

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Efecto de la desnutrición moderada y grave en la estabilidad genómica de niños menores de cinco años”

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A:

M. en B.E. Elsa Cervantes Ríos

Directora de Tesis: Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Asesoras: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dra. María del Carmen García Rodríguez

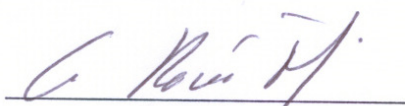
7 de marzo de 2012

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada para la realización de este trabajo, con número 185573.

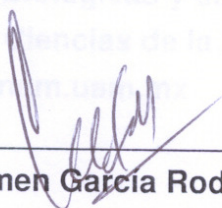
El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aprobó la tesis titulada **“EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN MODERADA Y GRAVE EN LA ESTABILIDAD GENÓMICA DE NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS”** que presentó

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Ciencias de la Salud
M. en B.E. Elsa Cervantes Ríos
el día 7 de marzo de 2012



Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

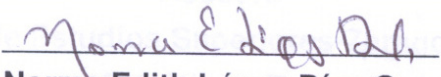
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Presidente



Dra. María del Carmen García Rodríguez
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM
Secretaria



Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Vocal



Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Vocal

COMITÉ TUTORAL

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Directora de Tesis

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Ciencias de la Salud

leor@xanum.uam.mx

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Asesora

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Ciencias de la Salud

arom@xanum.uam.mx

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Asesora

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Ciencias de la Salud

mkf@xanum.uam.mx

Dra. María del Carmen García Rodríguez

Asesora

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN)

Maricar_67@yahoo.com

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

GRACIAS

A la Dra. Rocío Ortiz Muñiz, por su gran entusiasmo y dedicación. Gracias por todas las oportunidades brindadas y por guiarme durante todo este tiempo. Porque con su ejemplo he aprendido que la honestidad, la solidaridad, la entereza, el trabajo y el esfuerzo diario, rinden frutos. Siempre la llevaré en mi corazón.

A la Dra. Leonor Rodríguez Cruz, por la dirección de esta tesis, por su infinita paciencia, por todo el empeño, tiempo y dedicación que invirtió para que este trabajo llegara a buen fin. Muchas gracias por infundirme ánimo y confianza cuando más lo necesité. Gracias por permitirme trabajar a su lado, por todo lo que me ha enseñado y por impulsarme siempre para crecer como estudiante, profesionalista y como ser humano. Pero sobre todo, gracias por creer en mí y por mostrarme siempre su solidaridad. Su integridad, coraje y valentía son un ejemplo de vida para mí. Siempre la llevaré en mi corazón.

A la Dra. María del Carmen García Rodríguez, por haber dirigido la realización de esta tesis. Muchas gracias por su entusiasmo, dedicación y por todos sus valiosos comentarios. Gracias por su confianza y por darme la oportunidad de crecer. El haberla conocido enriqueció mi vida personal y profesional.

A la Dra. Mina Konigsberg Fainstein, por haber dirigido la realización de esta tesis. Gracias por su invaluable ayuda, por todo el tiempo invertido, por su entusiasmo, su energía, por el espacio compartido, por su gran sentido humano y por su gran disponibilidad para trabajar en este proyecto. A lo largo de este tiempo me ha dejado grandes enseñanzas.

A la Dra. Edith Cortés Barberena, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente. Muchas gracias por toda su ayuda y compañerismo, por las largas pláticas y por apoyarme en los momentos difíciles. Gracias por el espacio compartido y por estar siempre dispuesta a ayudar. La quiero mucho.

A la Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero, por su asesoría y valiosos comentarios.

A Hilda Medina Ruiz, porque a pesar del tiempo sigo teniendo presente su ejemplo de trabajo, dedicación y amor a la vida.

A Monse, por ser mi amiga y porque hemos reído mucho. Gracias por todo el cariño recibido. ¡Te quiero!

A Donají, Nancy y Pedro, por hacer el trabajo diario más llevadero y por ser excelentes compañeros.

A Maru, gracias por hacer las mañanas de los jueves tan divertidas y entrañables. Por ser mi amiga y por tu alegría por vivir.

Al Dr. Jaime Graniel Guerrero, Jefe de Coordinación Hospitalaria del Hospital Pediátrico Iztapalapa del Gobierno del Distrito Federal, por su valiosa colaboración para la obtención de muestras para la realización de este trabajo. Muchas gracias por toda su cortesía, y por su amistad.

GRACIAS

Agradezco infinitamente a todos los niños que sin interés alguno, colaboraron en la realización de este trabajo, pues sin ellos, nada de éste tendría sentido.

Un niño es un amor que se ha hecho visible

Friedrich von Hardenberg Novalis

DEDICATORIAS

A mi Tía. Aunque ha sido muy difícil continuar sin ti, tu recuerdo y tu amor me han permitido seguir adelante.

A mis papás, por no dejar que el barco se hunda. Gracias por su gran ejemplo de vida, por su paciencia, sus consejos, su amor y su infinita dedicación. Gracias mamá por todo lo que me das y por enseñarme con tu gran fortaleza que la vida sigue. Gracias papá porque a pesar de todo, seguimos compartiendo risas, por tu gran solidaridad y porque eres un hombre excepcional.

Los amo.

A mis hermanas Alma y Yuli, porque seguimos unidas. Por todo su cariño y porque a través del tiempo me han demostrado que los lazos que nos unen son indestructibles. Las amo.

A mis abuelitos Cándido, Tina, Tolo, Oliva y Manuel.

A mis sobrinitos Uli, Leo y Joaqui. Porque le han transmitido mucho amor y mucha alegría a mi vida. Son la bendición de mi familia. Los amo.

A mi amiga Jazmín, gracias por preocuparte por mi, por los momentos compartidos, por infundirme ánimo siempre, por acompañarme durante todo este tiempo y por todo el cariño que me has dado.

A mi amiga Lorena, por las risas, por compartir mis logros, por tu aceptación, tu comprensión, tu paciencia y por escucharme siempre, sin juzgar.

A Vero. Sin tu apoyo, cariño, confianza y compañía, habría sido muy difícil concluir este proyecto. ¡Te quiero!

A Toño. Gracias por tu solidaridad en los momentos difíciles, por tu preocupación y por todo tu apoyo.

A Hugo. Gracias por darme siempre ánimo, por tu amistad y por estar pendiente de este proyecto.

A Lety y a mi Tío Panchito. Por no dejarnos solos, por su solidaridad, empatía y por todo el cariño que me han demostrado. Los quiero.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	li
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 desnutrición	1
1.1.1 Desnutrición tipo marasmo	5
1.1.2 Desnutrición tipo Kwashiorkor	6
1.2 Desnutrición en México	9
1.3 Desnutrición e infecciones	11
1.4 Efectos de la desnutrición a nivel citogenético	13
1.5 Micronúcleos	14
1.6 Desnutrición,estrés oxidante y respuesta antioxidante	19
1.7 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	20
1.7.1 El radical Superóxido (O_2^-)	21
1.7.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	22
1.7.3 El radical hidroxilo ($\cdot OH$)	23
1.7.4 El Óxido Nítrico ($\cdot NO$)	23
1.8 Fuentes generadoras de Especies reactivas de oxígeno (ERO)	25
1.9 Efectos lesivos de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	31
1.9.1 Peroxidación lipídica	31
1.9.2 Daño a proteínas	33
1.9.3 Daño oxidativo al ADN	34
1.10 SISTEMAS ANTIOXIDANTES	39
1.10.1 Superóxido Dismutasa (SOD)	41
1.10.2 Catalasa (CAT)	43
1.10.3 Glutación peroxidasa (GPx)	44
1.10.4 Glutación reductasa (GR)	47

1.10.6 Glutación (GSH)	47
1.11 ESTRÉS OXIDANTE	49
1.12 METABOLISMO DE ERO EN ERITROCITOS HUMANOS	50
1.12.1. Estado redox de Fe y estrés oxidante en eritrocitos	53
1.12.2 Antioxidantes en los eritrocitos	54
1.12.3 Propiedades antioxidantes de la hemoglobina (Hb)	55
1.12.4 Papel de ERO en la muerte de los eritrocitos	55
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	56
3. JUSTIFICACIÓN	57
4. OBJETIVO GENERAL	57
5. OBJETIVOS PARTICULARES	57
6. HIPÓTESIS	58
7. MATERIAL Y MÉTODO	58
7.1 Pacientes	58
7.2 Evaluación de MN y tipo de MN en RET y E de sangre periférica de niños de los cuatro grupos de estudio	59
7.2.1 Obtención y fijación de la muestra	59
7.2.2 Tinción celular	60
7.2.3 Análisis por Citometría de Flujo	60
7.3 Determinación del tipo de MN en RET y E en sangre periférica de los cuatro grupos de estudio	62
7.3.1 Obtención y fijación de la muestra	62
7.3.2 Tinción de células	62
7.3.3 Análisis por citometría de flujo	63
7.4 Evaluación de lipoperoxidación de la membrana de eritrocitos de sangre periférica de los cuatro grupos de estudio	65
7.5 Evaluación de la actividad de Glutación peroxidasa (GPx)	66
7.5.1 Preparación de la muestra	66
7.6 Evaluación de la actividad de Superóxido dismutasa (SOD)	68
7.6.1 Preparación de la muestra	68
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71
9. RESULTADOS	71
9.1 Frecuencia Reticulocitos	73
9.2 Frecuencia Reticulocitos con micronúcleos	76
9.3 Frecuencia de eritrocitos maduros con micronúcleos	80

9.4 Determinación del tipo de MN en E y RET en sangre periférica en los cuatro grupos de estudio	82
9.5 Evaluación de daño oxidante	85
9.5.1 Medición de lipoperoxidación de la membrana de eritrocitos de sangre periférica	85
9.5.2 Evaluación de la actividad de Glutación peroxidasa	88
9.5.3 Evaluación de la actividad de Superóxido Dismutasa	90
10. DISCUSIÓN	91
11. CONCLUSIONES	109
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

BBS: Solución amortiguadora salina de bicarbonato

BN: Niños bien nutridos sin infecciones

BNI: Niños bien nutridos con infecciones bacterianas

CAT: Catalasa

DGP: Desnutrición calórico proteica

DESMI: Niños con desnutrición moderada con infecciones bacterianas

DESGI: Niños con desnutrición grave con infecciones bacterianas

E: Eritrocitos maduros

E-MN: Eritrocitos maduros micronucleados

E-MN-K+: Eritrocitos maduros con micronúcleos que presentan cinetocoro

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

Hg: Hemoglobina

IP: Yoduro de propidio

metHg: Metahemoglobina

MN: Micronúcleos

oxiHg: Oxihemoglobina

O₂⁻: Radical superóxido

•OH: Radical hidroxilo

NO: Óxido nítrico

RET: Reticulocitos

RET-MN: Reticulocitos (eritrocitos inmaduros) micronucleados.

RET-MN-K+: Reticulocitos con micrónúcleos que presentan cinetocoro

SOD: Superóxido dismutasa.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Factores involucrados en la problemática de la desnutrición	2
Figura 2. Desnutrición tipo marasmo	5
Figura 3. Desnutrición tipo kwashiorkor	7
Figura 4. Factores que comprometen la salud y la vida de los niños con desnutrición	8
Figura 5. Entidades en la República Mexicana con riesgo nutricional grave	11
Figura 6. Relación desnutrición-infección	12
Figura 7. Formación de MN	15
Figura 8. MN en un linfocito binucleado, obtenido por la técnica de bloqueo de la citocinesis	16
Figura 9. MN de tipo aneugénico y clastogénico	17
Figura 10. Maduración de RET	18
Figura 11. Fundamento del análisis con Citometría de flujo	19
Figura 12. Reducción del oxígeno	21
Figura 13. Reacción de Haber-Weiss y reacción de Fenton	22
Figura 14. Cadena respiratoria	26
Figura 15. Complejos I y III de la cadena respiratoria	27
Figura 16. Muerte intracelular dependiente de oxígeno independiente de mieloperoxidasa	28
Figura 17. Muerte intracelular dependiente de mieloperoxidasa y oxígeno	29
Figura 18. Hipoxantina, xantina y producción de ERO	30
Figura 19. Reacciones principales de la peroxidación lipídica	32
Figura 20. Cambios estructurales en membranas celulares causados por lipoperoxidación	33
Figura 21. Oxidación de ADN	34
Figura 22. Oxidación de timina	35
Figura 23. Oxidación de guanosina	36
Figura 24. Oxidación de Uridina y Citosina	37
Figura 25. Principales fuentes generadoras de ERO	39

Figura 26. Acción enzimática de SOD	41
Figura 27. Mecanismo catalítico de SOD1	43
Figura 28. Reacción catalítica mediada por CAT	44
Figura 29. Acción enzimática de GPx	44
Figura 30. Ciclo redox del glutatión	48
Figura 31. Estrategia de regionalización para análisis de RET-MN y E-MN con citometría de flujo	61
Figura 32. Gráfica de puntos para análisis de RET-MN y E-MN con citometría de flujo	62
Figura 33. Estrategia de regionalización para análisis del tipo de MN con citometría de flujo	64
Figura 34. Dispersión de datos individuales de RET en BN,BNI, DESMI y DESGI	74
Figura 35. Dispersión de datos individuales de RET-MN en BN,BNI, DESMI y DESGI	77
Figura 36. Análisis de la frecuencia de RET-MN por género	79
Figura 37. Dispersión de datos individuales de E-MN en BN,BNI, DESMI y DESGI	80
Figura 38. Porcentaje de RET y E que presentan MN de tipo aneugénico	84
Figura 39. Porcentaje hemólisis en los cuatro grupos de estudio	87
Figura 40. Actividad de GPx en BN,BNI, DESMI y DESGI	89
Figura 41. Actividad de SOD en BN,BNI, DESMI y DESGI	90

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Principales ERO y ERN	24
Cuadro 2. Clasificación del sistema antioxidante	40
Cuadro 3. Funciones del glutatión	48
Cuadro 4. Reactivos utilizados en la determinación de la actividad de GPx	67
Cuadro 5. Reactivos utilizados en la determinación de la actividad de SOD	69
Cuadro 6. Curva patrón para determinar la actividad de SOD	70
Cuadro 7. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio para RET, RET-MN y E-MN	72
Cuadro 8. Datos individuales de RET en BN, BNI, DESMI y DESGI	75
Cuadro 9. Datos individuales de RET-MN en BN, BNI, DESMI y DESGI	78
Cuadro 10. Datos individuales de E-MN en BN, BNI, DESMI y DESGI	81
Cuadro 11. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio para determinar tipo de MN	82
Cuadro 12. Porcentaje de MN de tipo aneugénico y clastogénico en RET y E de BN, BNI, DESMI y DESGI	83
Cuadro 13. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio para analizar daño oxidante	85
Cuadro 14. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio para evaluar actividad enzimática (GPx y SOD)	88

RESUMEN

A nivel mundial la desnutrición es responsable, directa o indirectamente, del 60% de los 10.9 millones de muertes que ocurren anualmente entre niños y niñas menores de 5 años, más de las dos terceras partes de estas muertes están asociadas con prácticas de alimentación no apropiadas durante el primer año de vida. Aunque las características clínicas de la desnutrición están bien definidas, su fisiopatología aún es poco entendida. En años recientes, se ha involucrado a las ERO en dicha fisiopatología.

