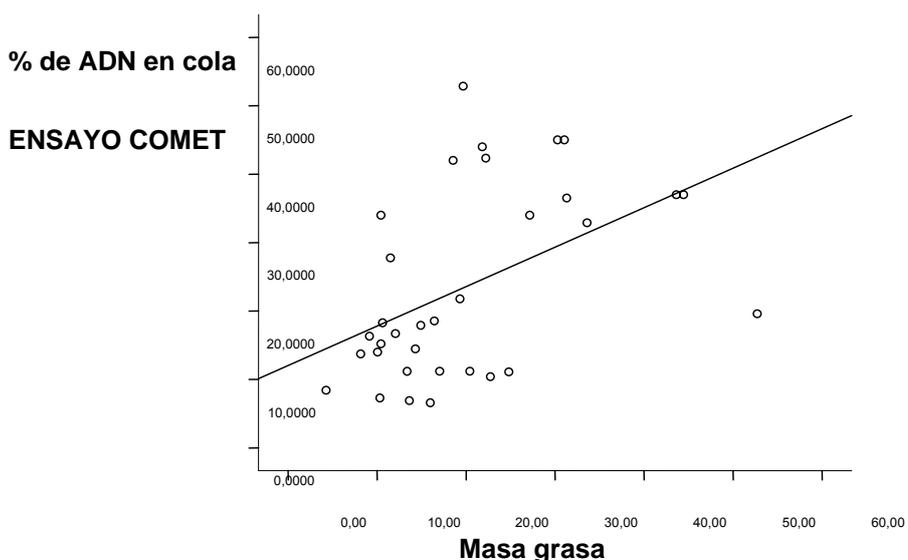
En la tabla 4.c se expone la correlación estadísticamente significativa que encontramos entre la masa grasa y el daño celular medido mediante los valores de porcentaje de ADN en cola, que queda reflejado en el gráfico de resultados 4.d.

Tabla de resultados 4.c: correlación encontrada entre la masa grasa y el daño en el ADN

Correlaciones

		% de adn en cola COMET TEST
masa grasa	Correlación de Pearso	,386
	Sig. (bilateral)	,007

Gráfico de resultados 4.d: relación gráfica encontrada entre masa grasa y daño en el ADN



La siguiente tabla de resultados (4.e) expone todas las correlaciones realizadas entre los datos obtenidos de la antropometría y el daño celular medido mediante la variable cuantitativa: “% de ADN EN COLA”.

Se exponen los índices corporales, calculados a partir de los datos de la antropometría básica como son la densidad corporal, la grasa corporal total, el índice adiposo muscular y la masa magra.

Tabla de resultados 4.e: correlación entre los principales índices nutricionales y el daño en el ADN.

Correlaciones

		% de adn en cola COMET TEST
Densidad corporal	Correlación de Pearson	,005
	Sig. (bilateral)	,973
Masa magra	Correlación de Pearson	,163
	Sig. (bilateral)	,269
% grasa corporal	Correlación de Pearson	-,008
	Sig. (bilateral)	,954
Cociente adiposo muscular	Correlación de Pearson	-,277
	Sig. (bilateral)	,054

Las siguientes tablas (4.f) muestran el análisis estadístico realizado para determinar la relación entre el daño celular en el ADN y el ÍNDICE DE MASA CORPORAL categorizado según la clasificación de la WHO. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con valores de p: 0.39.

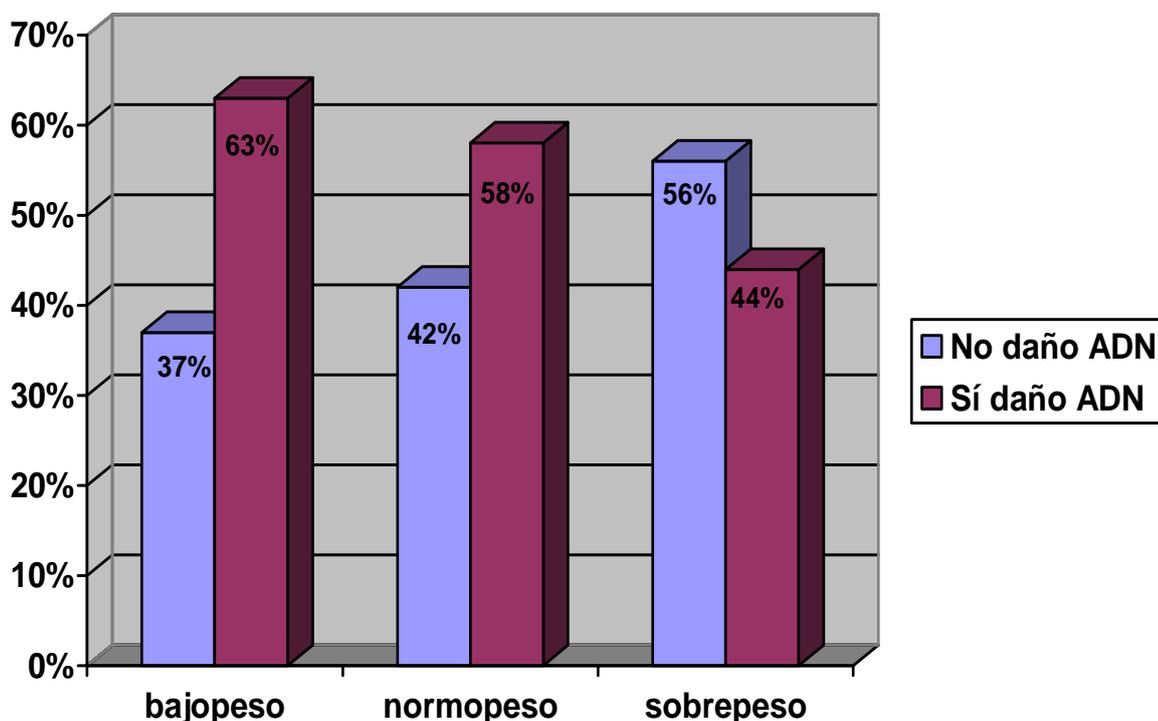
Tabla 4.f: resultados estadísticos de la relación entre el daño en el ADN según la variable cualitativa y los tres grupos de IMC.

		INDICE MASA CORPORAL		
		bajo peso	normopeso	sobrepeso
no daño en ADN	Recuento	9	11	13
		37,5%	42,3%	56,5%
sí daño en ADN	Recuento	15	15	10
		62,5%	57,7%	43,5%
Total	Recuento	24	26	23
		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,852	2	,396

Gráfico 4.f: resultados gráficos de la relación entre el daño en el ADN según la variable cualitativa y los tres grupos de IMC.



También se realizó el análisis según la variable cuantitativa del comet “% ADN en cola”, comparando los grupos obtenidos por el Índice de Masa Corporal, como queda reflejado en la siguiente tabla de resultados (4.g).

No se encontraron, mediante el test estadístico de ANOVA, diferencias estadísticamente significativas, obteniendo valores de p superiores a 0.05 (p:0.57).

Tabla de resultados 4.g: resultados estadísticos de la relación entre el daño en el ADN según la variable cuantitativa(%ADN COLA) y los tres grupos de IMC:

Descriptivos

% de adn en cola COMET TEST

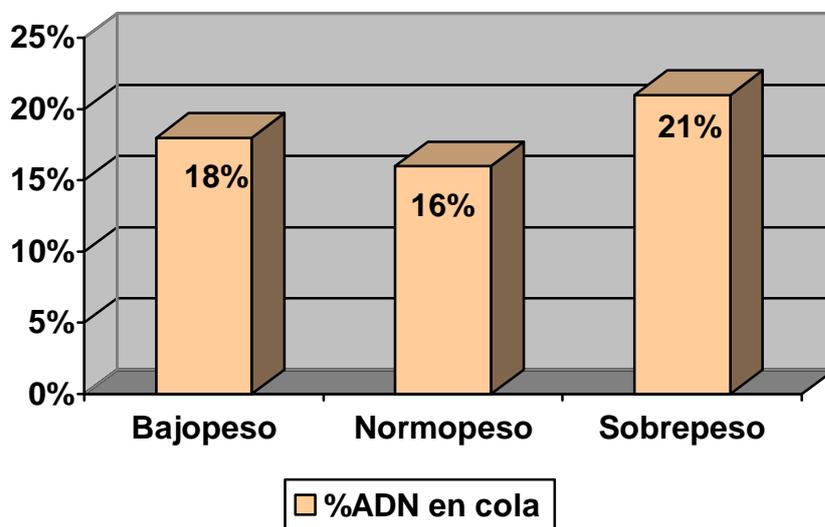
	Media	Desv. típica	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Bajo peso	18,70	13,06	1,74	15,20	22,20
Normo peso	16,48	9,17	2,23	11,76	21,19
Sobre peso	21,05	14,69	3,29	14,18	27,93

ANOVA

% de adn en cola COMET TEST

	Suma de cuadrados	Sig.
Inter-grupos	198,933	,567

Gráfico de resultados 4.g: resultados gráficos de la relación entre el daño en el ADN según la variable cuantitativa del ensayo Comet y los tres grupos de IMC.



2. RELACIÓN CON INGESTA DE NUTRIENTES

Las siguientes tablas exponen los resultados estadísticos encontrados en la relación entre el daño celular y los parámetros obtenidos a partir de la encuesta alimentaria.

Se valoraron parámetros como las calorías, las proteínas, las grasas, (ácidos grasos mono y poli-insaturados) y las principales vitaminas antioxidantes como el ácido fólico, la vitamina C ,la vitamina E y otros factores nutricionales.

Los resultados se realizaron tanto por valores numéricos del comet, según el porcentaje de ADN en la cola, como por valores cualitativos.

No se ha encontrado ningún tipo de relación estadísticamente significativa entre los parámetros estimados por la encuesta alimentaría y el daño celular.

Las siguientes tablas reflejan el análisis descriptivo para las variables numéricas sin distribución normal, mediante la mediana y el rango intercuartílico, para la mejor exposición de los datos se ha realizado el descriptivo estratificando la muestra según el estado de salud (controles/enfermos). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los valores estudiado entre controles y enfermos.

Tabla de resultados 5.a: descriptivo de las principales variables (energía y macronutrientes) obtenidas de las encuestas nutricionales, separado en controles y enfermos.

	ESTADO DE SALUD					
	CONTROLES			ENFERMOs		
	MEDIANA	PER. 25	PER. 75	MEDIANA	PER.25	PER. 75
Kcal	1656,6	881,4	7056	1578,3	971,3	10310,6
KJul	6912	3685,4	29532	6598,9	4071,9	43079,2
Colesterol (gr/día)	132,5	28	484	392	24	1200
Fibra (gr/día)	8,8	1,5	21,1	14,1	2,5	41,9
Prot. (gr/día)	46,4	28,9	123,6	58,5	29,1	339,5
Gluc. (gr/día)	169,5	112	769,1	198	131,5	1306,8
Grasas (gr/día)	95,8	23,8	373,2	43	27	368,2
AG-MONO (gr/día)	36,8	16,7	227,2	38,4	12,9	98,8
AG-POLI (gr/día)	4,9	1,1	12	7,9	2,3	28,5
AG-SAT (gr/día)	17,8	6	50,2	23,7	8	77,2
Agua	560,9	175,3	1650,5	849,4	447,9	4165

Tabla de resultados 5.b: descriptivo de las principales vitaminas obtenidas de la encuesta nutricional, segmentado según el estado de salud.