Cuando las ERO se encuentran por encima de ciertos niveles, el balance oxidantes/antioxidantes se pierde y algunas ERO pueden interactuar con el ADN produciendo ruptura de la molécula, lo cual podría reflejarse en la formación de MN de tipo clastogénico. Se ha reportado que en organismos desnutridos la respuesta antioxidante es deficiente y que este hecho deriva en lipoperoxidación y probable daño al ADN.

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la frecuencia de MN en reticulocitos (RET) y eritrocitos maduros (E) utilizando la citometría de flujo, así como evaluar el daño oxidante y respuesta antioxidante de niños con desnutrición moderada y grave con infecciones bacterianas, para evaluar las alteraciones causadas por la desnutrición sobre el material genético y su relación con el estado redox de estos niños.

Los datos del presente trabajo indican que los niños desnutridos con infecciones asociadas, presentan un incremento en la frecuencia de MN en las dos poblaciones de estudio. Esto indica que la desnutrición y las infecciones podrían actuar conjuntamente para inducir daño al ADN de estos niños.

Por otro lado los datos de este estudio demuestran que los niños con desnutrición e infecciones, presentan un incremento en el daño oxidante, así como una respuesta antioxidante deficiente. Esto indica que la desnutrición y las infecciones podrían actuar conjuntamente para abatir la respuesta antioxidante, provocando que algunas ERO interactuaran con el ADN y de esta forma inducir daño al ADN, medido por el incremento de la frecuencia de MN en RET y E de sangre periférica de estos niños.

ABSTRACT

Global malnutrition is responsible, directly or indirectly, 60 per cent of the 10.9 million deaths that occur each year among children under the age of 5 years and more than two-thirds of these deaths are associated with feeding practices not appropriate during the first year of life. Although the clinical features of malnutrition are well defined, its pathophysiology is still little understood. In recent years, has involved to the ERO in the pathophysiology.

When the ERO are above certain levels, the oxidants/antioxidants balance is lost and some ERO can interact with the DNA causing rupture of the molecule, which could be or be reflected in the formation of MN of type clastogénico. On the other hand it has been reported that agencies malnourished antioxidant response in poor and that this fact derives poliinsaturated and likely damage to DNA.

The objective of the present work was to quantify the type of MN in reticulocytes (RET) and mature erythrocytes (E) using the flow cytometry, as well as evaluate the oxidant damage and antioxidant response of children with moderate and severe bacterial infections with malnutrition, to assess alterations caused by malnutrition on the genetic material and its relationship to the redox state of these children.

Data from this study indicate that children with moderate and severe malnutrition with associated infections show an increase in the frequency of MN in the two study populations. This indicates that malnutrition and infections could act together to induce damage to the DNA of these children. It was noted that the detected MN are mostly of type clastogenic.

On the other hand the data from this study demonstrate that children with malnutrition and infection have an increased oxidative damage and antioxidant response deficient. This indicates that malnutrition and infection could work together to bring down the antioxidant response, causing some ROS interact with DNA and thus induce DNA damage as measured by the increased frequency of RET and MN in peripheral blood E of these children.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desnutrición

El crecimiento se define como un proceso continuo que resulta de la compleja interacción entre los factores genéticos y el medio ambiente. En este contexto, la desnutrición es el resultado de una ingesta insuficiente de alimentos, la cual generalmente está relacionada con aspectos sociales y económicos (Sereebutra y col., 2006; Padula y col., 2009).

La desnutrición se origina por un desequilibrio entre el suministro de nutrientes y las necesidades que el organismo debe cubrir para asegurar el crecimiento y su buen funcionamiento (Shils y col., 1999; Campanozzi y col., 2009).

La desnutrición calórico proteica (DCP) es un estado clínico-patológico que se presenta, cuando una dieta no es capaz de satisfacer las necesidades corporales de proteínas y/o energía, que incluye una variedad amplia de manifestaciones clínicas, condicionadas por la intensidad relativa de la deficiencia de proteínas o de energía, la severidad y duración de las deficiencias, edad del paciente, causas de la deficiencia y asociación con otras enfermedades nutricionales o infecciosas. Las consecuencias (o repercusiones) de la desnutrición, van desde la pérdida de peso o retardo del crecimiento, hasta distintos síndromes clínicos frecuentemente asociados con deficiencias de vitaminas o minerales.

La desnutrición infantil suele estar condicionada fundamentalmente por los cuidados específicos durante la etapa fetal y los primeros dos o tres años de vida y se asocia con una pobre ganancia de peso de la madre durante el embarazo, la omisión de la lactancia materna, la falta de prevención de enfermedades infecciosas y su manejo incorrecto una vez que éstas se presentan (Ávila y col., 1998).

La pobreza acompaña casi siempre a la DCP. Esto lleva a baja disponibilidad y acceso a los alimentos, falta de medios para producirlos o comprarlos, malas condiciones sanitarias, hacinamiento, mal cuidado de los niños, ignorancia y malas prácticas alimenticias (Rodríguez y col., 2011).

Joaquín Cravioto, que fue un prominente investigador en el área de la desnutrición infantil, mencionó que “El origen de la desnutrición está cimentado en el mal funcionamiento de la sociedad y las condiciones que de éste se derivan, entre ellas, la injusticia social” (Gómez y col., 1956, Rodríguez y col., 2011) (Figura 1).

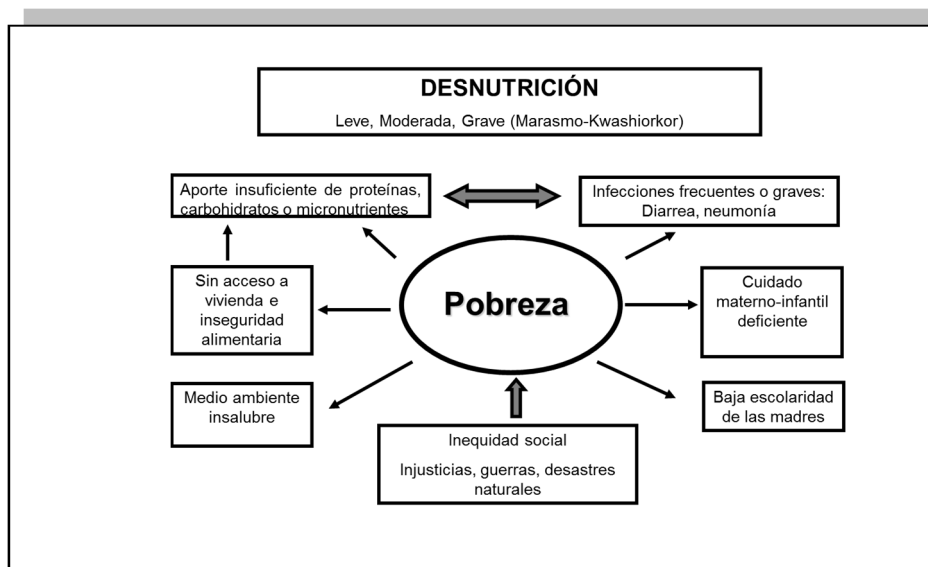


Figura 1. Diversos factores involucrados en la problemática de la desnutrición. La pobreza es el factor social determinante en su origen, desarrollo y desenlace (Modificada de Rodríguez y col., 2011).

Con base a su etiología, esta patología se ha clasificado en dos categorías:

→ Desnutrición primaria: originada por la ingesta insuficiente de alimento, ya sea porque éste no se encuentre disponible o porque aunque existe, no se consume. Por lo general tiene origen socioeconómico y cultural, así mismo se relaciona con el poder adquisitivo insuficiente.

→ Desnutrición secundaria: se produce cuando el alimento no es consumido o no es debidamente utilizado por el organismo, porque existen condiciones que:

a) Interfieren con la ingestión: enfermedades neurológicas, motoras, psiquiátricas, estomatológicas, infecciosas y/o digestivas que producen

anorexia o vómito.

b) Aumentan los requerimientos energéticos y/o las necesidades de regeneración tisular: infecciones crónicas, quemaduras, traumatismo múltiple, hipertiroidismo, fístulas artero-venosas, etc.

c) Interfieren con la digestión y absorción: deficiencias enzimáticas digestivas congénitas o adquiridas, fibrosis quística del páncreas, insuficiencia hepática, alteraciones de vías biliares, pancreatitis, procesos inflamatorios crónicos de tubo digestivo como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa crónica inespecífica, infecciones o infestaciones enterales, etc.

d) Dificultan la utilización: Diabetes mellitus, neoplasias, enfermedades congénitas del metabolismo de carbohidratos, proteínas o lípidos, enfermedades pulmonares crónicas, cardiopatías congénitas, etc.

e) Aumentan la excreción: diarrea crónica, fístulas enterales, urinarias o pleurales, problemas renales que afectan al glomérulo (síndrome nefrótico), a la función tubular o ambos (insuficiencia renal crónica), quemaduras extensas, etc.

La clasificación de la desnutrición, propuesta por Federico Gómez (Gómez y col., 1956), ha sido usada para evaluar la gravedad de la misma. La estratificación de la desnutrición en leve, moderada y grave, ha ayudado a sistematizar las características clínicas de cada grado, mas aún, el riesgo de muerte está directamente relacionado con el grado de desnutrición (Rodríguez y col., 2011). Este sistema de clasificación, que utiliza como indicador el déficit de peso para la edad, es uno de los más usados y es muy útil para clasificar a niños menores de cinco años. Los valores pueden ser locales o internacionales, y permiten reconocer los signos clínicos de la desnutrición, así como sus grados:

→ Desnutrición leve o de primer grado: cuando el déficit de peso se encuentra entre el 10% y el 24%. El niño presenta llanto crónico, mal humor y duerme poco. Su peso es similar al presentado en el último mes de revisión, no se observa diarrea, ni vómito y no hay presencia de infecciones, debido a que el sistema inmunitario del niño se encuentra casi íntegro. El dato principal que se observa, y solamente si se busca, es la detención en el incremento del peso

corporal o un ligero descenso de él que persiste a través de las semanas; el niño avanza en edad y el peso se va quedando a la zaga. Si el niño es atendido oportunamente, las repercusiones de este grado de desnutrición pueden ser revertidas (Gómez y col., 2003).

→ Desnutrición moderada o de segundo grado: el déficit de peso es mayor de 25% y menor de 40%. La fontanela y los ojos se hundén, los tejidos del cuerpo son flácidos, el niño duerme con los ojos entreabiertos, presenta resfriados y otitis, así como diarrea e irritabilidad. El final de esta etapa de la gravedad de la desnutrición es alarmante y obliga a los padres a recurrir al médico si antes no la habían hecho. Si el médico es sólo alertado por el accidente enteral agudo, o por la faringitis o la otitis y sin hacer una cuidadosa búsqueda en la dieta del niño para estimar su calidad y su rendimiento energético, pasa por alto este renglón vital de orientación, y prescribe “para la infección”, el niño presentará con el tiempo, un cuadro de desnutrición más grave. Por otra parte, si las medidas dietéticas y terapéuticas a que se acuda no son lo suficientemente cuidadosa y efectivas, el paciente cae en una intolerancia a toda clase de alimentos y a toda cantidad que se le dé; esta intolerancia obliga a cambios frecuentes en la dieta y a nuevos intentos de adecuación digestiva por parte del organismo, en los cuales se pierde tiempo, se va aumentando la destrucción de las reservas y el desplome de la curva de peso, que cada vez se aleja más del paralelismo normal con la curva de la edad (Gómez y col., 2003).

→ Desnutrición grave o de tercer grado: cuando existe un déficit de peso mayor al 40%. Se caracteriza por la exageración de todos los síntomas que se han enumerado en las dos etapas anteriores de desnutrición, y el niño llega a ella bien sea porque no hubo una mano experta que guiara la restitución orgánica, o porque la pobreza y la ignorancia hicieron su papel homicida, o porque a pesar de las medidas tomadas, ya la célula y su mecanismo metabólico habían entrado en una fase negativa o de desequilibrio anabólico que no permiten que se aprovechen ni las cantidades mínimas para sostener la pobre actividad del paciente.

El marasmo y el kwashiorkor son las principales manifestaciones clínicas de la desnutrición grave, y tienen antecedentes y características clínicas que las distinguen claramente (Vásquez, 1998; Golden, 2002).

1.1.1 Desnutrición tipo marasmo

El marasmo se presenta en niños de menores de un año de edad, y es una forma extrema de la desnutrición DCP. Esta condición es producto de una dieta pobre en proteínas y calorías, en combinación con muchas otras carencias y se caracteriza por un importante retraso del crecimiento (Parra-Gómez y col., 2003). Los síntomas que se presentan dependen de las causas, gravedad y duración de la desnutrición y pueden ser pérdida de la grasa corporal, estómago inflamado, ojos hundidos, cara de “viejito”, pérdida de peso, cambios en el color del cabello, predisposición a la hipoglucemia, diarreas frecuentes y una apariencia física de inanición severa (Vega-Franco, 1999, Rodríguez y col., 2011) (Figura 2).

El marasmo puede originarse por diversas causas:

1. El cese de la lactancia materna antes de que el niño sea capaz de recibir una dieta balanceada.
2. La pobreza de la población.
3. Un nuevo embarazo con la consecuente interrupción de la lactancia materna.

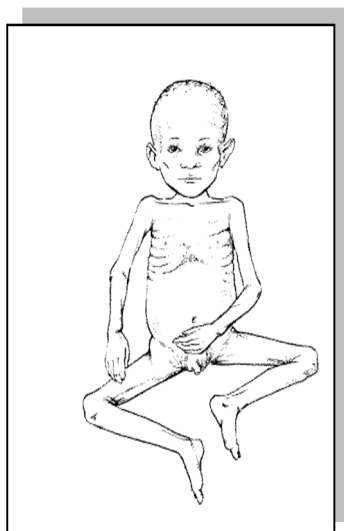


Figura 2. Marasmo. Se caracteriza por una emaciación muscular generalizada y la ausencia de grasa subcutánea. Algunos pacientes presentan anorexia y otros, hambre voraz. Puede haber estreñimiento o diarrea. Hay marcada debilidad. Las gastroenteritis agudas, la deshidratación, infecciones respiratorias y las lesiones oculares, son complicaciones frecuentes (Modificada de Jelliffe, 1985).

1.1.2 Desnutrición tipo Kwashiorkor

Kwashiorkor es un síndrome que se presenta generalmente en niños que comen suficientes carbohidratos pero no tienen proteínas en su dieta, se registra en niños de 1 a 5 años de edad. Generalmente estos niños han recibido lactancia materna prolongada por más de un año sin alimentación complementaria adecuada, presentan edema de grado variable que se ve acompañado por la inflamación de piernas, del dorso de las manos y de los párpados, en adición, sobre estos edemas hay manifestaciones hipercrómicas, acrónicas y discrómicas, la piel está afectada con diversas dermatosis, principalmente por deficiencia de vitamina A, infecciones bacterianas y/o micóticas, también se descama, siempre está reseca y se rasga con facilidad. El pelo es escaso, reseco quebradizo y fácilmente se desprende. El niño no crece, tiene antebrazos muy delgados, se muestra triste e irritable, presenta anemia y diarrea semilíquida, falta de apetito, estómago inflamado y apatía mental pronunciada (Sauerwein y col, 1997; Vega-Franco, 1999; Gómez y col., 2003; Krawinkel, 2003).

También se observa una intolerancia absoluta a la alimentación, vómitos y presencia de infecciones enterales y parenterales. El catabolismo aumenta desproporcionalmente, por lo que las funciones de arrastre y deshecho acaban con las reservas proteicas, glucogénicas y de grasas del organismo. Las sales minerales y el agua se pierden excesivamente originando una anhidremia aguda (Vásquez, 1998; Vega-Franco, 1999; Gómez y col., 2003).

Pese a no ser una manifestación necesaria para el diagnóstico, el retraso del crecimiento suele formar parte del cuadro clínico del kwashiorkor. Fisiológicamente el kwashiorkor es una desnutrición más compleja que el marasmo porque sus efectos son más amplios debido a deficiencias en aminoácidos específicos y su asociación con enfermedades oportunistas (Parra- Gámez y col., 2003) (Figura 3).



Figura 3. Kwashiorkor. La principal característica es un edema blando, e indoloro que es muy evidente en el abdomen, aunque también se observa en pies y piernas. Con frecuencia hay anorexia y diarrea profusa. Las causas más frecuentes de muerte son: edema pulmonar, bronconeumonía, septicemia, gastroenterocolitis y deshidratación. Bioquímicamente, el cambio más característico es la disminución de la albúmina sérica (Modificada de Jelliffe, 1985).

También se ha reconocido una forma mixta de desnutrición de tercer grado, marasmo-kwashiorkor, que engloba las características de las dos anteriores, se presenta en niños de alrededor de un año de edad y su pronóstico es reservado, ya que se trata de una forma crónica y agudizada, más grave y descompensada (Vásquez, 1998, Rodríguez y col., 2011).

Durante la etapa de los 0 a 5 años ocurren los cambios más importantes en el crecimiento y desarrollo, el crecimiento alcanza las velocidades más elevadas y los niños alcanzan logros importantes en su desarrollo en periodos muy cortos de tiempo. Es durante esta fase que el menor alcanza el desarrollo completo del sistema inmunitario y adquiere habilidades y destrezas en su desarrollo psicomotor que lo prepararan para un ingreso adecuado al sistema educativo formal. En un periodo tan importante para la formación del individuo, la alimentación y la nutrición ocupan un lugar central, al proporcionar la energía y los nutrimentos necesarios para soportar las exigencias del crecimiento y propiciar las condiciones para que se manifieste un desarrollo óptimo (Figura 4).

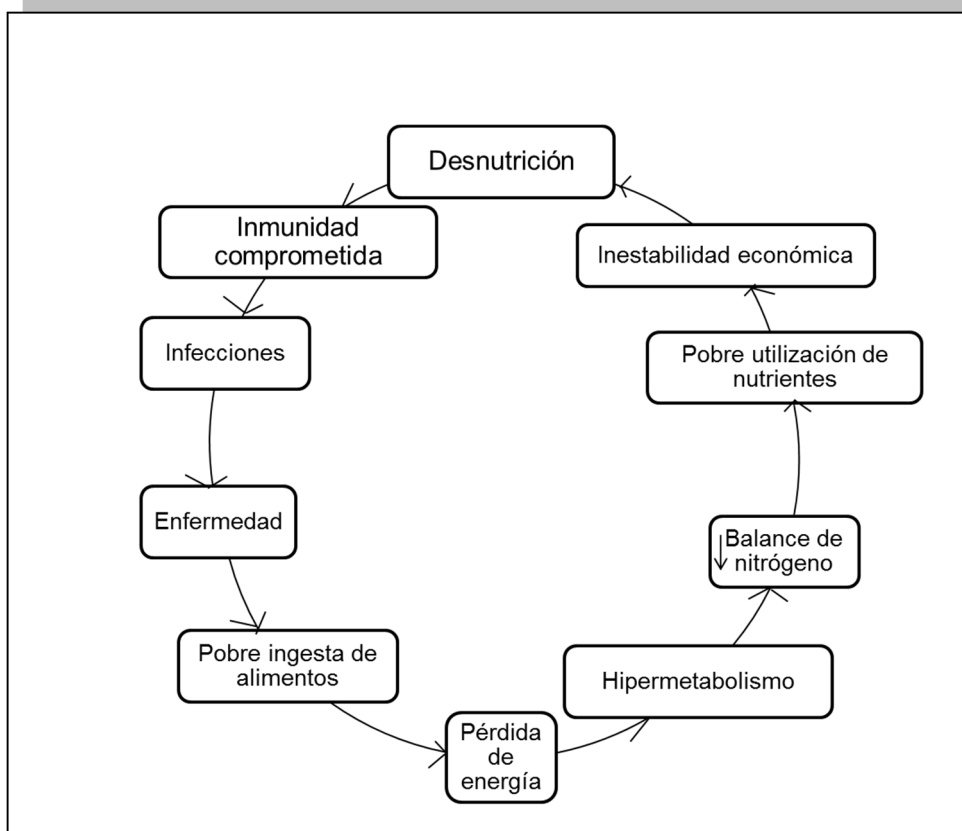


Figura 4. La desnutrición se relaciona con diversos factores, que en conjunto, comprometen la salud y la vida de los niños que la padecen (Modificada de Rodríguez y col., 2011).

La alimentación deficiente en la infancia deja huellas irreversibles. El crecimiento y desarrollo defectuosos provocarán baja estatura, mayores riesgos de enfermedad y bajo desempeño escolar. La desnutrición en menores de cinco años provoca un gran número de consecuencias en el organismo. Se han documentado efectos a corto, mediano y largo plazo (Uauy, 2008).

El tratamiento de la desnutrición se basa en el conocimiento de los factores etiológicos que la determinan y de los mecanismos patogénicos que están presentes en cada individuo, pero debe cumplir los siguientes requisitos generales:

- Eliminar los agentes etiológicos que dieron origen a la desnutrición y asegurar un balance térmico adecuado, particularmente en neonatos y lactantes.

→ Permitir que el organismo repare los daños ya causados durante los diversos estadios patogénicos en que se traduce el balance negativo y, por lo tanto, ser suficientemente prolongado para lograr una rehabilitación completa.

→ En desnutrición de primero y segundo grado la dieta debe ser generosa, balanceada, completa y variada, de fácil digestión, agradable, sencilla de ingerir, permitiendo que sea consumida *ad libitum*. En la desnutrición de tercer grado debe evaluarse la corrección de las alteraciones hidroelectrolíticas agudas que ponen en peligro la vida, la introducción de la alimentación es gradual, y debe asegurar el aporte balanceado de carbohidratos con poca fibra insoluble, proteínas de alto valor biológico, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y oligoelementos, recordando que los procesos de ingesta, digestión, absorción y utilización causan un gasto térmico y energético.

→ No deben manejarse las manifestaciones universales ni circunstanciales pero sí las agregadas, particularmente las infecciones o infestaciones concomitantes.

Si se ha tenido éxito podrá observarse una rápida mejora del apetito e interés por los alimentos, aumento de peso progresivo, desaparición del edema, curación de las lesiones de piel, normalización de albúmina, electrolitos y pH séricos, así como recuperación del crecimiento. Además aparecen: hepatomegalia progresiva, abdomen globoso, ascitis con red venosa colateral, hiperhidrosis, hipertricosis tardía en frente, hombros y muslos, aumento de volumen y tono muscular en muslos, eosinofilia y elevación de inmunoglobulinas.

1.2 Desnutrición en México

En 2003, los especialistas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán definieron un indicador preciso del estado de nutrición en el país por municipio: el Índice de Riesgo Nutricional por Municipio, que incluye 14 variables agrupadas en tres bloques: estadísticas vitales (indicadores de mortalidad); sociales (de pobreza y marginación); y antropométricas (déficit de talla). En esta clasificación, 70% de los municipios del país que concentran 30%

de la población tienen problemas graves de nutrición.

En 2006, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), realizó la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENASUT). Los resultados mostraron que en nuestro país 472 890 niños menores de cinco años se clasificaron con bajo peso (5%); 1 194 805 con baja talla (12.7%) y alrededor de 153 mil niños mostraron desnutrición grave (1.6%) en todo el país.

Aunque el reporte de la ENASUT destaca que la prevalencia de las distintas formas de desnutrición entre niños menores de cinco años disminuyó entre el 2000 y el 2006, es importante tomar en cuenta que es una práctica común no reportar en los certificados de defunción de los niños, a la desnutrición como causa de muerte, por lo que existe un elevado subregistro de la desnutrición en todo el país.

Por otro lado, la ENASUT demostró que la prevalencia de baja talla en menores de cinco años sigue siendo elevada y el número absoluto de niños con esta condición -casi 1.2 millones- es preocupante. Además el INSP encontró que la prevalencia de anemia observada en niños menores de 5 años en el ámbito nacional fue de 23.7%. Se calcula que aproximadamente 1.8 millones de niños preescolares padecen anemia en todo el país.

En el nivel estatal, hay ocho entidades con riesgo nutricional grave: Estado de México, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Yucatán (INSP, 2011) (Figura 5).



Figura 5. Entidades en la República Mexicana con riesgo nutricional grave, según el índice de Riesgo Nutricional por Municipio.

A nivel mundial, la desnutrición afecta aproximadamente a un tercio de la población infantil, siendo los países en vías de desarrollo los que presentan la mayor incidencia de niños desnutridos, lo cual constituye un serio problema de salud pública, ya que alrededor de un 60% de las muertes que se registran en niños menores de cinco años, se relacionan directamente con la desnutrición y con las patologías asociadas a ella (Gray y col, 2006; Faruque y col. 2008; Padula y col., 2009).