	ESTADO DE SALUD					
	CONTROLES			ENFERMOs		
	MEDIANA	PER. 25	PER. 75	MEDIANA	PER.25	PER. 75
vit A (ug/día)	495,3	134,1	3168	880,4	261,5	3776,6
Vit. b1 (mg/día)	0,7	0,4	63,9	0,9	0,5	7,7
Vit. b2 (mg/día)	1,1	0,4	13	1,6	0,8	11,7
Vit. b6 (mg/día)	0,8	0,4	11	1,4	0,6	8,2
Vit. b12 (ug/día)	2,5	0,7	12,5	3,6	1	20,8
Vit.C (mg/día)	119,9	34,4	676,4	168	33,1	451,4
Vit. D (ug/día)	1,3	0,6	7,1	6,6	0,6	31,5
Vit. E (mg/día)	12,5	3,9	73,1	14,9	4,1	62
Niacina (mg/día)	12,7	5,8	68,2	30	6,5	86,5
Pantote. (mg/día)	4,5	2,3	16,4	5,3	2	21,7
Biotina (ug/día)	5,5	1,8	19,8	10,7	3	21
Ac.Fol (ug/día)	102,1	60,6	612	173	58,4	1128

Tabla de resultados 5.c: descriptivo de los principales iones y electrolitos obtenidos de las encuestas nutricionales en controles y enfermos.

	ESTADO DE SALUD					
	CONTROLES			ENFERMOS		
	MEDIANA	PER. 25	PER. 75	MEDIANA	PER.25	PER. 75
Na (mg/día)	1157,5	488,3	2520	1136,9	482,4	5804
K (mg/día)	1496,8	1021,9	6156	2103	1155,7	11040
Ca (mg/día)	766,6	261,9	4212	911,1	332,2	4966,8
P (mg/día)	666,9	299,5	2486,7	996,8	481,4	5628,5
Mg (mg/día)	124,4	69,9	474	172	92,4	864
Fe (mg/día)	3,7	2,2	17,8	19,2	3,7	27
Cobre (mg/día)	0,9	0,2	2,1	1,9	0,5	5,6
Cloro (mg/día)	1708,8	877,3	4464	1267,9	619,1	3316
Selenio (mg/día)	48	23	176,7	48,3	13,6	140

Las siguientes tres tabla de resultados 5.d, 5e y 5.f exponen las correlaciones existentes entre los parámetros obtenidos de la encuesta nutricional y su relación con el daño genético medido mediante la variable cuantitativa “% de ADN en cola”.

Tabla de resultados 5d: correlaciones entre los principales nutrientes obtenidos de la encuesta nutricional y el daño en el ADN medido mediante la variable: “% ADN en la cola”.

Correlaciones

INGESTA ESTIMADA (principales nutrientes)		% de adn en cola COMET TEST
Kcal	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,020 ,885
KJul	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,020 ,886
Col	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,033 ,818
Fibra	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,335 ,015
Prot	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,022 ,879
Gluc	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,077 ,587
Grasas	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,045 ,752
AG_MONO	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,101 ,475
AG_POLI	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,066 ,641
AG_SAT	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,040 ,779
Agua	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,092 ,518

Tabla de resultados 5.e: correlaciones entre las principales vitaminas obtenidas de la encuesta nutricional y el daño en el ADN medido mediante la variable: “% ADN en la cola”:

Correlaciones

INGESTA ESTIMADA (vitaminas)		% de adn en cola COMET TEST
vit. A	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,029 ,840
Vit. b1	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,094 ,509
Vit. b2	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,093 ,513
Vit. b6	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,093 ,513
Vit. b12	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,113 ,424
Vit. C	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,028 ,846
Vit. D	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,057 ,691
Vit. E	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,082 ,564
Niacina	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,024 ,868
Pantotenat o	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,030 ,831
Biotina	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,040 ,776
Ac.Fólico	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,110 ,436

Tabla de resultados 5.f: correlaciones entre los principales iones y electrolitos obtenidos de la encuesta nutricional y el daño en el ADN medido mediante la variable: “% ADN en la cola”.

Correlaciones

INGESTA ESTIMADA (iones y electrolitos)		% de adn en cola COMET TEST
Na	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,171 ,225
K	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,259 ,064
Ca	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,076 ,591
P	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,179 ,203
Mg	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,277 ,047
Fe	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,068 ,634
Zn	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,045 ,753
I	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,017 ,906
Cu	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,101 ,474
Cl	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	-,066 ,642

3. RELACIÓN CON PARÁMETROS ANALÍTICOS.

Las siguientes tablas exponen los resultados estadísticos encontrados entre los valores del comet test medidos de manera cuantitativa y los diversos parámetros analíticos estudiados. Se analizaron los parámetros analíticos más relacionados con la nutrición, como son la albúmina, las proteínas totales, el hierro y la ferritina, el colesterol total, la glucosa...etc.

La tabla 6.a es un descriptivo para las variables numéricas sin distribución normal, expresado mediante la mediana y el rango intercuartílico. Para la mejor exposición de los datos se ha realizado el descriptivo estratificando la muestra según el estado de salud (controles/enfermos).

Tabla de resultados 6.a: descriptivo de las variables numéricas sin distribución normal estratificado según el estado de salud (controles/enfermos).

	ESTADO DE SALUD					
	CONTROL			ENFERMO		
	Mediana	Percentiles		Mediana	Percentiles	
		25	75		25	75
Trigliceridos	68,00	44,50	88,50	80,00	50,00	95,00
Ferritina	30,00	23,00	57,00	36,60	23,88	55,55
leptina	2,40	,86	4,73	1,16	,55	3,41
Gh	3,40	1,41	6,06	,70	,40	2,79
T4	1,22	1,10	1,44	1,30	1,14	1,42
Tsh	3,10	1,59	4,40	2,85	2,09	4,32
Igg	909,50	733,5	1202	817,00	685,3	1026
Iga	77,30	55,25	105,0	78,95	43,25	121,3
Igm	83,15	75,50	120,5	101,50	56,58	179,1

La tabla de resultados 6.b refleja las medias de los principales valores analíticos en cada grupo de enfermedad (enfermedad aguda, enf. crónica, control).

Tabla de resultados 6.b: descriptivo de los principales valores analíticos para cada grupo de enfermedad.

		Media	Des. típica	Intervalo de confianza: media al 95%	
				Límite inferior	Límite sup.
Cifra leucocitos	E. aguda	11957,25	5570,40	9350,2	14564
	E. Crónica	6223,48	2231,14	5258,7	7188,3
	Control	7912,57	2962,45	6564,1	9261,1
Cifra hemoglobina	E. aguda	12,05	1,60	11,30	12,79
	E. Crónica	12,36	1,79	11,59	13,13
	Control	12,79	1,66	12,03	13,54
Colesterol total	E. aguda	152,40	37,00	131,91	172,89
	E. Crónica	154,59	25,49	143,29	165,89
	Control	147,78	21,57	137,05	158,51
Trigliceridos	E. aguda	71,93	27,94	56,46	87,41
	E. Crónica	88,15	49,06	65,19	111,11
	Control	70,89	36,33	52,82	88,96
HDL	E. aguda	49,09	18,66	36,56	61,62
	E. Crónica	53,19	16,58	44,35	62,02
	Control	47,82	15,04	40,09	55,56
Proteinas totales	E. aguda	6,51	,76	6,09	6,93
	E. Crónica	7,03	,94	6,61	7,44
	Control	6,71	,71	6,36	7,05
Hierro	E. aguda	72,77	26,46	56,78	88,76
	E. Crónica	72,77	27,34	60,65	84,89
	Control	75,61	29,10	61,14	90,08
Ferritina	E. aguda	86,56	116,41	12,60	160,52
	E. Crónica	43,17	32,94	26,79	59,54
	Control	37,68	25,71	23,44	51,92
Igg	E. aguda	928,63	356,47	702,14	1155,1
	E. Crónica	1031,49	797,20	606,69	1456,3
	Control	1471,56	1646,03	594,45	2348,7
Iga	E. aguda	86,13	38,78	61,49	110,77
	E. Crónica	131,30	206,40	21,32	241,28
	Control	88,76	49,68	62,29	115,24
Igm	E. aguda	115,09	75,83	66,91	163,27
	E. Crónica	146,13	122,04	81,10	211,15
	Control	102,56	56,81	72,29	132,84
prealbumina	E. aguda	20,33	5,16	17,05	23,61
	E. Crónica	18,43	7,76	14,44	22,42
	Control	22,21	5,96	19,04	25,39

La tabla 6 c refleja el resultado del análisis estadístico mediante ANOVA para la comparación de más de dos medias, demostrando que únicamente existe una diferencia estadísticamente significativa entre grupos, en la cifra de leucocitos.($p < 0.01$). En el resto de valores analíticos no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Tabla de resultados 6.c.: análisis estadístico para comparar las medias de los valores analíticos en cada grupo de enfermedad

ANOVA

		Suma de cuadrados	Sig.
cifra de leucocitos	Inter-grupos	365187473	,000
	Total	1,24E+009	
cifra de hemoglobina	Inter-grupos	5,680	,376
	Total	179,810	
colesterol total	Inter-grupos	467,898	,743
	Total	41183,927	
Trigliceridos	Inter-grupos	3517,909	,337
	Total	82619,170	
HDL	Inter-grupos	251,819	,635
	Total	11477,636	
proteinas totales	Inter-grupos	2,572	,159
	Total	38,334	
Hierro	Inter-grupos	95,853	,940
	Total	38588,302	
Ferritina	Inter-grupos	18776,229	,120
	Total	195533,740	
Igg	Inter-grupos	2459137,0	,385
	Total	54030973	
Iga	Inter-grupos	19459,748	,567
	Total	712057,252	
Igm	Inter-grupos	15928,595	,386
	Total	350997,152	
prealbumina	Inter-grupos	118,006	,262
	Total	1907,686	
Albumina	Inter-grupos	1687500,0	,238
	Total	2907500,0	

La tabla 6.d. refleja el análisis posterior que se realizó mediante el estadístico T3 de Dunnett, previa realización de la prueba de homogeneidad de varianzas (Est. De Levene).

Se demuestra que existen diferencias intra-grupos entre la media de leucocitos en los niños con enfermedad aguda vs. crónica y entre los niños con enfermedad aguda vs. controles, pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de leucocitos en niños con enfermedad crónica vs. controles.

Tabla de resultados 6.d: Comparaciones múltiples de la cifra media de leucocitos en los tres grupos según estado de salud.

Comparaciones múltiples

Cifra de Leucocitos			Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
T3 de Dunnett	E. aguda	E. Crónica	5733,772	1329,625	,001
		Control	4044,679	1403,345	,022
	E. Crónica	E. aguda	-5733,772	1329,625	,001
		Control	-1689,093	796,457	,116
	Control	E. aguda	-4044,679	1403,345	,022
		E. Crónica	1689,093	796,457	,116

La tabla de resultados 6.e muestra las correlaciones obtenidas entre el valor numérico del Comet test, (% ADN en cola) y los parámetros analíticos más significativos.

Sólo se muestra el análisis realizado sin estratificar por grupos de salud, se realizó también un análisis estratificando por grupo de salud (enfermos vs. Controles) pero tampoco se obtuvo ninguna correlación estadísticamente significativa.

Tabla de resultados 6.e: correlaciones obtenidas entre el valor numérico del Comet, (% ADN en cola) y los parámetros analíticos más significativos.

Correlaciones

ANALÍTICA		% de adn en cola COMET TEST
cifra de leucocitos	Correlación de Pearson	,016
	Sig. (bilateral)	,912
colesterol total	Correlación de Pearson	,276
	Sig. (bilateral)	,070
Trigliceridos	Correlación de Pearson	-,179
	Sig. (bilateral)	,258
HDL	Correlación de Pearson	,207
	Sig. (bilateral)	,226
HDL / LDL	Correlación de Pearson	,070
	Sig. (bilateral)	,685
Hierro	Correlación de Pearson	,090
	Sig. (bilateral)	,569
Ferritina	Correlación de Pearson	-,124
	Sig. (bilateral)	,463
Hierro / Ferrit	Correlación de Pearson	,040
	Sig. (bilateral)	,815
Gluc	Correlación de Pearson	,077
	Sig. (bilateral)	,587

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN:

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



En nuestro estudio, pretendemos demostrar en la infancia, que aparentemente es una edad en la que la balanza se inclina claramente hacia el lado antioxidante, qué agentes o circunstancias pueden provocar que esta situación ideal basal de los niños, se vea afectada e incline peligrosamente la balanza hacia el lado de la oxidación, generando un estrés oxidativo no

controlado y un daño en el material genético de las células. Es decir pretendemos buscar los principales agentes genotóxicos en la infancia y determinar si la alimentación tiene un papel importante en esta balanza oxidativa durante la niñez.

Basándonos en resultados de trabajos previos, hemos dado importancia a varios factores que progresivamente hemos ido estudiando para ver si de alguna manera influyen o no en el estado oxidativo en los niños.

Los principales factores que hemos estudiado en este trabajo para determinar su influencia en el daño genético de nuestros niños son los siguientes:

1. La edad
2. El sexo
3. El estado de salud
 - a. Según grupos generales
 - b. Según evolución de la enfermedad
 - c. Según tipos de enfermedades
4. La toma de medicación
5. El estado nutricional
 - a. Según parámetros antropométricos
 - b. Según ingesta de nutrientes
 - c. Según parámetros analíticos

1. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DEL NIÑO Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO.

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 y Holbrook, 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, 2003).

Pese a lo que cabría esperar, que es un claro aumento líneal y progresivo del daño celular conforme avanza la edad del paciente, hecho ampliamente estudiado y confirmado con las teorías del envejecimiento, no hemos encontrado en nuestro estudio estos resultados en la edad pediátrica.

Como queda reflejado en la tabla 1.a los niños estudiados fueron agrupados en cinco grupos según la edad:

1. Recién Nacidos
2. Lactantes
3. Preescolares
4. Escolares
5. Preadolescentes

Con estas clasificaciones se obtuvieron cinco grupos muy homogéneos cada uno conteniendo entre el 17% y el 24% del total de los niños estudiados. El análisis se realizó de manera global y con segmentación de los niños según estuvieran sanos o enfermos, para evitar la confusión que la variable estado de salud pudiese crear.

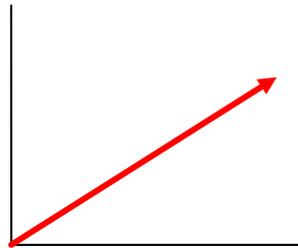
Como queda reflejado en las tablas 1.d y 1.d no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa encontrada entre los grupos de edad estudiados, pero es importante resaltar la progresión que lleva el daño celular en niños sanos, teniendo un pico de mayor incidencia de daño celular en recién nacidos donde aproximadamente el 40,% de los niños sanos estudiados tienen un daño en el ADN cromosómico, luego el daño celular disminuye en el grupo de los lactantes con un 25% de pacientes con daño en este grupo y cae notablemente en el grupo de los preescolares donde el 0% de los preescolares sanos tienen daño demostrado mediante comet, mientras que en los siguientes grupos el % de daño celular va aumentando progresivamente,

presentando aproximadamente lesiones en su ADN un 20% de los escolares y un 33% de los preadolescentes.

La tendencia que cabría esperar según las teorías del envejecimiento sería una progresión lineal creciente, como se expone en la primera curva (Curva 1), pero encontramos una progresión no lineal, que inicialmente es decreciente, se estabiliza y aumenta posteriormente (Curva 2).

CURVA 1

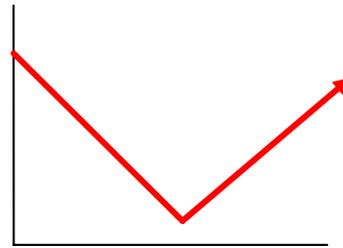
Edad



Daño ADN

CURVA 2

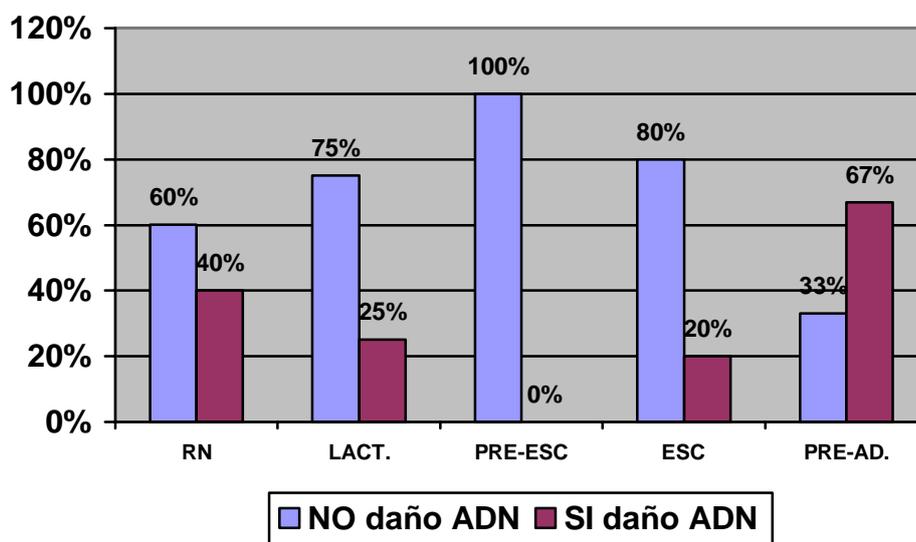
Edad



Daño ADN

Según nuestros resultados, no existe en la infancia 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, como queda reflejado en el gráfico de resultados 1.d

Gráfico de resultados 1.d: representación gráfica del daño en el ADN en los rangos de edad para niños sanos.



2. RELACIÓN ENTRE EL SEXO Y EL DAÑO EN EL ADN:

No hemos encontrado en la literatura consultada ningún estudio previo que demostrase la existencia de una relación entre el género (hombre/mujer) y el daño en el ADN cromosómico.

Si bien es conocido que determinadas enfermedades, algunas de ellas relacionadas en sus orígenes con el daño oxidativo, son más frecuentes en algún determinado sexo, como por ejemplo el caso del de Parkinson (Menéndez D *et al.*, 2001) que es más prevalente en hombres (2:1) y que tiene una clara

relación con las teorías del estrés oxidativo y el envejecimiento antes mencionadas.

Decidimos buscar si en nuestro estudio existía algún tipo de diferencia entre ambos sexos en cuanto a su susceptibilidad al daño celular, realizando un estudio estratificando por estado de salud, para evitar la posible influencia de la enfermedad en el resultado pero no obtuvimos resultados estadísticamente significativos

Nuestra muestra se compone de 35 mujeres y 40 hombres (46% y 53% respectivamente) y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas que nos indicasen que de alguna manera el género condiciona una mayor o menos susceptibilidad al daño celular en la infancia (Tabla de resultados 2.b).

Encontramos, en la tabla de resultados 2.c, que de los pacientes sanos un 33% de los hombres tenían valores de comet test positivos, frente a un 22% de las mujeres. También en los pacientes enfermos un 76% de los hombres tenían valores indicativos de daño genético frente a un 65% de las mujeres.

Estos resultados no fueron estadísticamente significativos encontrándose valores de p superiores a 0.05, pero merece la pena destacar que pese a que las diferencias no sean estadísticamente significativas, parece que el grupo de los hombres tanto en sanos como en enfermos posee más susceptibilidad a agentes genotóxicos presentando niveles basales de daño en ADN superiores a los valores encontrados en las mujeres tanto en el grupo de sanos como en el grupo de enfermos.

3. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO DE SALUD Y EL DAÑO EN EL ADN CROMOSÓMICO EN LA INFANCIA

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, 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 acumulo de radicales libres y aumentan consiguientemente el estrés celular (Focet *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 nuestro estudio, 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 de nuestros niños. Esta relación entre afectación en el ADN y enfermedad, la hemos demostrado de diversas formas, primero agrupando los pacientes en 2 grandes grupos según estuvieran sanos o enfermos y posteriormente subdividiendo los grupos en muestras más pequeñas para llegar a concluir cuales son las enfermedades en la infancia que más se relacionan con el daño genético.

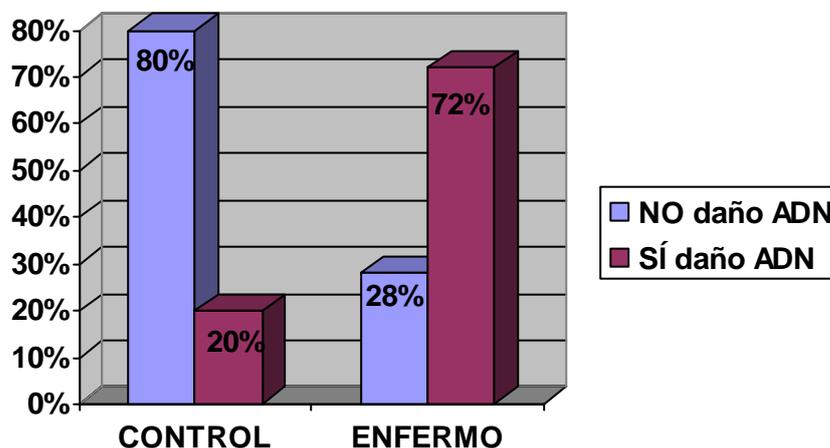
1. COMPARACIÓN ENTRE SANOS / ENFERMOS.

Como queda reflejado en la tabla de resultados 3.a para un estudio inicial, se dividieron los 75 niños en dos subgrupos según estuvieran sanos o enfermos y se demostró que el grupo de los enfermos presentaba un índice mucho mayor de daño en su ADN que el grupo control formado por niños sanos.

Como queda reflejado en la tabla 3.b un 72% de los niños enfermos presentaba daño en su ADN, mientras que tan solo un 20% de los niños sanos tenían dañado su ADN.

Estas diferencias encontradas son estadísticamente significativas, obteniendo mediante la prueba de Chi-cuadrado una p menor de 0.001.

Gráfico de resultados 3.b: resultados gráficos comparando el daño en el ADN según la variable cualitativa, con el estado de salud.