1.3 Desnutrición e infecciones

Existe amplia evidencia de que la relación entre la desnutrición y las infecciones es bidireccional (Brown, 2003; Rodríguez y col., 2011). Existen múltiples mecanismos de acción en la relación entre la desnutrición y la susceptibilidad a las infecciones bacterianas, por ejemplo, se ha reportado que la DCP afecta el desarrollo normal del sistema inmunológico (Bhaskaram, 1992), ante la presencia de infecciones, la respuesta inmunológica deber ser estimulada adecuadamente. Esta estimulación depende de nutrientes que no están disponibles cuando un organismo se encuentra en un estado nutricional deficiente,

por lo que se establece un círculo vicioso entre la desnutrición, la deficiencia de respuesta inmunológica y la susceptibilidad a infecciones (Rodríguez y col., 2011) (Figura 6).

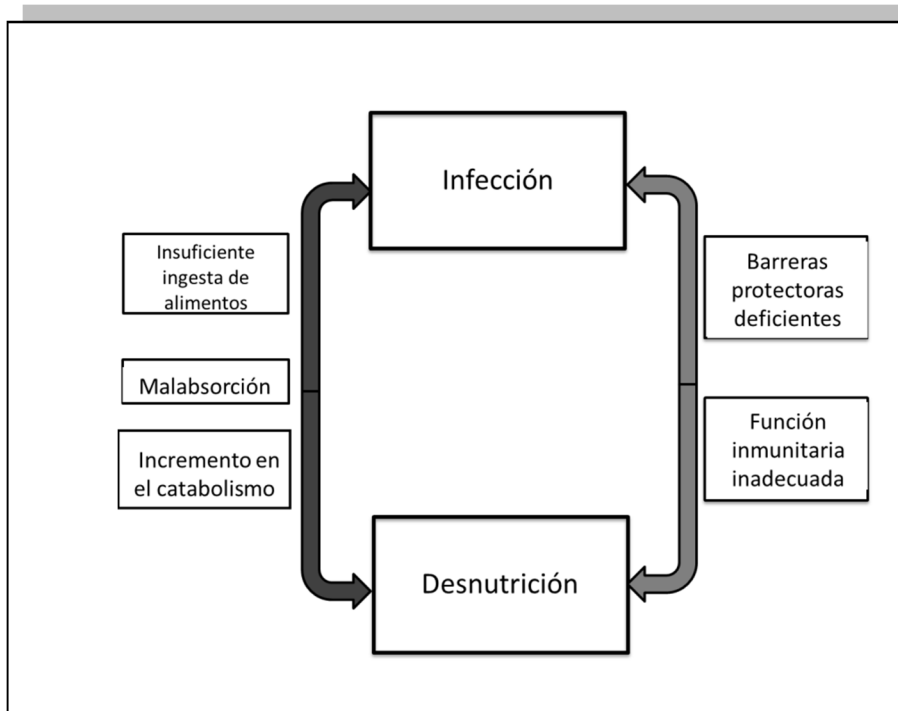


Figura 6. Relación desnutrición-infección. Los niños con desnutrición presentan una respuesta inmunitaria deficiente que los hace susceptibles a las infecciones, y las infecciones que padecen no les permiten recuperar un buen estado nutricional (Modificada de Rodríguez y col., 2011).

La infección por sí misma, puede causar una pérdida importante de las reservas nutricionales del organismo (proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas), y además durante la respuesta inmunológica, la demanda energética aumenta. Estos factores actúan en conjunto para que el organismo vea más comprometido su estado nutricional (Rodríguez y col., 2011).

La respuesta metabólica a las infecciones incluye hipermetabolismo, un balance negativo de nitrógeno, un aumento de la gluconeogénesis y el incremento de la oxidación de lípidos (Wilmore, 1990).

Los niños desnutridos, por lo general, sufren de infecciones gastrointestinales y respiratorias. La primera línea de defensa contra este tipo de infecciones es la respuesta inmunológica innata, particularmente las barreras epiteliales. La DCP compromete la integridad de las mucosas en los tractos gastrointestinal, respiratorio y urinario (Rodríguez y col., 2011).

Se ha reportado que algunos padecimientos gastrointestinales como la diarrea, afectan directamente la integridad, morfología y función de la mucosa del intestino, lo cuál conduce a una mala absorción de los nutrientes, de tal forma que se ha reportado que una proporción importante de niños desnutridos no pueden recuperarse debido a la presencia constante de infecciones (Guerrant y col., 2008).

Por otro lado, existe evidencia de que la desnutrición es un factor de riesgo importante para contraer neumonía (Rodríguez y col., 2011). Las infecciones respiratorias agudas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, y representan entre el 30% y 50% de las consultas pediátricas y entre el 20% y 40% de hospitalización en niños. Los principales factores de riesgo para adquirir infecciones respiratorias son la pobreza, destete temprano o ausencia de lactancia materna, higiene inadecuada, poco cuidado paternal, falta de recursos económicos y la desnutrición (Cashat y col., 2005).

1.4 Efectos de la desnutrición a nivel citogenético

La relación entre la desnutrición y el daño genético ha sido ampliamente estudiada en humanos y en modelos animales (Ortiz y col., 2004; Padula y col., 2008; Ortiz y col., 2011). Se ha encontrado que en niños desnutridos con edades entre 1 y 60 meses, existe una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas como lo son cromosomas dicéntricos, intercambio de cromátidas hermanas, rompimientos de la cadena de ADN y formación de micronúcleos (MN). Estas alteraciones han sido encontradas en linfocitos de sangre periférica y en cultivos celulares de médula ósea, confirmándose que estas anomalías persisten aun cuando los niños recuperan su peso y su talla (Armendares y col. 1971; Padula y col, 2009).

Diversos estudios han establecido que durante el periodo de lactancia, la desnutrición ejerce efectos adversos en algunos tejidos. Con respecto a esto, Cortés y col. (2001), utilizando un modelo de desnutrición en ratas, demostraron mediante el ensayo cometa, que existían altos índices de daño a ADN en bazo, sangre periférica y médula ósea en ratas de 21 días de edad.

Por otro lado, Ortiz y col. en 2004, encontraron que en ratas desnutridas tratadas con Mitomicina C, había una elevada frecuencia de reticulocitos micronucleados y que en comparación con ratas bien nutridas, el daño al ADN era evidente. Complementando estos estudios, utilizando citometría de flujo, se demostró que ratas con desnutrición grave, había una frecuencia elevada de MN en reticulocitos, lo cual refleja un daño importante al ADN. También determinaron que un fármaco ampliamente usado en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias en niños, el Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX), tiene efecto genotóxico (Medina, 2005; Ortiz y col. 2011).

En un estudio realizado en linfocitos de sangre periférica de niños con desnutrición (Ortiz y col., 1997) se demostró, mediante el ensayo de la inhibición de la citocinesis, que los niños desnutridos con infecciones respiratorias y gastrointestinales asociadas, mostraban una frecuencia elevada de MN en sus linfocitos en comparación con niños bien nutridos. Estos resultados indicaron que estos niños exhibían daño cromosómico, por lo que se propone que puede incrementar su susceptibilidad de sufrir transformaciones malignas.

1.5 Micronúcleos

Durante la división celular el ADN contenido en el núcleo se duplica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso puede producirse de manera incorrecta debido a errores durante la duplicación y posterior división del ADN, a rupturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor

tamaño que el primario denominado MN, visible fácilmente al microscopio óptico (Fenech y col., 1999; Zalacain y col., 2005) (Figura 7).

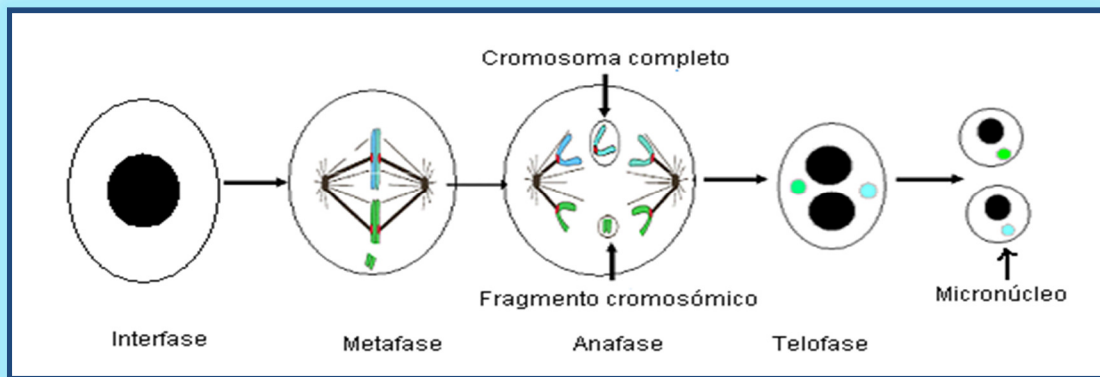


Figura 7. Un MN se forma cuando un cromosoma completo o un fragmento del mismo, no se incorpora dentro del núcleo principal durante la división celular (Modificada de Mateuca, 2006).

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico en cultivos de linfocitos humanos, fue propuesto por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese experimentado una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis-block micronucleus), el fundamento del ensayo es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B cuya función es impedir la citocinesis celular (Zalacain, 2005).

Los criterios definidos por el Proyecto Humano para Micronúcleos (HUMN-Project, por sus siglas en inglés) para identificar un MN al microscopio en células binucleadas son los siguientes:

1. El diámetro oscila entre 1/16 a 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal.
2. No son refractarios.

3. Poseen una intensidad de tinción similar a los núcleos principales.
4. Forma similar a los núcleos de la célula binucleada.
5. No están conectados con ninguno de los núcleos de la célula.
6. Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada, pero no se solapan con ellos (Zalacain y col., 2005) (Figura 8).



Figura 8. Linfocito binucleado, obtenido por la técnica de bloqueo de la citocinesis (en el extremo inferior se ubica un MN) (Modificada de Ortiz y col., 1997).

Se reconocen dos tipos de MN:

a) Los que están constituidos por cromosomas enteros que no se unieron al huso mitótico, o que se unieron de forma merotética¹ a los microtúbulos del huso mitótico. Estos cromosomas no se incorporan al núcleo principal y generan un MN en el citoplasma después de que la célula pasa a la etapa de interfase. Estos MN se consideran de tipo aneugénico, es decir, están conformados por cromosomas completos y, están relacionados con la pérdida de cromosomas enteros.

¹ Posición merotética: Cuando al menos una cromátida se ancla simultáneamente a los microtúbulos del huso mitótico generados por ambos polos. Esto genera tensión centromérica y sino se corrige, la cromátida unida a ambos polos simultáneamente permanecerá como un cromosoma retrasado en anafase, y finalmente se romperá en dos fragmentos, que se repartirán entre las células hijas, generando aneuploidía.

b) Los constituidos por cromosomas acéntricos. Estos MN están conformados por fragmentos cromosómicos, que revelan que hubo una ruptura de la cadena de ADN. Estos MN son de tipo clastogénico y se les vincula con la pérdida de fragmentos cromosómicos (Mateuca y col., 2006; Cammerer y col., 2007; Shimizu, 2011) (Figura 9a y 9b). Además, se sabe que si se forma un puente cromatínico entre cromosomas separados durante la anafase, éste se puede romper durante la citocinesis, generándose de esta forma un MN (Shimizu, 2011) (Figura 9b).

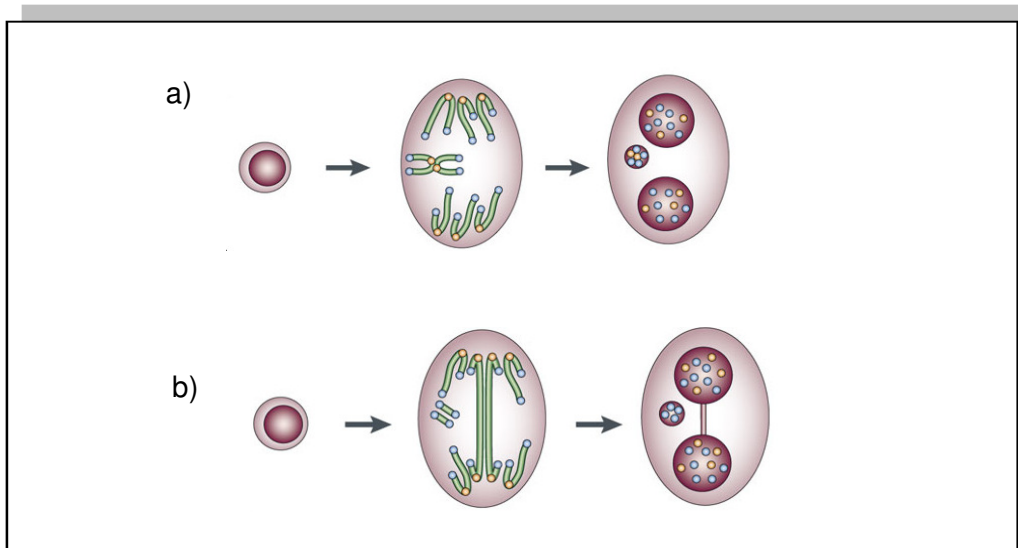


Figura 9. a) Se esquematiza la formación de un MN de tipo aneugénico, relacionado con la pérdida de cromosomas enteros. **b)** Formación de un MN formado por cromosomas acéntricos (de tipo clastogénico),. Se le asocia con la pérdida de segmentos cromosómicos. También se muestra un puente cromatínico, cuya ruptura puede derivar en la formación de un MN de tipo clastogénico (Modificada de Fenech, 2007).

Debido a que dichas alteraciones son el resultado de una mitosis anormal y puesto que la presencia de MN refleja daño en el material genético, en 1999 el ensayo de MN fue validado a nivel mundial y actualmente es usado como un biomarcador efectivo para cuantificar daño al ADN (Zalacain y col., 2005). Hoy en día, estas estructuras pueden ser usadas como un biomarcador de estrés genotóxico inducido por drogas, por influencias ambientales y por deficiencias nutricionales (Fenech y col., 2011; Shimizu, 2011).

En años recientes se han implementado métodos para realizar el ensayo de MN usando citometría de flujo. Esto ha hecho posible analizar muestras de sangre periférica en lugar de células de médula ósea, lo cual confiere al estudio una serie de ventajas importantes, ya que no es invasivo, se requiere poca muestra de sangre para llevarlo a cabo, se analizan un gran número de células (lo cual da un alto poder estadístico), es confiable y proporciona resultados objetivos (Dertinger y col., 2000; Tourus y col., 2003; Dertinger y col., 2003, 2006). Actualmente estos métodos pueden implementarse para analizar eritrocitos de sangre periférica de especies en las cuales el efecto del bazo es particularmente evidente, ya que éste es capaz de filtrar los eritrocitos que presenten inclusiones intracelulares, lo cual podría reducir la sensibilidad de la prueba, sin embargo, existe amplia evidencia de que el ensayo es confiable y reproducible (Abramsson-Zetterberg y col., 2000; Grawé y col., 2005; Stoooper y col., 2005; Cammerer y col., 2007; Dertinger y col., 2003, 2004, 2006, 2007, 2011; Witt y col. 2008).

El principio del ensayo de MN en eritrocitos se basa en que una porción o porciones de cromosomas permanecen en la célula cuando el reticulocito expulsa el núcleo durante la fase final de su maduración, generándose así, un reticulocito con MN (Figura 10).

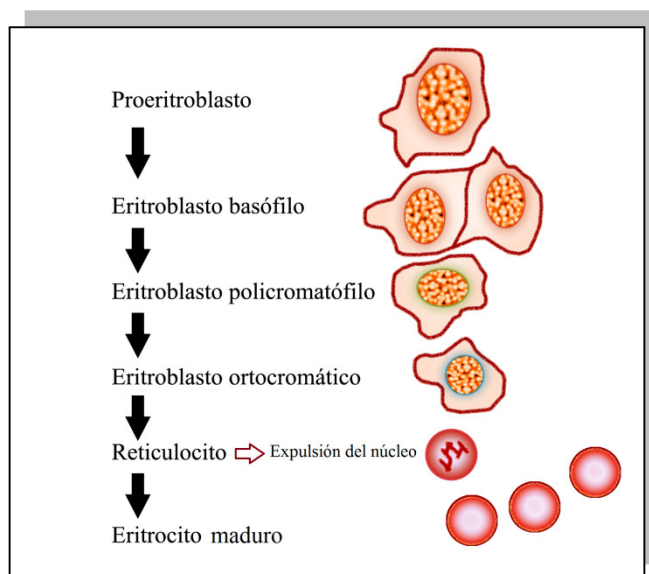


Figura 10. Los RET expulsan el núcleo para dar origen a los eritrocitos maduros. En el ensayo de MN se detectan las porciones de cromosomas que permanecen en los RET y E como consecuencia de la formación de MN (Modificada de <http://dispace.uah.es>).

Los MN son estructuras que pueden ser detectadas por medio de la Citometría de flujo usando una combinación de colorantes fluorescentes, como el yoduro de propidio, que se unen al ADN y anticuerpos monoclonales combinados con fluorocromos para marcar las poblaciones celulares de interés (Dertinger y col, 2003, 2004, 2006; Hamasaki y col., 2007) (Figura 11).

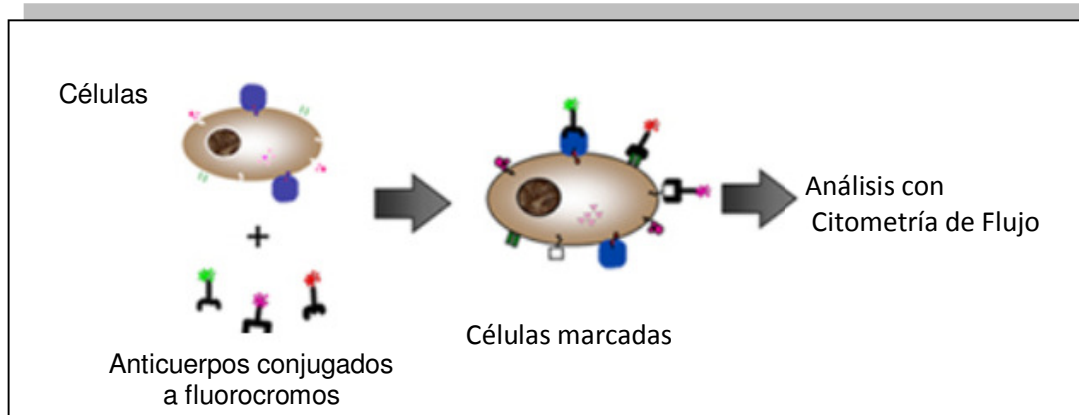


Figura 11. En la citometría de flujo se utilizan anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos para marcar células, ya sea utilizando anticuerpos contra receptores de membrana o utilizando colorantes para hacer tinciones intracelulares (Modificada de Barrera, 2004).

1.6 Desnutrición, estrés oxidante y respuesta antioxidante

La literatura científica actual presenta datos acerca de la lesión oxidante en los sistemas biológicos y el papel de los distintos antioxidantes, tanto en estados fisiológicos como durante el crecimiento y el envejecimiento, o en condiciones patológicas como aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y neoplasias. Numerosos trastornos de la niñez han sido atribuidos a lesión oxidante relacionada con el papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO), pero la patogénesis y progresión de esas enfermedades sólo han sido parcialmente definidas (Sharda, 2006).

Se ha reportado que los sistemas antioxidantes son deficientes cuando un organismo padece desnutrición. Esta deficiencia puede resultar en una excesiva producción de ERO, lo cual a su vez genera daño al ADN nuclear y mitocondrial,

así como a lípidos de membrana y a proteínas, culminando con la muerte celular (Ball y col., 1998; Ashour y col., 1999; Fang, 2002).

A lo largo de los años se han llevado a cabo estudios para dilucidar la relación existente entre la desnutrición y el estrés oxidante, así como las consecuencias que de ésta pueden derivar. En relación a esto, se desconoce por qué algunos niños desarrollan marasmo y otros kwashiorkor como expresión extrema de la desnutrición. Según la teoría clásica del kwashiorkor, se debe a una deficiencia de proteínas con hipoalbuminemia que disminuye la presión oncótica (también llamada presión coloidosmótica, es la presión osmótica debida a las proteínas plasmáticas que aparece entre el compartimento vascular e intersticial) y propicia la salida del líquido extracelular y el marasmo principalmente a una falta de energía. Sin embargo, Gopalan (1968) encontró que el consumo de proteína no difiere entre los niños con marasmo y kwashiorkor, del mismo modo otros investigadores demostraron que la hipoalbuminemia no explica en todos los casos la aparición del edema (Golden y col., 1980; Golden, 1982).

Por otro lado, en diversos estudios se ha confirmado que los niños desnutridos tipo marasmo muestran alteraciones en los niveles de antioxidantes. Catal y col. demostraron que estos niños exhiben niveles altos de malondialdehído, lo cual se relaciona con daño por lipoperoxidación, y en consecuencia, con los sistemas antioxidantes poco eficientes (Catal, 2007).

1.7 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Desde el punto de vista de la química, todo compuesto que puede aceptar electrones es un agente oxidante, incluyendo el oxígeno. Por otro lado, los compuestos que donan electrones son reductores. Algunos de los agentes oxidantes que son muy reactivos se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las ERO se pueden dividir en radicales libres y no radicales. Los radicales libres son moléculas o átomos que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo, lo cual les confiere inestabilidad y una gran reactividad por su

afinidad para donar o recibir un electrón (Halliwell y Gutteridge, 2006; Avello y col., 2006).

En contraste, el grupo de compuestos no radicales abarca una variedad de moléculas reactivas, generadoras de radicales libres.

La reducción univalente del oxígeno es la causante de la generación de las tres ERO mas importantes: el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 y el $\cdot OH$, y ellas son las responsables de la toxicidad del oxígeno (Boveris, 1998; Tuma, 2001) (Figura 12).

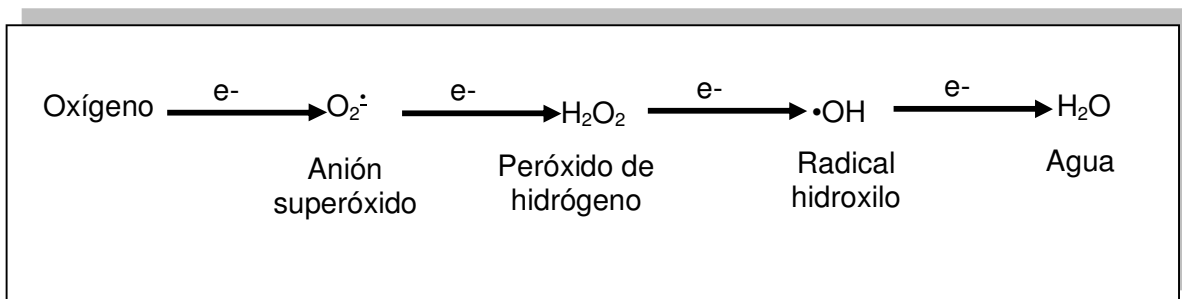


Figura 12. La reducción del oxígeno se da por la transferencia de un electrón a la vez, lo cual genera intermediarios inestables que pueden dañar componentes celulares. Primero se forma el $O_2^{\cdot-}$ después el H_2O_2 y finalmente el $\cdot OH$ (Modificada de Martínez, 2005).

Es importante considerar que el oxígeno basal (forma triplete) es muy poco reactivo, sin embargo, si se le suministra energía suficiente, uno de sus dos electrones desapareados sufre una inversión de espín quedando antiparalelos, lo que le confiere una gran reactividad. A esta especie se le conoce como oxígeno singulete y es la que tiene la capacidad de recibir un electrón.

1.7.1 El radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El $O_2^{\cdot-}$ se forma a partir de una molécula de oxígeno singulete cuando adquiere un electrón suplementario. Esta especie es producida por un gran número de enzimas, por reacciones de autooxidación y por transferencia no enzimática de electrones provenientes de la reducción molecular univalente del oxígeno. La autooxidación de leucoflavinas, hidroquinonas, catecolaminas, tioles, henoproteínas y ferredoxinas puede producir la reducción del oxígeno y generar $O_2^{\cdot-}$. Esta especie también se genera por parte de algunos organelos como

cloroplastos y mitocondrias.

El $O_2^{\cdot-}$ formado *in vivo*, tiene una vida media de milisegundos, y puede ser dismutado por la SOD con una rápida constante de reacción (o por vía no enzimática) en H_2O_2 . Su reactividad es débil, pero puede penetrar las membranas biológicas y causar daños a blancos específicos. Bajo condiciones de sobreproducción y agotamiento de sus secuestradores o neutralizadores, el $O_2^{\cdot-}$ puede interactuar con los -SH de las proteínas y enzimas de su vecindad e inactivarlas, agotar el glutatión e iniciar una cascada de eventos oxidantes que tienen como componente crítico la reacción de Haber-Weiss (Martínez, 2005). Puede además movilizar el hierro de las reservas intracelulares de ferritina y reaccionar con el hierro férrico para formar el radical perferrilo (Brent y col., 1993).

En presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación de $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 en la reacción de Fenton o Haber-Weiss da lugar a $\cdot OH$. El papel de $O_2^{\cdot-}$ en esta reacción es el de actuar como reductor del hierro. (Cadenas, 1989; Kruszewski, 2003) (Figura 13).

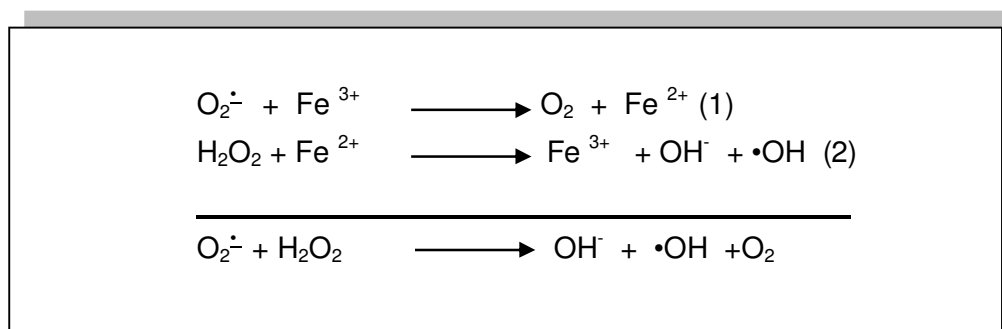


Figura 13. Reacción de Haber-Weiss (1) y Reacción de Fenton (2). El $O_2^{\cdot-}$ reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} , y éste reduce al H_2O_2 , formándose la especie $\cdot OH$. El Fe actúa como catalizador y puede ser sustituido por cobre (Modificada de Barja, 1997).