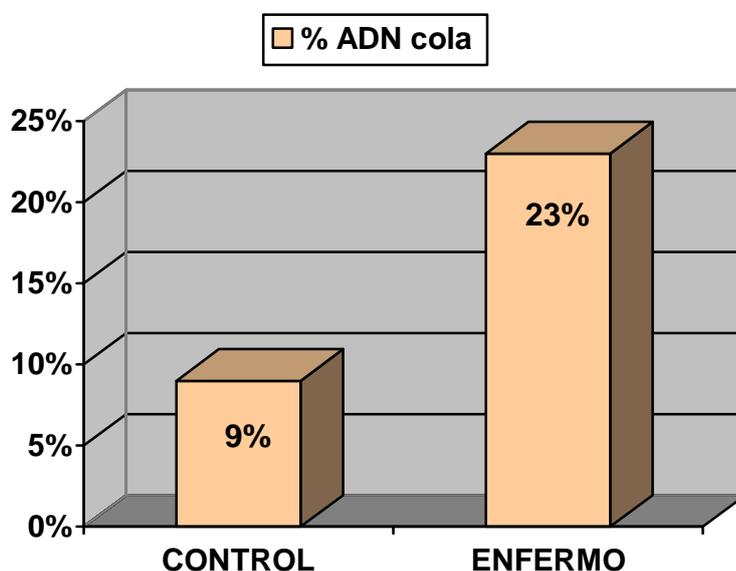
También se comparó mediante un valor numérico la diferencia entre estos dos grupos, utilizando la variable cuantitativa del ensayo comet: “% de ADN EN COLA” en ambos grupos. Como se explica anteriormente a mayor tanto por ciento de material genético en la cola del cometa mayor es el daño en el ADN.

Los niños sanos, presentaban una media de porcentaje de ADN EN COLA de 9.2% y los niños enfermos de 23%, encontrando mediante la prueba estadística de T de student diferencias estadísticamente significativas, con valores de p inferiores a 0.001.

Estos resultados concuerdan con la evidencia previa, demostrando que el estado de salud tiene una clara relación con el daño celular, seguramente debido a que las enfermedades producen un aumento en el estrés oxidativo basal del niño, descompensando así su balanza oxidativa.(Dundaroz *et al.*, 2003).

Además no sólo podemos decir que los niños enfermos poseen con más frecuencia ADN dañado, sino que también podemos concluir que tienen unos valores de daño superiores a los valores de daño encontrados en niños sanos.

Gráfico de resultados 3.c: gráfico comparando el daño en el ADN según la variable cuantitativa (porcentaje de ADN en cola), en controles y enfermos



Surge la cuestión de porqué los niños sanos tienen daño en el ADN. Este hecho que encontramos en nuestro análisis puede deberse a diferentes motivos, en primer lugar es conocido que en todo organismo sano existen mutaciones espontáneas.

Se ha estimado que en un solo día, cada célula de una persona sana sufre aproximadamente 10.000 lesiones, pero afortunadamente existen múltiples mecanismos en el organismo encargados de detectar estas alteraciones del genoma y reparar el error (Ibáñez Quiles 2003).

Otra posible causa de este hecho, es que el daño en el ADN haya sido producido por un mal transporte o conservación

de las muestras, lo que es poco probable en nuestra muestra, ya que la sangre fue recogida, conservada y transportada en frío y procesada en un tiempo limitado. También otra posible causa a este hecho es que los niños considerados como sanos, no fueran realmente sanos y padecieran alguna enfermedad no conocida o asintomática en el momento de la clasificación de los pacientes.

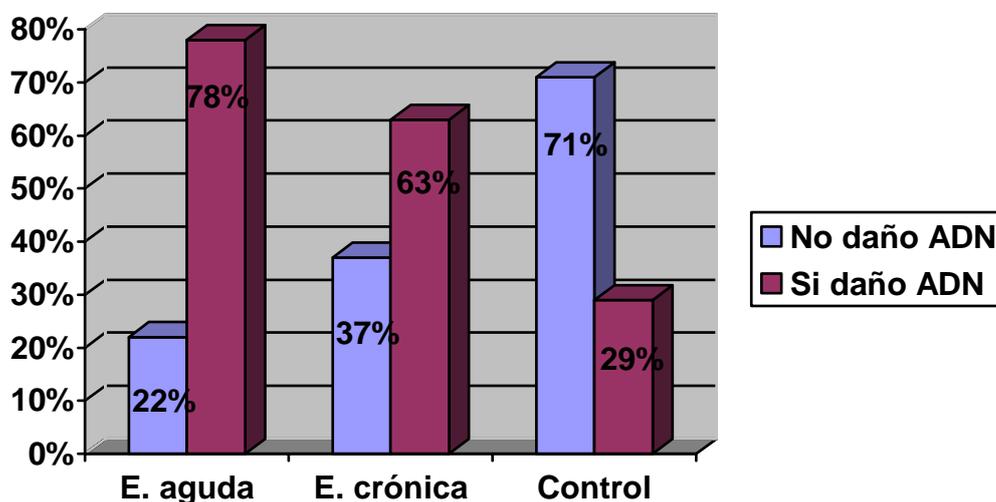
2. COMPARACIÓN ENTRE SANOS / ENF.AGUDA / ENF.CRÓNICA.

Posteriormente se analizó si el tipo de enfermedad también influía en el nivel de genotoxicidad provocada, subdividiendo a los niños en tres grupos según presentasen enfermedades agudas (27 niños), enfermedades crónicas (24 niños) o estuvieran sanos (24 niños), como queda reflejado en la tabla de resultados 3.d.

También así, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Como queda reflejado en la tabla 3.e, los niños con enfermedades agudas presentaban daño celular aumentado en un 78% de los casos, de los niños con enfermedades crónicas un 62% presentaba aumento del daño celular y menos del 30% de los niños controles sanos presentaban niveles elevados de daño en su ADN.

Gráfico de resultados 3.e: representación gráfica comparando el daño en el ADN según la variable cualitativa, con el tipo de enfermedad.



Estos resultados, como queda expuesto en la tabla 3.e, son estadísticamente significativos obteniendo mediante la prueba de Chi cuadrado una p menor de 0.001. Las diferencias son estadísticamente significativas cuando comparamos controles con enf. aguda o controles con enf. crónica, pero no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el daño en el ADN en niños con enf. agudas vs. crónicas.

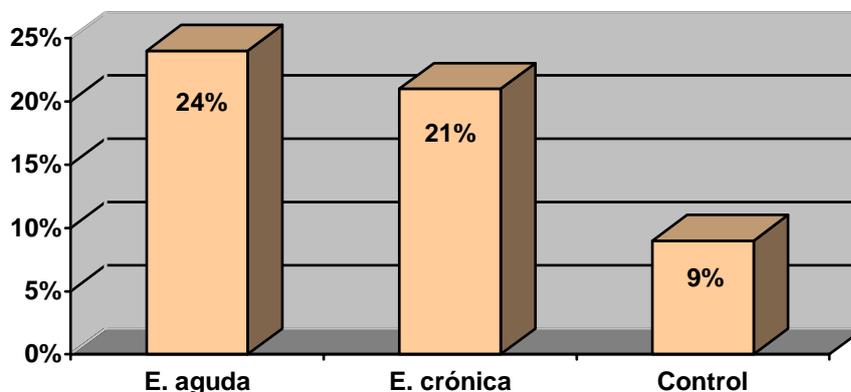
También se comparó la media del daño celular medido cuantitativamente, expresado mediante el valor del comet "% de ADN EN COLA" en ambos grupos. Repetidamente utilizamos para nuestro análisis el valor de "% de ADN EN COLA", por ser el más representativo y sensible, pero aunque no se refleje obtuvimos resultados similares con todas las variables numéricas del ensayo comet analizadas.

La tabla 3.f demuestra que los niños sanos presentaban un porcentaje medio de ADN EN COLA de 9%, los niños con enfermedades agudas de 24% y los niños con enfermedades

crónicas de 21%, encontrando diferencias estadísticamente significativas. Analizando las diferencias entre cada grupo vemos que las diferencias son significativas entre enfermedad aguda y niño sano y entre enfermedad crónica y niño sano, pero no existen diferencias entre el %de ADN en la cola de los niños con enfermedades agudas vs crónicas.

Aunque las diferencias no son significativas, entre enfermedades agudas y enfermedades crónicas, parece importante resaltar el hecho de que las enfermedades agudas con más frecuencia producen daño en el ADN celular, y además son las enfermedades que producen mayor daño.

Gráfico de resultados 3.f: representación gráfica reflejando el daño en el ADN según la variable cuantitativa (% de ADN en cola), según el tipo de enfermedad.



Demostramos así, según los resultados de nuestro estudio, que 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, hechos que no han sido demostrados en la literatura previa consultada.

Sí había sido demostrado, que los procesos inflamatorios crónicos ocasionan acumulo de radicales libres y aumentan consiguientemente el estrés celular por Focet LJ. y colaboradores en el 2002, pero esta gran relación que encontramos en los niños entre las enfermedades agudas y el daño en el ADN cromosómico, no había sido descrita con anterioridad.

No debemos olvidar sin embargo el aspecto temporal que es de gran importancia, entendiendo por esto que los niños con enfermedades crónicas, pese a estar menos afectados, lo están durante más tiempo y por tanto esta situación de mayor estrés oxidativo, o esta inclinación de la balanza hacia el lado de la genotoxicidad se mantiene más prolongada en el tiempo y puede que tenga peores consecuencias para el niño que el daño generado por una enfermedad aguda.

Sería muy interesante hacer un estudio de seguimiento temporal, en el cual se pudiese determinar, durante cuanto tiempo las enfermedades agudas afectan a la balanza oxidativa, y si clínicamente es peor el estar menos afectado pero durante más tiempo, o el tener un gran aumento del estrés oxidativo pero de manera puntual en el tiempo.

3. COMPARACIÓN ENTRE DIVERSOS SUBGRUPOS DE PATOLOGÍAS.

También analizamos cada grupo de enfermedad por separado para buscar cuales eran las enfermedades en la infancia que más daño celular generaban, a pesar de las limitaciones impuestas por la gran variabilidad de patologías analizadas y por el tamaño de muestra restringido.

Los pacientes presentaban un grupo muy variado y heterogéneo de enfermedades como queda reflejado en la tabla 3.g. Todas estas distintas enfermedades que presentaban los niños del estudio se unieron en 9 subgrupos, para poder realizar el análisis quedando los subgrupos de patologías de esta forma:

1. ENFERMEDADES INFECCIOSAS AGUDAS
2. VIH
3. ALTERACIONES DEL SIST. INMUNE
4. ATAXIA TELANGIECTASIA
5. ENFERMEDADES CRÓNICAS
6. DIABETES MÉLLITUS
7. RECIÉN NACIDOS
8. CONVULSIONES
9. CONTROLES

Dentro de las enfermedades infecciosas agudas se incluyeron varias neumonías, bronquitis, bronquiolitis, amigdalitis agudas, gastroenteritis, una celulitis periorbitaria, una sepsis y una osteomielitis, incluyendo en total a 19 niños.

Los niños afectados de VIH, se estudiaron como grupo separado por ser un enfermedad infecciosa pero de carácter crónico y por presentar los pacientes con SIDA mayor susceptibilidad a padecer procesos neoplásicos y alteraciones nutricionales.

El grupo de Alteraciones del sistema inmune estaba formado por enf de Di George y enfermedad por déficit de peroxidasa.

Estudiamos por separado a los niños afectados de ataxia telangiectasia dado que conociendo las características de la

enfermedad pensábamos que este grupo tendría elevados niveles de daño en su ADN debido a que la mutación del gen ATM que poseen estos pacientes, provoca una alteración en una proteína-kinasa involucrada en la reparación del daño en el ADN (Swift M et al. 1990) y que merecía ser estudiado como grupo separado.