1.7.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se le considera un derivado no radical ya que carece de desapareamiento electrónico y debido a ello es menos lesivo que el anión $O_2^{\cdot-}$, además al ser una molécula pequeña y sin carga presenta una importante difusión tisular, lo cual le permite atravesar las membranas celulares y dar lugar a efectos adversos a mayor

distancia que otros radicales libres.

El H_2O_2 se forma a partir de una dismutación del O_2^\cdot . Esta reacción que es muy lenta a pH fisiológico, puede verse acelerada por la enzima SOD, que de este modo actúa como mecanismo de defensa contra los efectos deletéreos de esta molécula (Freeman y col., 1982).

1.7.3 El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

El $\cdot\text{OH}$ es el radical más reactivo encontrado en los sistemas biológicos (Aruoma y col., 1996). Posee un electrón desapareado que puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier tipo de molécula.

Se forma esencialmente a partir de O_2^\cdot y H_2O_2 , a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Figura 13), las que requieren trazas de metales de transición como catalizadores. En este caso el hierro juega el papel protagónico *in vivo*. No existen sequestradores específicos *in vivo* para esta especie.

La interacción de $\cdot\text{OH}$ con los ácidos grasos poliinsaturados, que componen los fosfolípidos de las membranas, desencadena el proceso de lipoperoxidación, lo cual conduce a una disminución de la fluidez de la membrana (Martínez, 2005).

Existen otro tipo de radicales libres secundarios u orgánicos, formados por la reacción de los radicales libres con otras moléculas biológicas, confiriéndoles a estos nuevos productos propiedades típicas de los radicales libres. Entre ellos se encuentran los radicales alcoxi y peroxi (generados por acción de un radical libre oxigenado sobre las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados), el radical semiquinolona, los radicales hipoclorito, el óxido nítrico, etc.

1.7.4 El Óxido Nítrico ($\cdot\text{NO}$)

El $\cdot\text{NO}$ es un gas incoloro que posee un electrón no apareado deslocalizado entre el átomo de nitrógeno y el de O_2 . El $\cdot\text{NO}$ es relativamente poco estable en presencia de O_2 molecular con un tiempo de vida media de aproximadamente 3 a 5s. El $\cdot\text{NO}$ se forma *in vivo* a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Este proceso tiene lugar en las células del endotelio vascular, las neuronas y en los fagocitos activados (Moncada y col.

1991). El $\bullet\text{NO}$ también conocido como factor relajante derivado del endotelio, es un importante mediador de las respuestas vasculares inducidas por diferentes agentes farmacológicos como la bradicinina y la acetilcolina (Claudio y col. 2003). Una vez generado, el $\bullet\text{NO}$ puede difundir localmente e interactuar con las moléculas blanco como la guanilato ciclasa, la enzima que cataliza la formación de GMPc. El $\bullet\text{NO}$ y el GMPc en conjunto comprenden un sistema de transducción de señales de espectro especialmente amplio. Las células del endotelio vascular pueden formar pequeñas cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que pueden reaccionar con el $\bullet\text{NO}$.

El $\bullet\text{NO}$ puede interactuar con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ en una reacción radical-radical para generar el anión peroxinitrito (ONOO^-), en una reacción que transcurre con una velocidad de $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{s}$. El ONOO^- puede ejercer su toxicidad directamente sobre las células o descomponerse en otros productos tóxicos, que incluyen el $\bullet\text{OH}$ (Maxwell, 2002). En el Cuadro 1 se muestra una lista de ERO y ERN, las cuales pueden generar daño e incluso muerte celular.

Cuadro 1. Se enlistan las principales ERO y ERN. Se muestran clasificados como radicales y no radicales.

Principales ERO y ERN		
	Radicales	No radicales
ERO	Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)
	Hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)	Ácido Hipocloroso (HOCl)
	Peroxilo ($\bullet\text{RO}_2$)	Ácido Hipobromoso (HOBr)
	Hidroperoxilo ($\bullet\text{HO}_2$)	Ozono (O_3)
		Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)
ERN	Oxido nítrico (NO)	Ácido nitroso (HNO_2)
	Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet})	Catión nitrosilo (NO^+)
	Anión nitroxilo (NO^-)	
	Peroxinitrito (ONOO^-)	
	Ácido peroxinitroso (ONOOH)	

El NO_2^{\bullet} , el N_2O_3 y el N_2O_4 son agentes nitrantes poderosos con capacidad de formar nitrosaminas potencialmente carcinogénicas.

1.8 Fuentes generadoras de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las sustancias oxidantes en los organismos vivos pueden provenir de una gran variedad de fuentes tanto endógenas como exógenas. Las fuentes exógenas incluyen la contaminación ambiental, los gases naturales deletéreos como el oxígeno hiperbárico, los efectos de la radiación ionizante y no ionizante, químicos, toxinas, bacterias patógenas y virus.

Las fuentes endógenas incluyen reacciones y enzimas que pueden producir de forma directa o indirecta ERO y ERN, tales como la reacción de Fenton, la xantina oxidasa y los neutrófilos (Souki y col., 2007). Por cada molécula de oxígeno que se convierte en agua se genera una energía de 105 kilocalorías. Por tanto, la vida aerobia utiliza el oxígeno para oxidar sustratos ricos en carbono e hidrógeno (alimentos), con el objeto de obtener energía química (ATP) y calor, esenciales para la vida (Cascales, 2005).

En los tejidos sanos durante el metabolismo, las células transforman los carbohidratos y grasas en ATP. Este proceso comienza en el citoplasma, donde se genera una pequeña cantidad de ATP para transformar los azúcares a piruvato. El proceso continúa en la mitocondria, para lo cual es necesaria la presencia de oxígeno. En este organelo el piruvato y la acetil-CoA son transformados hasta bióxido de carbono. La cadena respiratoria, también llamada cadena de transporte de electrones, está compuesta por cinco complejos enzimáticos: Complejo I, (NADH deshidrogenasa o NADH: Ubiquinona oxidoreductasa), Complejo II (Succinato: Ubiquinona-oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa), Complejo III (b_{c1} o UQ: citocromo c óxido-reductasa) y el Complejo IV (citocromo c oxidasa). Existe otro complejo enzimático, llamado complejo V o ATP sintasa, que se encarga de la producción de ATP (Figura 14).

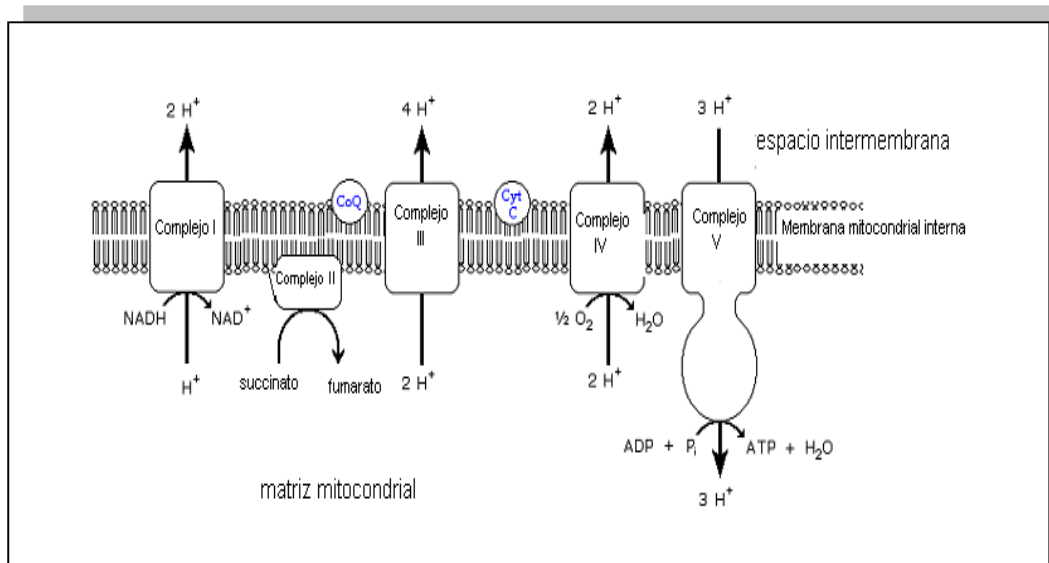


Figura 14. La cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones está compuesta por cinco complejos enzimáticos, localizados en la membrana interna mitocondrial y dos tipos de transportadores de electrones (ubiquinona y citocromo C). El paso de los electrones a través de los complejos hace que se transloquen protones (H⁺) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Este flujo de de H⁺ genera una diferencia de potencial electroquímico de protón, que es utilizado por la ATP sintasa para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato (Konigsberg, 2008).

En la cadena respiratoria, los electrones pasan de un agente reductor fuerte a un agente oxidante (O₂) en una serie de pasos. En condiciones típicas el O₂ gana cuatro electrones y cuatro H⁺ para formar dos moléculas de H₂O al final de la cadena, en el complejo IV. Sin embargo durante este proceso el O₂ puede encontrar una molécula con un electrón desapareado y reaccionar con ella. Este evento da como resultado la generación de ERO, las cuales debido a su inestabilidad comenzarán a reaccionar con otras moléculas (Tuma, 2001).

La fuente principal de ERO son las mitocondrias, ya que éstas son las responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular. De los cuatro complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado que los complejos que interactúan con la ubiquinona son los mayores productores de ERO, de tal forma que en mitocondrias aisladas se ha observado

una alta producción de ERO en el complejo I (Turnes y col., 1980; Tuma, 2001) y en el complejo III (Nohl, 1986; Tuma, 2001) (Figura 15).

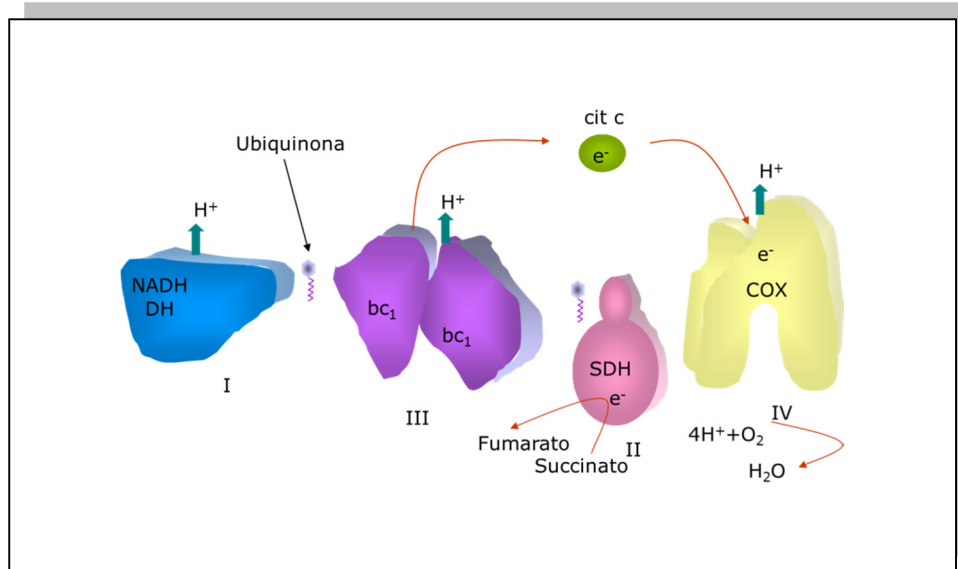


Figura 15. Se presume que los complejos I y III que interactúan con la ubiquinona son los mayores productores de ER (Modificada de Konigsberg, 2008).

La segunda fuente principal de ERO son los fagocitos, como los polimorfonucleares y macrófagos, del sistema inmunitario. Al encontrarse con un agente infeccioso, estas células experimentan un aumento del consumo de glucosa y oxígeno llamado “estallido respiratorio” (Beard, 2001). Dicho consumo ocurre principalmente en la membrana plasmática donde un complejo enzimático, la NADPH oxidasa, se activa y produce ERO a partir del oxígeno basal y electrones derivados de la vía de las pentosas (Bellavite, 1988; Morel y col., 1991). Estas ERO contribuyen a la destrucción o inactivación del agente infeccioso de modo directo, o por combinación con halógenos como el cloro para generar agentes extremadamente reactivos como el hipoclorito o las monocloraminas (Figura 16).

Durante la fagocitosis, la glucosa es metabolizada por la vía pentosa monofosfato formándose el NADPH. El citocromo b que forma parte de los gránulos específicos se combina con la NADPH oxidasa de la membrana y la

activa. La NADPH oxidasa utiliza al oxígeno para oxidar al NADPH. El resultado es la producción del $O_2^{\cdot-}$. Parte del anión $O_2^{\cdot-}$ es convertido a H_2O_2 y oxígeno singulete por la SOD. Adicionalmente, el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con H_2O_2 resultando en la formación de radicales $\cdot OH$ y más oxígeno singulete. El resultado de todas estas reacciones es la producción de los compuestos tóxicos como el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el oxígeno singulete (1O_2) y $\cdot OH$ (Enríquez-Rincón, 2007) (Figura 16).

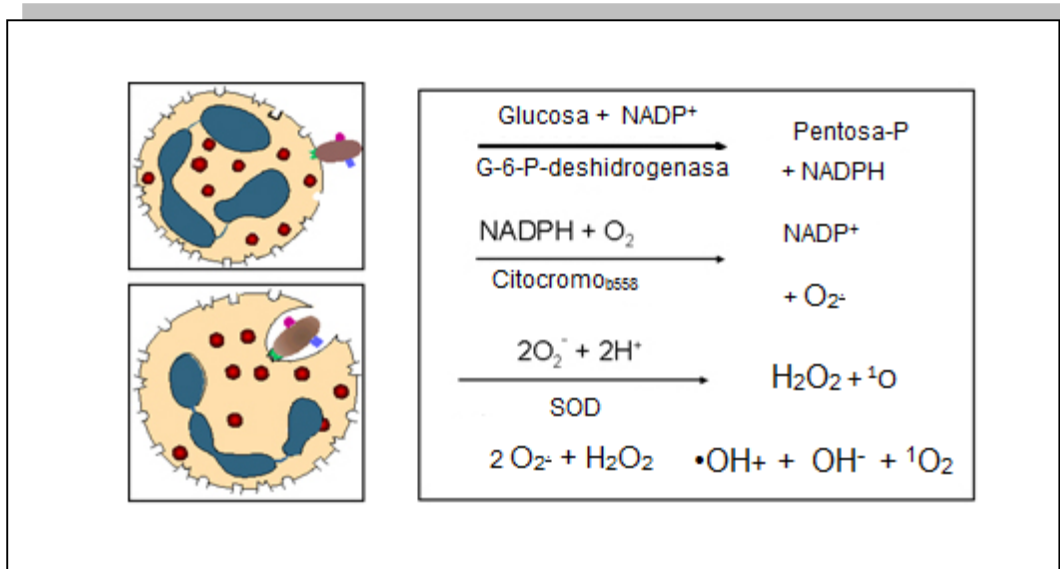


Figura 16. Muerte intracelular dependiente de oxígeno independiente de mieloperoxidasa. En este proceso de fagocitosis se producen ERO con la finalidad de atacar agentes patógenos (Modificada de Enríquez-Rincón, 2007).

En el proceso de muerte intracelular dependiente de oxígeno dependiente de mieloperoxidasa, esta enzima utiliza H_2O_2 y iones haluro (generalmente Cl^-) para producir hipoclorito, sustancia sumamente tóxica. Parte del hipoclorito se degrada espontáneamente para dar oxígeno singulete. El resultado de estas reacciones es la producción del hipoclorito (OCl^-) y de oxígeno singulete (1O_2) (Enríquez-Rincón, 2007) (Figura 17).

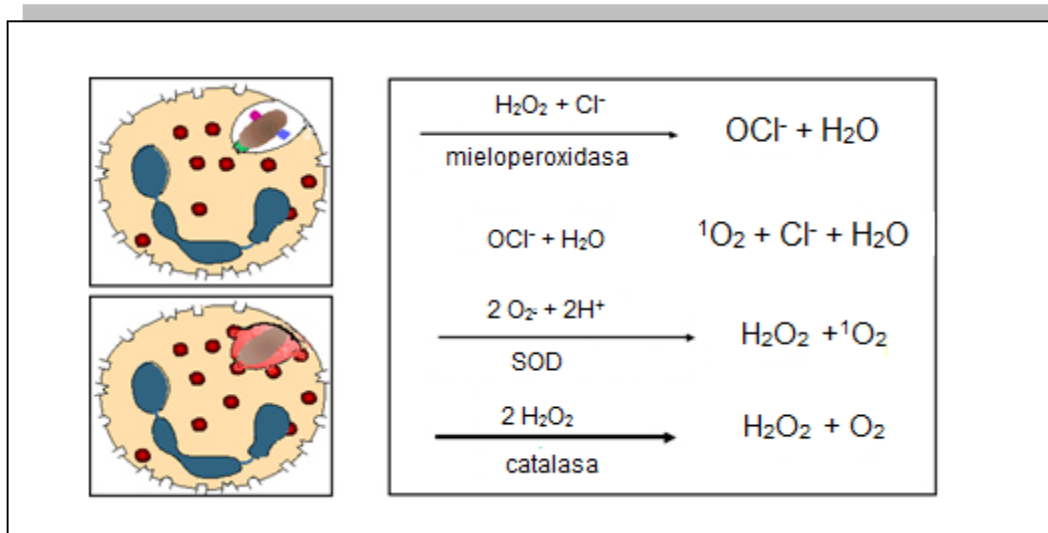


Figura 17. Muerte intracelular dependiente de mieloperoxidasa y oxígeno. Se utilizan H_2O_2 y Cl^- . Una fracción de este producto para producir hipoclorito, se degrada espontáneamente OCl^- y $\text{}^1\text{O}_2$ (Modificada de Enríquez-Rincón, 2007).

Otra fuente de ERO está relacionada con la xantina oxidasa (oxidasas catabólica, presentes en los peroxisomas) (Bermúdez, 2001). La acumulación de hipoxantina y xantina, bajo condiciones anaeróbicas, de isquemia (deficiencia de irrigación sanguínea –que empobrece la llegada de sangre y, por consiguiente de oxígeno a un tejido- con posterior reflujo sanguíneo y consecuente afluencia de oxígeno) o de bajo contenido energético, puede desembocar en la producción de $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^\bullet$, según la siguiente cascada de reacciones (Ríos, 2003) (Figura 18).

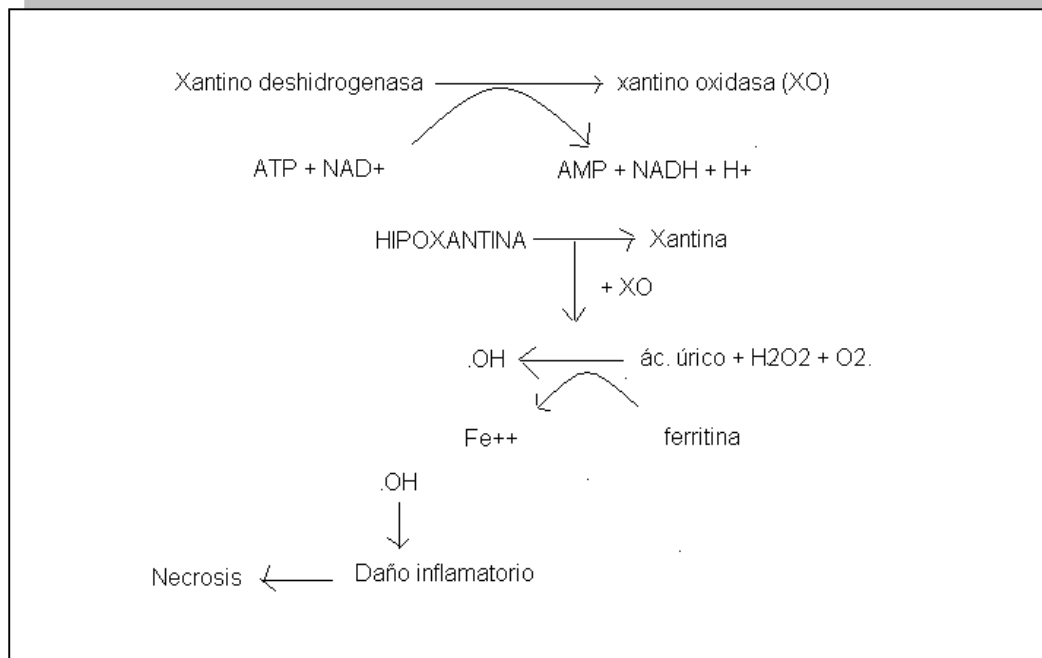


Figura 18. La acumulación de hipoxantina y xantina o de bajo contenido energético, puede desembocar en la producción de ERO. La producción de xantina a partir de hipoxantina (en presencia de XO), genera H₂O₂ y O₂^{•-}, los cuales a su vez, generan •OH que en presencia de Fe⁺⁺ puede provocar daño inflamatorio y necrosis (Modificada de Ríos, 2003).

Existen estímulos externos como la luz UV, la radiación ionizante y la hipertermia que también inducen su producción, aunque estas fuentes generan cantidades mínimas. Cuando los niveles de ERO se controlan adecuadamente, éstos participan en procesos útiles para el organismo. Estos procesos incluyen la defensa frente a la infección, la detoxificación de xenobióticos, la reducción de ribonucleótidos, las acciones de hidrolasas y dioxigenasas, la carboxilación del glutámico, la señalización celular por óxido nítrico y otras ERO, la transducción intracelular de señales a través del factor nuclear kappa-B y los productos génicos c-fos y c-jun, la modulación de segundos mensajeros como el GMP cíclico, las acciones de prostaglandinas y leucotrienos, la agregación plaquetaria, la coagulación sanguínea, el potencial de membrana (Barja, 1997).

1.9 Efectos lesivos de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Fue en 1954 cuando Gersman y col., describieron por primera vez que los efectos tóxicos del oxígeno se debían a la formación de ERO. En 1969 McCord y Fridovich propusieron que la formación de los ERO era una parte integral del metabolismo normal de la célula. Actualmente no existe duda de la participación de las ERO en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Las moléculas afectadas por las ERO son igualmente variadas aunque por su disponibilidad, localización y concentración destacan las estructuras fosfolípídicas, las proteínas y los ácidos nucleicos, cuya alteración incluso individual provocaría una distorsión global del metabolismo celular, ya que de la acción conjunta y sincronizada de las tres, resulta la función metabólica de la célula y su regulación.

Los fosfolípidos de las membranas celulares son esenciales para el mantenimiento de la viabilidad celular. Las proteínas son moléculas ejecutoras de una infinidad de funciones celulares. Los ácidos nucleicos son portadores de la información de todas estas funciones. Se entiende por lo tanto que de forma colectiva o individual una alteración de la función de cualquiera de estas estructuras sea suficiente para inducir trastornos importantes en la viabilidad y función de los sistemas biológicos.

1.9.1 Peroxidación lipídica

Todo proceso de peroxidación de macromoléculas ocurre en tres etapas bien definidas: iniciación, propagación y terminación. En el caso de la peroxidación lipídica la iniciación consiste en la extracción de un electrón de un carbono contiguo a un doble enlace por parte de un iniciador como el $\bullet\text{OH}$. Los ácidos grasos poliinsaturados son los más sensibles al ataque por ERO debido a que tienen dobles enlaces. Se forma así un radical alquil ($\text{L}\bullet$) que se convierte en peroxil ($\text{LOO}\bullet$) por adición de oxígeno y que en varias reacciones, como su reducción a hidroperóxido (LOOH), puede dar lugar a la propagación de peroxidación al generar otro radical alquil en el ácido graso contiguo en la membrana (Figura 19). La propagación explica el carácter de reacción en cadena

de la peroxidación lipídica, mediante la cual una sola iniciación puede dañar un gran número de moléculas. La reacción se termina por la reacción de radicales (por ejemplo de tipo alquil) contiguos, dando lugar a puentes cruzados (L-L), o mediante la fragmentación del ácido graso en gran número de productos como el malondialdehído, el 4-hidroxinonenal o alcanos que aparecen en el aire espirado (Porter, 1995; Barja y col., 1997).

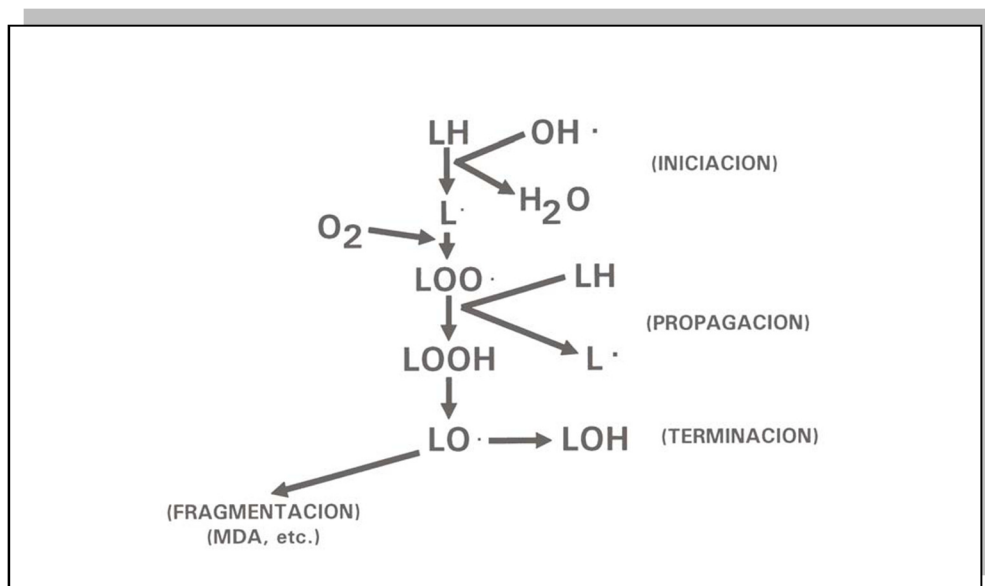


Figura 19. Reacciones principales de la peroxidación lipídica. LH: Lípido intacto; L·: alquil; LOO·: peroxil; LOOH: hidroperóxido lipídico; LO·: radical alcoxil; LOH: hidróxido lipídico (Modificada de Barja y col., 1997).