El grupo de enfermedades crónicas estaba formado por una amplia variedad de enfermedades incluyendo cardiopatías, dermatitis atópica, asma, hipotiroidismo, y una talasemia, formando un total de 7 pacientes. También de este grupo se estudiaron por separado los pacientes con Diabetes Mellitas ya que existen estudios previos específicos realizados sobre este tipo de patología que evidencian que es una enfermedad que asocia daño aumentado en el ADN cromosómico (Migliore *et al.*, 2002)

El grupo de Recién Nacidos (RN) está formado por 6 niños de menos de 48 horas de vida atendidos en la unidad neonatal, pero sin presentar patología conocida, niños observados por partos instrumentales o por cesárea, o por líquido amniótico teñido, excluyéndose de este grupo los recién nacidos con riesgo de infecciones o con enfermedad conocida.

En el grupo de convulsiones se incluyeron 5 casos de convulsiones febriles típicas, y un caso de convulsión tónico clónica generalizada en el contexto de una epilepsia. Todos los niños habían presentado la crisis convulsiva en las últimas 48 horas.

Los controles son todos niños sanos, que no habían tenido ninguna enfermedad aguda en los últimos 15 días, y que no padecían ninguna enfermedad crónica conocida. Formaron este grupo un total de 19 pacientes

Los resultados que encontramos indican que la gran mayoría de enfermedades estudiadas generan en el niño que las padece un daño significativo en su ADN obteniendo diferencias estadísticamente significativas.

Encontramos en la tabla 3.j, donde se expone el resultado de la variable cualitativa del ensayo comet, que los niños sanos, considerados como controles sólo presentaban daño celular en aproximadamente un 20% de los casos.

Los niños con enfermedades inmunes tenían un ligero aumento de daño, un 33% de los casos, excepcionando claro está los niños con enfermedad de ataxia telangiectasia los cuales todos ellos presentaban valores de comet patológicos (comet positivo en el 100% de estos niños). Es conocido que debido a la mutación en el gen ATM que padecen estos pacientes, tienen alterado el sistema de reparación de lesiones del ADN y padecen por tanto mayor susceptibilidad a los agentes genotóxicos y mayor índice de tumores.

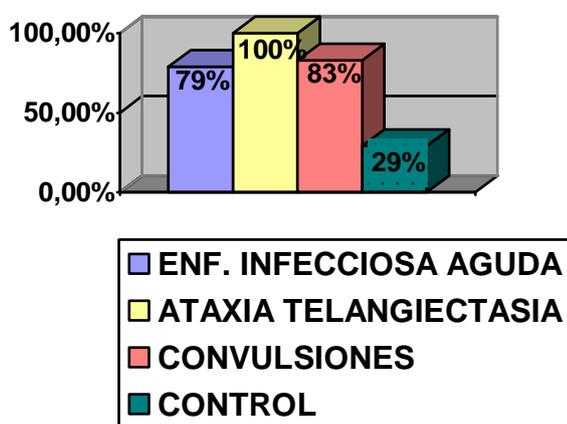
Los niños con enfermedades infecciosas también presentaban una mayor incidencia de daño presentando valores positivos de comet en el 78% de los casos, y no siendo diferente de los resultados con los niños con VIH que tenían valores positivos en el 75%.

Los niños con enfermedades crónicas, como cabía esperar presentaban niveles elevados de daño celular, un 42% de los niños tenían valores elevados de daño en el ADN .En los pacientes con diabetes, que fueron estudiados como grupo separado, también encontramos una incidencia superior a la del grupo control, un 50% de los diabéticos presentaba niveles elevados de daño en el ADN.

El grupo de Recién Nacidos sanos presentaba valores positivos de comet en un 50% de los casos, superior a lo encontrado en niños sanos, confirmando lo ya descrito previamente que en la infancia existen unos grupos de edad donde la genotoxicidad es muy elevada. Una posible explicación a estos resultados encontrados en recién nacidos sería el estrés generado en el niño por el proceso del parto, o bien el paso de sustancias oxidantes a través de la placenta provenientes de la madre. Es de todas formas un grupo muy pequeño para poder extraer ninguna conclusión sobre el origen de este aumento del daño, simplemente podemos decir que el aumento no es proporcional a la edad, como ocurre en los adultos sino que en la infancia existen edades puntuales donde hay un mayor desbalance oxidativo.

Encontramos unos resultados llamativamente elevados de daño en los niños que habían padecido una convulsión en las últimas horas, presentando niveles patológicos en el ensayo comet en un 83% de los casos, resultado que nunca antes había sido estudiado y del que no encontramos ninguna mención en literatura previa consultada.

Gráfico de resultados 3 j: Porcentaje de niños con daño en el ADN cromosómico en cada grupo de patología



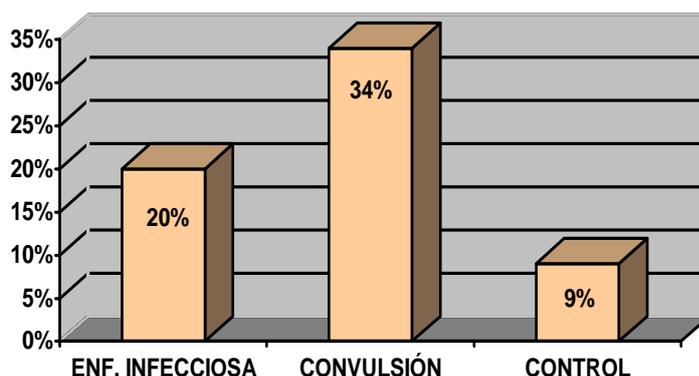
También realizamos el mismo análisis según el valor numérico del comet, medido por el porcentaje del material genético presente en la cola del cometa.

Encontrando como los niños afectos de ataxia telangiectasia eran los que mayor intensidad de daño en el ADN presentaban (36% de ADN en la cola del cometa) seguidos de los niños con convulsiones (34%).

También aquí, mediante el test estadístico de ANOVA encontramos globalmente diferencias estadísticamente muy significativas (valor de p menor de 0.001), como queda reflejado en la tabla 3k.

Al analizar mediante comparaciones múltiples que enfermedades poseían daño celular estadísticamente distinto al de los niños sanos (tabla 3.l), tan sólo salen resultados estadísticamente significativos comparando el grupo control con el grupo de las enfermedades infecciosas agudas y con el grupo de las convulsiones.

Gráfico de resultados 3.l: representación gráfica de los resultados estadísticamente significativos donde se refleja el valor medio de porcentaje de ADN en cola del cometa en cada grupo



Sin embargo, aunque no encontremos una diferencia estadísticamente significativa, es importante destacar la gran afectación que tienen los niños afectados de ataxia telangiectasia. El 100% de los niños estudiados en nuestro trabajo con esta enfermedad poseen daño significativo en el ADN y la media de porcentaje de ADN en la cola del cometa es de 36%, siendo tan solo de un 9% en los controles.

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 y Sedgwick 1958; Savitsky y Bar-Shira, 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).

Es importante también destacar la relación que hemos encontrado entre las convulsiones y el daño en el ADN, ya que sobre este tema no existen antecedentes en la literatura consultada. Un 83% de los niños con convulsiones presentaban niveles patológicos de daño celular, y la media de porcentaje de

ADN en la cola es de 34% frente a el 9% encontrado en niños sanos.

Estos resultados nunca antes habían sido expuestos y poseen una gran importancia clínica dada la alta frecuencia en la población infantil de convulsiones febriles y la poca importancia o tratamiento preventivo que se hace a esta enfermedad. Según la asociación española de pediatría definen convulsiones febriles como *“crisis cerebrales desencadenadas por fiebre que producen pérdida de conciencia, alteración del tono muscular y movimientos anormales de las extremidades. Son muy frecuentes, se presentan en 3 a 5 niños de cada 100, entre los 6 meses y los 5 años de edad. Las convulsiones febriles típicas o simples son benignas, no producen daño en el cerebro y el desarrollo psicomotor del niño que las ha presentado es normal”* (<http://www.aeped.es/> 2007)

Sin embargo nuestros resultados parecen indicar que las convulsiones no son procesos tan “benignos”, sino que son procesos capaces de provocar un daño en el ADN, con todas las consecuencias que este daño genético pueda provocar en el futuro.

Si una convulsión febril genera un estrés oxidativo capaz de afectar al ADN celular y ser detectado en los linfocitos de sangre periférica de estos niños incluso días después de la crisis, podría, y los mecanismos de reparación del daño del ADN del niño no funcionan adecuadamente, podría ocasionar lesiones futuras en el organismo. Existen trabajos realizados en adultos, que demuestran por ejemplo, que hay una relación entre el daño en el ADN cromosómico y una mayor incidencia de procesos neoplásicos malignos (Smith et al, por ejemplo encuentran en su

trabajo que el daño en el DNA está relacionado con un mayor riesgo de presentar cáncer).

También es posible que el estrés oxidativo que detectamos en linfocitos de sangre periférica genere en las neuronas algún tipo de lesión, con secuelas neurológicas secundarias. (Un 1% de los niños con convulsiones febriles en la infancia acaba desarrollando algún tipo de epilepsia).

Sería interesante comprobar el efecto que los antioxidantes puedan tener en estas situaciones, parece lógico pensar que un suplemento de antioxidantes tras una crisis convulsiva podría mejorar el estado oxidativo de los pacientes y disminuir este daño en el ADN secundario a la crisis convulsiva. También sería importante valorar el efecto nocivo del oxígeno en la reanimación de los niños con crisis epilépticas, ya ha sido demostrado el poder oxidante del oxígeno y sus nocivas consecuencias en la reanimación neonatal, proponiéndose ahora la reanimación con oxígeno al 21% en vez de al 100%. Quizás, dado el alto grado de daño oxidativo que encontramos en pacientes con convulsiones, también sería aconsejable realizar la reanimación en estos niños con menor proporción de oxígeno.

Datos muy similares obtenemos con las infecciones agudas, infecciones tan banales aparentemente como una otitis, una gastroenteritis o una amigdalitis, generan un aumento en el daño en el ADN que es detectado mediante el ensayo comet, obteniendo resultados estadísticamente significativo tanto cuando lo analizamos como valor cualitativo como cuantitativo.

Los niños con infecciones agudas presentan niveles patológicos de daño celular en un 78% frente a los niños sanos que tan solo en un 22% presentan niveles patológicos y el

porcentaje de daño en la cola en infecciones agudas versus controles es de 20% frente a 9%.

No debemos olvidarnos que el estudio carece de seguimiento temporal, es evidente que la inmensa mayoría de estos niños que debido a una enfermedad o a una convulsión, han sufrido un stress oxidativo y un consiguiente daño en sus células, serán capaces de mediante sus mecanismos reparadores del daño en el ADN, recuperarse de este estrés, sin ningún tipo de secuela.

Pero no podemos, con el tipo de estudio realizado, determinar cuanto tiempo tardan los niños en conseguir una recuperación a nivel del ADN completa, o si alguna enfermedad produce un daño más mantenido en el tiempo que otras, o si existe un pequeño porcentaje de estos niños que por encontrarse en una determinada situación basal en la que sus mecanismos intrínsecos de control y reparación celular no funcionen óptimamente, no sea capaz de recuperarse de este daño y no pueda recuperar el ADN dañado de sus células pudiendo degenerar en una enfermedad o lesión maligna.

Esta situación de infecciones como agentes potencialmente lesivos del ADN es decir como agentes genotóxicos, podría explicarse a modo de ejemplo y para facilitar la comprensión como el efecto genotóxico de las radiaciones ionizantes.

Es ampliamente conocido y demostrado que las radiaciones ionizantes son sustancias genotóxicas, capaces de provocar un daño a nivel celular, de hecho esto ha sido probado también mediante la misma técnica que usamos en nuestro estudio, mediante el ensayo comet se ha demostrado que la exposición a radiaciones ionizantes da lugar a un aumento en el daño en linfocitos de sangre periférica, poniendo de manifiesto la

fragilidad del DNA con la carcinogénesis atribuida a estos agentes ionizantes (Garaj-Vrhovac 2003, Dantas *et al.*, 2001).

Pero es también evidente que no siempre que una persona se somete a una radiación ionizante desarrolla una lesión maligna, hay múltiples factores que influyen en el desarrollo de esta secuencia, entre ellos los más importantes son quizás la cantidad total de radiación recibida y la susceptibilidad individual. Respecto a la cantidad es conocido que existe una relación directamente proporcional: a mayor exposición a radiaciones o a mayor intensidad, mayor es la posibilidad de desarrollar una enfermedad, un ejemplo es la alta incidencia de tumores cutáneos malignos en radiólogos y personal sanitario en contacto con radiaciones. (Garaj-Vrhovac *et al.*, 2003, Wilkins *et al.*, 2002).

Como en el caso anterior no todo niño con una enfermedad infecciosa aguda o una convulsión, desarrollará un daño permanente en el ADN, pero cabe la posibilidad de que, puesto que hemos demostrado en nuestro estudio que existe una relación entre diversas enfermedades en la infancia y daño cromosómico, y como autores y estudios previos confirman la relación entre este daño y enfermedades como el cáncer (Starcevic *et al.*, 2003, y Smith *et al.*, 2003) estemos ante una relación entre enfermedades agudas en la infancia y patologías malignas.

Estos hechos merecen ser investigados mediante proyectos adecuados con el suficiente número de pacientes y con seguimiento temporal para poder ser demostrados.

4. RELACIÓN ENTRE LA TOMA DE MEDICACIÓN Y EL DAÑO CELULAR EN LA INFANCIA

Analizamos también en nuestros niños si el hecho de estar tomando algún tipo de tratamiento afectaba al material genético.

Según estudios previos algunos fármacos se relacionan con daño en el ADN por ejemplo los antibióticos han demostrado una importante capacidad genotóxica al contribuir al daño oxidativo en el DNA (Dandaroz *et al.*, 2002; Stopper *et al.*, 2001.).

En un primer análisis, sí obtuvimos resultados estadísticamente significativos, con valores de p inferiores a 0.05, que apoyaban los estudios previos en la literatura consultada. De los 34 niños que estaban tomando medicación, un 79% presentaba daño en su ADN linfocitario, mientras que de los 41 niños del estudio que no estaban tomando medicación, solamente un 39% presentaba daño en el ensayo comet. Obteniendo con estos datos y mediante análisis estadístico de chi-cuadrado un valor de p de 0.001. (tabla de resultados 4.a)

Sin embargo, estos resultados están sesgados, pues es evidente que aquellos niños que estén tomando medicación seguramente estarán enfermos y como ya hemos demostrado previamente la gran relación entre daño celular y enfermedad es preciso realizar un segundo análisis estratificado según estado de salud.

En este segundo análisis realizado previa estratificación por estado de salud, (tabla4.b) no encontramos sin embargo relación estadísticamente significativa entre daño en el ADN cromosómico y enfermedad, pero la muestra quedaba muy reducida. Pese a que no existía una diferencia estadísticamente significativa, llama la atención que dentro de los 50 niños enfermos estudiados aquellos niños que si tomaban medicación (33 niños) tenían comet alterado más del 70%, mientras que de los 17 niños enfermos que no tomaban medicación solo un 50% presentaba daño en el comet. Estos resultados sin embargo, también podrían estar sesgados pues también dentro del grupo de los enfermos son aquellos pacientes que clínicamente están peor, más graves, los que con más probabilidad toman medicación y no podemos con este estudio diferenciar si los resultados encontrados son debidos al efecto de la enfermedad en el niño o debido al efecto de la medicación utilizada.

Como conclusión no encontramos en nuestro estudio diferencias estadísticamente significativas entre el hecho de tomar o no medicación y el daño en el ADN cromosómico.

Para poder establecer resultados más claros sería preciso realizar un estudio de mayor tamaño y con pacientes en la misma situación clínica de enfermedad pero difiriendo únicamente en la toma o no de medicación.

RELACIÓN CON EL TIPO DE MEDICACIÓN:

También analizamos en el estudio si el tipo de tratamiento que tomaban los niños afectaba al daño celular, para determinar si los antibióticos afectaban en mayor medida como previamente se cita.

Dividimos para este estudio los fármacos en varios subgrupos, como se ve en la tabla 4.c.

La tabla de resultados 4.d refleja el nivel de daño en el ADN encontrado en los pacientes según el tipo de fármaco que tomasen y se demuestra que globalmente existen diferencias estadísticamente significativas entre el daño encontrado en los distintos grupos de fármacos, encontrando el mayor daño en el grupo de las gammaglobulinas. También en la tabla 4.e, se refleja que el 100% de los niños que toman esta medicación tienen niveles patológicos en el ensayo comet, y esto es debido a que los niños que están en tratamiento con gammaglobulinas son los niños con Ataxia telangiectasia.

No es posible establecer con los datos de nuestro estudio la verdadera relación entre los diversos medicamentos y su grado de genotoxicidad, por la gran variabilidad de medicamentos y el pequeño tamaño de la muestra.

5. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO NUTRICIONAL Y EL DAÑO CELULAR EN LA INFANCIA.

1. RESULTADOS DE INVESTIGACIONES PREVIAS

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 fisicoquímicas 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 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.

2. ESTUDIOS PREVIOS EN LA INFANCIA

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. Por este motivo hemos querido relacionar en nuestro estudio el daño cromosómico con parámetros antropométricos, ingesta de nutrientes y datos analíticos.

3. RELACIÓN CON PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS:

En nuestro estudio, se busca una relación entre el grado de daño celular y el estado nutricional de los niños, estimado según diversos parámetros antropométricos como el peso, la talla, pliegues y perímetros corporales, el IMC, la densidad corporal, la grasa corporal total, el índice adiposo muscular y la masa magra.

Encontramos una relación entre masa grasa y el daño celular medido mediante los valores de porcentaje de ADN en cola, que queda reflejado en el gráfico de resultados 4.d.

Dicha relación parece indicar una mayor tendencia a la fragilidad del ADN en pacientes con mayor masa grasa, y estaría en concordancia con estudios que relacionan alteraciones en la distribución de la grasa corporal con un mayor estrés oxidativo.

No obstante, no se encuentra relación entre el daño celular y el resto de parámetros estudiados.

Como previamente en nuestro trabajo se demuestra la gran influencia que tiene el estado de salud en el estrés oxidativo celular, se realizó el análisis estadístico con la muestra unida inicialmente y con la muestra estratificada según estado de salud posteriormente. No obstante, tampoco encontramos diferencias en los parámetros somatométricos estudiados cuando se estratifica la muestra según este criterio (tablas 4.b y 4.e).

Los sujetos se clasificaron en tres grupos según el IMC.

Bajopeso: si IMC menor de 18

Normopeso: si IMC entre 18 y 25

Sobrepeso: si IMC mayor que 25.

No encontrando tampoco diferencias estadísticamente significativas en el daño del ADN entre los tres grupos, ni mediante la variable cualitativa del comet (tabla 4.f) ni mediante valores cuantitativos (tabla 4.g).

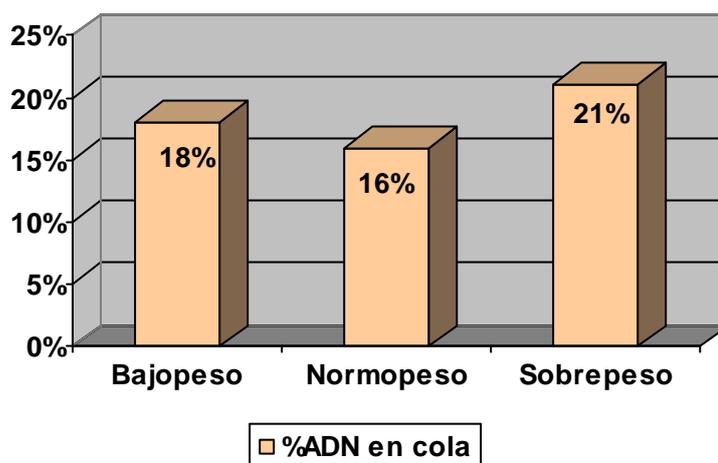
Existen pocos datos de estudios previos realizados, que relacionen la antropometría directamente con el daño celular. Sí hay estudios que relacionan la desnutrición con una mayor susceptibilidad celular al estrés oxidativo, aunque se refieren sobre todo a pacientes adultos. En estudios realizados en pacientes pediátricos cabe destacar los realizados por González y colaboradores en el 2002, donde demuestran que existe una mayor susceptibilidad al daño celular inducido por antibióticos en pacientes malnutridos.

Pese a lo que cabría esperar, que es que aquellos niños con IMC por debajo de 18, y por tanto con una afectación del estado nutricional tuviesen un mayor nivel de daño celular, en

nuestro estudio no hemos encontrado estas diferencias, si bien hay que tener en cuenta que la muestra estudiada es representativa de la población de nuestro medio, (población con un nivel económico y sociocultural medio) es posible pensar que esta relación podría ponerse de manifiesto en sujetos con malnutrición o sobrepeso extremos, que no son el tipo de niños que han sido incluidos en nuestro trabajo.

Pese a no encontrar diferencias estadísticamente significativas, es importante resaltar el hecho de que los niños con bajopeso tienen una media de % de ADN en cola de 18%, los normopeso de 16% y los niños con sobrepeso de 21%. Estos datos apoyan la teoría de que la obesidad y la desnutrición se relacionan con mayor nivel de genotoxicidad. Siendo los niños normopesos aquellos con menor daño celular.

Gráfico de resultados 4.g: resultados gráficos de la relación entre el daño en el ADN según la variable cuantitativa del ensayo Comet y los tres grupos de IMC, diferencias estadísticamente no significativas.



Una posible explicación al hecho de no encontrar una relación entre el estado nutricional y el daño en el ADN, es que

durante la infancia, los mecanismos propios del sistema de defensa antioxidante son altamente eficaces, y mantienen controlada la balanza del estrés oxidativo corrigiendo las lesiones producidas.

Sin embargo, en los adultos, este equilibrio entre radicales libres y antioxidantes se ve más dependiente de factores exógenos como la ingesta de sustancias antioxidantes o la cantidad total de proteínas consumidas. En este caso, la desnutrición o el sobrepeso sí podrían tener mayor relación directa con el daño oxidativo a nivel del ADN cromosómico.

4. RELACIÓN CON INGESTA DE NUTRIENTES

En segundo lugar, se intentó relacionar con el daño celular los parámetros obtenidos a partir de la encuesta alimentaria como las calorías, las proteínas consumidas, las grasas y la estimación de ciertas vitaminas y otros factores nutricionales como queda reflejado en las tablas, 5.d, 5.e, 5.f, pero no se ha encontrado ningún tipo de relación estadísticamente significativa entre los parámetros obtenidos de la encuesta alimentaria y el daño celular.

Existe únicamente una correlación estadísticamente significativa entre la fibra y el daño celular, dato que parece explicarse más, por un mero hallazgo casual obtenido al analizar tantos factores, que por una verdadera relación clínica, tratándose además de una correlación muy débil.

Los resultados se realizaron tanto por valores numéricos del comet, según el porcentaje de ADN en la cola, como por

valores relativos según la estimación daño sí, daño no, pero no se encontraron relaciones estadísticamente significativas.

Estos resultados obtenidos, no se corresponden con los resultados previamente descritos en adultos, donde sí se demuestra una relación clara entre la ingesta de antioxidantes en las dietas y el nivel de daño oxidativo celular medido por el ensayo comet.

Por ejemplo, autores como Porrini, demuestran en sus estudios que el consumo de dietas ricas en fruta y verdura protege frente al daño oxidativo, y otros múltiples estudios relacionaban la reducción de la ingesta calórica con una mejora del estrés oxidativo celular. También autores como Szeto y colaboradores demostraban en adultos una relación entre la composición de nutrientes de la dieta y la estabilidad del DNA cromosómico. Incluso hay estudios en adultos que han conseguido demostrar una disminución del daño oxidativo mediante suplementos en la dieta de sustancias antioxidantes (Sardas *et al.*, 2001).

Se sabe que las sustancias antioxidantes como el ácido fólico o la vitamina C, nos protegen de los agentes oxidantes generados por nuestro propio cuerpo y disminuyen por tanto el daño oxidativo en el DNA (Moller *et al.*, 2004), pero en nuestro estudio realizado en niños no hemos encontrado ninguno de estos efectos.

Quizá la explicación a este fenómeno es, como comentábamos anteriormente, que en la infancia se producen en el organismo menos agentes oxidantes y por tanto es menor la necesidad de ingesta de antioxidantes para controlarlos. Sin embargo, como apoyan las teorías del envejecimiento, con la

edad nuestro organismo genera o acumula cada vez más radicales libres o sustancias oxidantes y por lo tanto cada vez es más dependiente de un adecuado aporte exógeno de antioxidantes para poder mantener en equilibrio la balanza del estrés oxidativo.

Otro factor importante, que debe ser tenido en cuenta a la hora de explicar porque no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas con los valores obtenidos de la encuesta alimentaria, es el *sesgo de deseabilidad social* que aparece en la obtención de la ingesta alimentaria mediante encuestas a las madres. Este sesgo refleja el hecho de que las madres al ser cuestionadas sobre la alimentación que dan a sus hijos, tienden a sobreestimar la calidad y cantidad de lo que comen los niños, exponiendo unos menús "idílicos" que no siempre se corresponden con la realidad.

No obstante, como se comentó con anterioridad, en determinadas situaciones patológicas, tanto agudas como crónicas, si hemos demostrado la existencia de daño en el ADN cromosómico, por lo que el aumento de la ingesta de antioxidantes podría resultar beneficioso en estas situaciones de enfermedad, para lograr controlar el daño celular provocado por las diversas enfermedades. Por ejemplo sería muy interesante determinar si el alto daño celular encontrado en pacientes afectos de ataxia telangiectasia es potencialmente reducible con suplementación vitamínica en la dieta, o si se disminuiría el daño celular observado tras una crisis febril con suplementos antioxidantes. Este aspecto parece de gran interés y merece ser estudiado en trabajos posteriores.

Como conclusión no encontramos en nuestro estudio ninguna relación estadísticamente significativa entre parámetros

alimentarios obtenidos a través de la encuesta y daño celular medido con el ensayo comet, ni realizando un análisis global, ni segmentando según estado de salud.

5. RELACIÓN CON PARÁMETROS ANALÍTICOS.

Tampoco encontramos en nuestro estudio, como queda reflejado en las tablas de resultados 6.a, 6.b y 6.e, ninguna relación estadísticamente significativa entre el nivel de daño celular y los diversos parámetros analíticos relacionados con la nutrición que se han estudiado.

Analizamos también si existían diferencias entre los parámetros analíticos y el tipo de enfermedad, (tabla 6.c) obteniendo tan sólo resultados significativos en la cifra de leucocitos. El valor de leucocitos se analizó en cada grupo y se encontró que los pacientes con enfermedades agudas poseían valores de leucocitos en sangre superiores a los controles y a los pacientes con enfermedades crónicas (11.957, frente a 7.912 y 6.223). Dichos resultados son explicables por el hecho de que la mayoría de los niños catalogados de enfermedad aguda, poseen una enfermedad infecciosa y por tanto tienen la leucocitosis propia de una infección (tabla 6.d).

No encontramos en nuestro estudio ningún valor analítico que se correlacionará de manera estadísticamente significativa con el daño en el ADN cromosómico en la infancia.

CONCLUSIONES:

Con los resultados del presente estudio podemos concluir lo siguiente:

1. En la infancia no existe una relación lineal entre la edad del niño y el daño en el ADN cromosómico, existiendo un rango de edad de mayor riesgo situado en la primera infancia (de 1 a 24 meses), tras el cual el daño se estabiliza (hacia los 3 años), para luego ir aumentando progresivamente.

2. Existe una relación clara en la infancia entre el estado de salud del niño y el daño en el ADN cromosómico, encontrando mayor daño en niños enfermos. Esta relación es evidente tanto en enfermedades agudas como en enfermedades crónicas. Procesos infecciosos aparentemente banales como gastroenteritis, cuadros catarrales, o patologías frecuentes en la infancia como las convulsiones febriles, son capaces de generar un daño en el ADN y actuar como factores genotóxicos.

3. No existe una relación clara entre el estado nutricional y el daño en el ADN cromosómico durante la infancia, en la población estudiada.

4. El ensayo comet es una técnica sencilla y fiable para valorar el daño sobre el ADN cromosómico en la infancia, pero es importante para poder interpretar sus resultados, conocer los múltiples factores que lo influyen.

5. Es necesario realizar estudios posteriores con mayor número de pacientes y con seguimiento temporal, para valorar la importancia clínica de la relación demostrada entre enfermedades en la infancia y genotoxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Agudo, A. y González, C.A. Potenciales cancerígenos de la dieta y riesgo de cáncer. *Medicina Clínica* 2002 15, 579-589
2. 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.* 96: 7394-7397. 1999.
3. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2007 Mar-Apr;40(3-4):167-71
4. 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(1):13-16.
5. Armstrong B. and 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.* Edited by S. Moolgavkar, D. Krewski, L. Zeise, E. Cardis and H. Møller. IARC, 1999. Scientific Publication 131 pp.75-102.
6. Asamblea general de la asociación Medica Mundial, Helsinki, (Finlandia 1964) *Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*
7. 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 Feb 21;

8. Asociación Española de Pediatría AEP. Página web: www.aeped.es. Protocolos de Neuropediatría. Cap.3. Las convulsiones febriles.
9. Astley SB, Elliott RM, Archer DB, Southon S. Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks after oxidative challenge. *Nutr Cancer*. 2002;43(2):202-13.
10. 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.
11. Beckman, K.B., Ames, B.N. "The free radical theory of aging matures" *Physiol. Rev.*, 1998; 78: 547-581.
12. Bingham S.A., Nelson M., Paul A.A., Haraldsdóttir J., Løken E.B. and van Staveren W.A., Methods for data collection at an individual level. In *Manual on Methodology for Food Consumption Studies*, eds. M.E, Cameron & Wvan Staveren. New York: Oxford University Press. 1988.
13. Bingham S.A., The dietary assessment of individuals: methods, accuracy, new techniques and recommendations. *Nutrition Abstracts and Reviews*1987. (Series A) 57, 705-742
14. Biró G., Hulshof K.F.A.M., Ovesen L. and Amorim Cruz J.A., Selection of methodology to assess food intake. *European Journal of Clinical Nutrition*2002. 56, Suppl 2, S25-S32.
15. 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 Oct 4;554 (1-2):297-304.
16. Boder E, Sedgwick RP. Ataxia-telangiectasia: A familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 1958; 21:526-554.
17. Bohr, V.A., Anson R.M. "Mitochondrial DNA repair pathways". *J. Bioenerg. Biomemb*. 1999; 31(4):391-398.
18. 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(2):123-130.

19. Brook CGD. Determination of body composition of children from skinfolds measurements. *Arch Dis Child* 1972; 46:182.
20. Byrne D., Food Safety, Health and Nutrition. Emerging issues. SPEECH/01/397. Geneva, 20 September 2001
21. Cheeseman, K.H., Slater, T.F. "Free radical in medicine". *British Council Bulletin*, 1993.Jul;49(3) 481-93.
22. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to ADN: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 3:465-469.
23. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology.* 2004; 26:249-261.
24. Collins BH, Horska A, Hotten PM, Riddoch C, Collins AR. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr Cancer.* 2001;39(1):148-53.
25. Courtemanche C, Huang AC, Elson-Schwab I, Kerry N, Ng BY, Ames BN. Folate deficiency and ionizing radiation cause DNA breaks in primary human lymphocytes: a comparison. *FASEB J.* 2004 Jan;18(1):209-11. Epub 2003 Nov 03.
26. Dantas FJ, de Mattos JC, Moraes MO, Boasquevisques E, Rodrigues MP, Lage CA, Cabral-Neto JB, Leitao AC, Bernardo-Filho M, Bezerra RJ, Carvalho JJ, Caldeira-de-Araujo A. Dna damage in peripheral blood nuclear cells assessed by comet assay from individuals submitted to scintigraphic examinations. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2002 Nov;48(7):789-91.
27. De la Fuente, M. "Effects of antioxidants on immune system ageing". *Eur .J. Clin. Nutr.*, 2002; 56(3):5-8.
28. Dreosti, J.E. "Nutrition, cancer and aging". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 854: 371-377. 1998.
29. 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 Dec;44 (6):617-21.

30. Dundaroz R, Ulucan H, Aydin HI, 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(2):135-41.
31. Dundaroz R, Ulucan H, Denli M, Karapinar K, Aydin HI, 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 Jun;43(3):276-80.
32. Durnin, Rahaman. The assesmen of the amount of fat in the human body from measurements of skinfolds thickness. 1967.Br. J.Nutri. 89(1) 147-55
33. Duthie SJ. The comet assay: protective effects of dietary antioxidants against oxidative DNA damage measured using alkaline single cell gel electrophoresis. En: *Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in biological sciences, diagnostics and intervention* (Richard G Cutler & Henry Rodríguez) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 309-323pp, Singapore, 2003.
34. EURODIET, 2000. European Diet and Public Health: The Continuing Challenge. Working Party 1: Final Report.
35. Fernández Tardáguila E. Desarrollo puberal humano: interrelación entre parámetros somatométricos, secreción pineal de melatonina y concentración sérica de leptina y dehidroepiandrosterona sulfato en distintos estadios puberales. Tesis Doctoral por la Universidad de Granada. Facultad de Medicina. Año 2004
36. Ferro-Luzzi A. and James P.,Diet and Health. Nutrition in Europe, European Scientific and Technological Options Assessment, Directorate General for Research, PE No 1997. 166.481, 2-38.
37. Finkel, T., Holbrook, N.J. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature*, 2000; 408(6809):239-247.
38. Fridovich, I. "Superoxide radical: and endogenous toxicant". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1983; 239-257.
39. 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 May;18(3):265-71.
40. Gedik CM, Boyle SP, Wood SG, Vaughan NJ, Collins AR. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis*. 2002 Sep;23(9):1441-6.
 41. Gersovitz M., Madden J.R., Smiciklas-Wright H. Validity of the 24 h dietary recall and seven day record for group comparisons. *Journal of the American Dietetic Association.*, 1978 73, 48-55.
 42. 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 (a); 22(2):147-58.
 43. 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(b); 39 (1):33-42.
 44. 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.
 45. 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 Dec 16;
 46. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. "Antioxidants in nutrition, health, and disease". Oxford University Press, 1994; 4:63-81.
 47. Guyton C.A., Hall J.E. Textbook of medical physiology. Cap. 3.29-41. McGraw-Hill Interamericana. 1996
 48. Halliwell, B. "Albumin, an important extracellular antioxidant?". *Biochem. Pharmacol*. 1988; 37:569-571.
 49. Halliwell, B., Chirico, S. "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993; 57(S):715-722.

50. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" *J. Lab. Clin. Med.*, 1992; 119(6):598-620.
51. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. "Free radicals in biology and medicine". Third edition. New York: Oxford University Press. 1999.
52. Hartmann A, Aguerri E, Beepers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 2003; 18(1):45-51.
53. Hartwell, L. *Genetics. From genes to genomes* ISBN 9780071102155, 3ª Ed. 2006
54. Hu F.B., Manson J.E. and 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.
55. 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*. 9 (2-4): 337-343. 1999.
56. Hulshof K.F.A.M., Löwik, M.R.H., and Welten D.C. Nutritional surveillance/ In industrialised countries. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2003 4198-4205. Elsevier Science Ltd.
57. 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.
58. IEFS. Institute of European Food Studies, 1999. A pan EU Survey of consumer attitudes to, Nutrition and health. Report No 2. Influences on Food Choice and Sources of Information on Healthy Eating.
59. Johann-Liang R, O'Neill L, Cervia J, Haller I, Giunta Y, Licholai T. Energy balance, viral burden, insulin-like growth factor-1, interleukin-6 and growth impairment in children infected. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 119-124

60. 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(3-4):211-221.
61. Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat Karakaya A. Biomarkers. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. 2004 Mar-Apr;9(2):203-9.
62. Kim W.W., Mertz W., Judd J.T., Marshall M.W., Kelsay J.L. and Prather E.S., Effect of making duplicate food collections on nutrient intakes calculated from diet records. *American Journal of Clinical Nutrition* 1984. 40, 1333-1337.
63. Klug, William *Conceptos de genética* ISBN 9788420550145, 8ª ed. 2006,
64. Krauss R.M., Eckel R.H., Howard B., Appel L.J, Daniels S.R., Deckelbaum R.J., Erdman Jr. 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., and 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(1): 132 - 146.
65. Kroes R., Müller D., Lambe J., Löwik M.R.H., van Klaveren J., Kleiner J., Massey R., Mayer S.I., Verger P. and Visconti A., Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology* 2002. 40, 327-385.
66. Lee, M.C., Weindruch, R., Aiken, J.M. "Age-associated alterations of the mitochondrial genome". *Free Rad. Biol. Med.*, 1997; 22(7):1259-1269.
67. Leis Trabazo R., Sierra Salinas C. Valoración del estado nutricional. Curso de formación en nutrición infantil. Volumen 2. Madrid.2004
68. Lenaz, G. "Role of mitochondria in oxidative stress and ageing". *Bioch. Biophys*, 1998; 1366:53-67.
69. 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.
70. 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.
71. Livingstone M.B.E., Prentice A.M., Strain J.J. et al., 1990. Accuracy of weighed dietary records in studies of diet and health. *British Medical Journal* 300, 708-712.
72. Lunec, J. "Free radicals: their involvement in disease processes." *Biochem. Clin.* 1992; 16(2):99-108.
73. Maluf SW, Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001 Jan 1;124(1):71-5.
74. Mandavilli, B.S., Santos, J.H., Van Houten, B.. "Mitochondrial DNA repair and aging". *Mutat. Res.*, 2002; 509(1-2):127-151.
75. 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.
76. Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med.* 2004 Apr 15;36(8):966-75.
77. Mataix J., y 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.
78. Mataix, J. "Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario". Universidad de Granada-PULEVA FOOD, 2001; 21:155-188.
79. 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.* 24: 511-521. 1998.

80. 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*. 5(3): 155-171. 1989.
81. McCord, J.M., Fridovich, I. "Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (Hemocytocuprein)". *J. Biol. Chem.*, 1968; 244:6049-6055.
82. Mclelvey-Martin VJ, Geen MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): An European Review. *Mutation Research* 1993; 288: 47-63.
83. Menendez D, Rojas E, Herrera LA, Lopez MC, Sordo M, Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutat Res*. 2001 Jul 1; 478 (1-2):153-8.
84. Merry, B.J. "Calorie restriction and age-related oxidative stress". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 908: 180-198. 2000.
85. Migliore L, Petrozzi L, Lucetti C, Gambaccini G, Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients *Neurology*. 2002 Jun 25;58(12):1809-15
86. Miller TL. Nutrition in paediatric human immunodeficiency virus infection. *Proc Nutr Soc* 2000; 59:155-62.
87. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003. Indicadores de Salud. Cuarta evaluación en España del Programa regional europeo Salud para todos. www.msc.estadísticas_sanitarias/
88. 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.* 14: 279-285. 1979.
89. Moller P, Loft S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr*. 2002 Aug;76(2):303-10.
90. 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 Oct;43(5):267-74. Epub 2004 Jan 06.
91. Multhaup, G., Rupper, T. "Reactive oxygen species and Alzheimer disease". *Biochem. Pharmacol.*, 1997; 54(5):533-559.
 92. Navarro, A., López-Cepero, J.M., Sanchez del Pino, M.J. "Skeletal muscle and aging". *Frontiers in Bioscience*, 2001; 6:26-44.
 93. 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.
 94. Niki, E. "Antioxidants in relation to lipid peroxidation". *Chem. Phys. Lipids*, 1987; 44:227-253.
 95. NRC (National Research Council), *Recommended Dietary Allowances, 10th revised edition*, 1989a. (National Academy Press, Washington, DC).
 96. Oberley, L.W., Oberley, T.D. "Free radical, cancer, and aging and degenerative diseases". Ed. Alan, R. Liss, New York, 1986; 325-371.
 97. 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.* 12: 357-364. 2001.
 98. Östling O, and Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123:291-298.
 99. 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 (1):181-90.
 100. Papas, A.M. "Vitamin E and exercise: aspect of biokinetic and bioavailability. En: "Nutricion and fitness in health and disease". Simopolus, A.P. Ed. World Nutr. Diet. Basel, Karger, Switzerland, 1993; 72:165-176.

101. Passarge, E. Color atlas of genetics .ISBN 9783131003638, 3ª ed. 2007,
102. 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 Jun;41(3):95-100.
103. 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.* 81: 21- 24. 1999a.
104. 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.* 9: 331-336. 1999c.
105. 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.* 31: 129-135. 1999b.
106. 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.* 82: 31-39. 1999.
107. 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; d463-465.
108. Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Gonzalez-Yanes C, Goberna R, Rodriguez-Bano J, Leptin receptor (Ob-R) expression is induced in peripheral blood mononuclear cells by in vitro activation and in vivo in HIV-infected patients. : *Clin Exp Immunol.* 2002. Jul; 129(1):119-24
109. Sanz, N., Diez-Fernandez, C. Alvarez, A., Cascales, M. "Age-dependent modifications in rat hepatocyte

- antioxidant defense system". *Hepatology*, 1997; 27(3):525-534.
110. Sardas S, Yilmaz M, Oztok U, Cakir N, Karakaya AE. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat Res*. 2001 Feb 20;490(2):123-9.
111. 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.
112. Sauer, F. Presentation as representative of the EU Commission at the EU Conference on Obesity.. Copenhagen, 11.09.2002 (<http://www.obesity.dk>)
113. 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.
114. 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.
115. SEEDO, Consenso SEEDO 2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Medicina Clínica* 2000 115, 587-597.
116. Serra Majem Ll. y Ribas Barba L. Recordatorio de 24 horas en Nutrición y Salud Pública: Métodos, bases científicas y aplicaciones. Eds. Ll. Serra Majem, J. Aranceta Bartrina y J.Mataix Verdú, Masson, S.A. 1995 p. 113-119.
117. Sevaniam, A., Hoschstein, D. "Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological system". *Ann. Rev. Nutr.*, 1985; 5:365-390.
118. Sharman, E.H., Bondy, S.C. "Effects of age and dietary antioxidants on cerebral electron transport chain activity". *Neurobiol. Aging*. 22: 629- 634. 2001.
119. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175:184-191.
120. Siri WB. The gross composition of the body. En: Tobias CA, Lawrence JH, editors. *Advances in biological and*

- medical physis. New York: Academic Press, 1956; p. 239-80.
121. Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2003 May; 24 (5):883-9.
122. Stadman, E.R. "Protein oxidation and aging". *Science*, 1992; 257:1220-1224. Stryer, L. "Bioquímica". Ed. Reverté, 1995; 403-431.
123. Starcevic SL, Diotte NM, Zukowski KL, Cameron MJ, Novak RF. Oxidative DNA damage and repair in a cell lineage model of human proliferative breast disease (PBD). *Toxicol Sci*. 2003 Sep;75(1):74-81. Epub 2003 Jun 12.
124. Steingrímssdóttir L., Ovesen L., Moreiras O. And Jacob S. Selection of relevant dietary indicators for health. *European Journal of Clinical Nutrition*,2002. 56, Suppl 2, S8-S11.
125. 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 Aug;38(2):296-301.
126. Swift M, Chase CL, Morrell D. Cancer predisposition of ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;46:21-27.
127. Szeto YT, Benzie IF. Effects of dietary antioxidants on human DNA ex vivo. *Free Radic Res*. 2002 Jan;36(1):113-8.
128. Tanner J. Human Growth standard: construction and use. En: Gedda L, Parisi P, editors. *Auxology. Human Growth in health and disorder*. London: Academic Press, 1978.
129. Tietz, N. W., "Specimen Collection and Processing; Sources of Biological Variation," *Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia, PA 1994.
130. 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.

131. 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(S):S30-S33.
132. Watson D. Crick F.H. A structure for deoxyribose nucleic acid . Nature. 1953
133. WHO (World Health Organisation), 1998. Programme of Nutrition, Family and Reproductive Health. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Geneva 1998.
134. WHO (World Health Organization), 1985. Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants. WHO offset publication No 87.Geneva,WHO
135. WHO (World Health Organization), 1999. GEMS/Food Total Diet Studies. Report of a Joint USDA/WHO International Workshop on Total Diet Studies in co-operation with the Pan American Health Organization, Kansas City, Missouri, USA 26 July-6 August 1999.
136. WHO (World Health Organization), 2003. Report of the Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Technical Report Series No. 916.
137. Wilkins RC, Kutzner BC, Truong M, Sanchez-Dardon J, McLean JR. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. Cytometry. 2002 May1;48(1):14-9.
138. Wilkins RC, Kutzner BC, Truong M, Sanchez-Dardon J, McLean JR. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. : Cytometry. 2002 May 1;48(1):14-9.
139. Willet W.C. and Stampfer M.J. Nueva pirámide de la alimentación. Investigación y Ciencia, 2003 marzo, 55-61.
140. Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Martyn JA. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. J Histochem Cytochem. 2003 Jul;51(7):873-85.