Un proceso descontrolado de peroxidación lipídica es capaz de ocasionar cambios en la composición química y deterioro en la organización ultraestructural de las membranas celulares (Figura 16), lo que se puede traducir en disminución de fluidez, cambios de permeabilidad e inactivación de receptores y enzimas unidas a las mismas. El estrés oxidante también puede causar daños en la estructura de las enzimas, a través de la oxidación de grupos sulfídricos (-SH) de los centros activos de las mismas, por modificación de la estructura de los aminoácidos o mediante la formación de bases de Schiff (Figura 20).

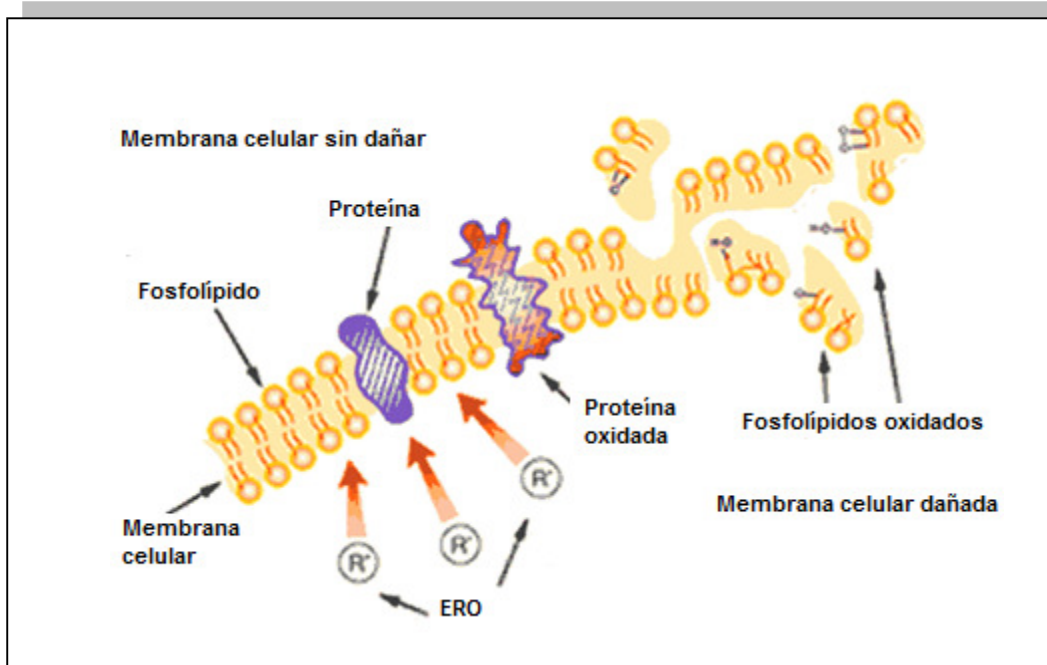


Figura 20. La peroxidación lipídica ocasiona cambios estructurales y funcionales en las membranas celulares.

1.9.2 Daño a proteínas

Las ERO pueden actuar sobre las proteínas de diferentes formas (Smith y col., 1991):

a) Oxidando los aminoácidos aromáticos (triptófano y tirosina), o bien actuar a nivel de los enlaces insaturados, y en los grupos tiol (-SH) de las cisteínas. Así como produciendo cambios en otros aminoácidos tales como la prolina, arginina, lisina, fenilalanina, histidina y metionina (dando lugar a aldehídos). Muchos estudios han concluido que el H_2O_2 y las formas reducidas de hierro y el cobre, generados por oxidasas de función mixta, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo ERO que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. Este proceso se considera específico del sitio de unión al metal. En muchas enzimas este sitio puede ser el centro activo. Entre los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo en las proteínas se encuentra la histidina, la prolina, la arginina, la lisina y la cisteína. Como consecuencia se forman grupos carbonilo, o se producen

conversiones de unos aminoácidos a otros, como ocurre con la transformación de histidina en asparagina.

b) Fragmentando proteínas mediante el radical hidroxilo, hipoclorito y peróxido en presencia de metales.

c) Formando entrecruzamientos y agregación de proteínas producidos por la formación de puentes disulfuro intramoleculares.

1.9.3 Daño oxidativo al ADN

Los mecanismos inductores de oxidaciones en el ADN y el ARN son múltiples. La modificación oxidante de estos polímeros es consecuencia de la interacción con las ERO. Entre ellas destaca el $\bullet\text{OH}$ y su forma protonada el hidroperoxilo (Sies, 1986; Ames, 1989; Venereo, 2002).

Estas alteraciones van desde modificaciones oxidativas conducentes a mutaciones puntuales y delección de fragmentos polinucleotídicos, hasta ruptura de cadenas y/o trastornos estructurales incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida total o parcial de determinados cromosomas (Simic, 1994).

Distintos hidropéroxidos se forman como consecuencia de la radiación ionizante sobre los sistemas biológicos así como de otros agentes oxidantes de origen endógeno. Este último mecanismo suele ser mucho más frecuente y continuo dentro del ambiente aeróbico celular. El H_2O_2 endógenamente formado reacciona con los metales de transición ligados al ADN (hierro o cobre) de una forma similar a como ocurre en la reacción de Fenton (Figura 21).

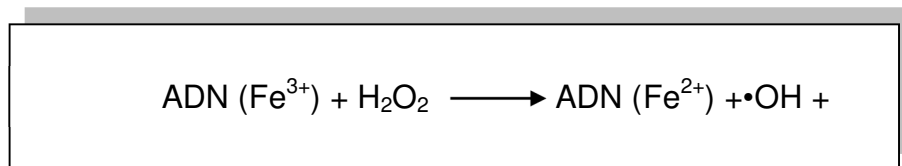


Figura 21. El H_2O_2 endógeno reacciona con el Fe o CU, generándose $\bullet\text{OH}$ y OH^-

Una diferencia importante con respecto a la reacción de Fenton es la proximidad de los $\bullet\text{OH}$ formados en la cadena de ADN y por lo tanto las consecuencias inmediatas que de esta característica se derivan.

La reactividad de las cinco bases nucleotídicas con el $\bullet\text{OH}$ es extremadamente alta, mientras que para la desoxirribosa esta reactividad es cinco veces menor. La distribución del ataque oxidante estará influida y dependerá de la abundancia relativa de los componentes del ADN.

De igual forma el $\bullet\text{OH}$ interacciona con la guanina para dar lugar a la 8-OH-2'-desoxi (oxo) Guanina (8-OH-oxo-G) (Oliva y col., 1997).

La especie hidroxidada generada de forma más abundante a partir de la timina es la cis-5(6)hidroxi-6(5)hidroperóxido-5,6-dihidrotimina. Aunque relativamente estable, este hidroperóxido se descompone gradualmente a otro derivado más estable, el cis-vicinal-dihidrodiol, comúnmente conocida como cis-timina glicol (TG) y su 2'-desoxinucleósido cis-timidina glicol (dTG). Este tipo de oxidaciones provoca alteraciones significativas en la conformación de TG y consecuentemente cambios en la estructura planar de la timina (Figura 22).

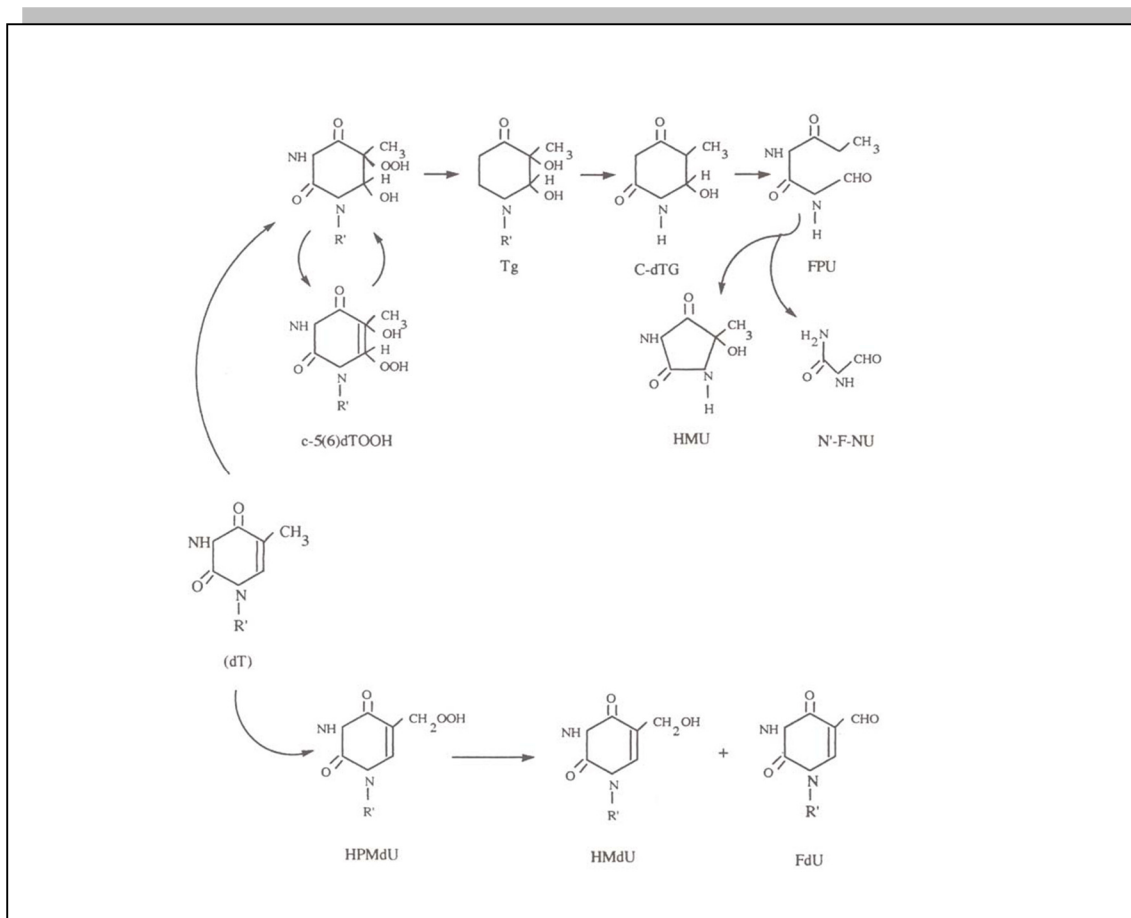


Figura 22. Estructura de algunos productos de oxidación de la Timina por

radiación. R': desoxirribosa C-5(6)dTOOH: cis-5(6)-hidroxi-5(6)-hidroxiperoxi-5,6-dihidrotimidina, Tg: Timidina glicol, C-dTg: cis-timidina glicol. FPU: N'-formil-N-piruvilurea, HMU:5-hidroxi-5-metil-hidantoina. N'-F-NU: N'-formil-N-urea, HPMdU: 5-hidroxiperoxi-5-metil-2'-desoxiuridina, HmdU: 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina, FdU: 5-formil-2'-desoxiuridina (Modificada de Oliva y col., 1997).

Además de la oxidación de la timina, hay otras bases susceptibles de oxidación por radiaciones ionizantes. La oxidación de la citosina da lugar a la formación de una serie de compuestos análogos a la timina. Su oxidación en posición cinco produce 5-OH-Citosina 20. Las bases púricas se pueden oxidar en distintos lugares, aunque las producidas en el carbono C-8 han sido las más estudiadas. Este es el caso de la 8-oxo-desoxiguanosina (8-OHdG) (Figura 23).

La oxidación de las bases nucleotídicas del ADN genera diversos productos, como la timidina glicol (5,6-dihiroxitimina) (TG), timidina glicol (5,6-dihidroxitimidina (dTG), 5-hidroximetil uracilo (HMU), 5-hidroxi-2'-desoxiuridina (HMdU), 8-hidroxi(oxo)guanina (8OHG) y 8-hidroxi(oxo)desoxiguanosina (8-OHdG) (Figura 24).

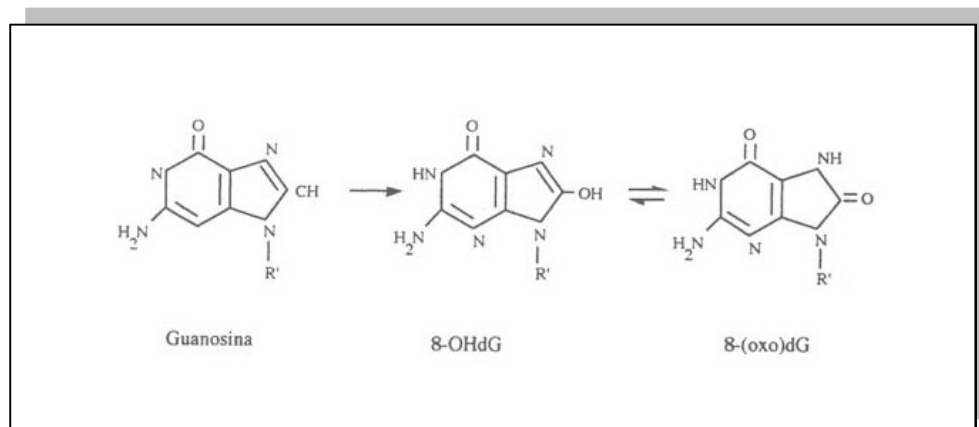


Figura 23. Productos de la oxidación de la Guanosina, generados por distintos mecanismos de estrés oxidativo. R': desoxirribosa, 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, 8-(oxo)dG: 8-oxo-2'-desoxiguanosina (Modificada de Oliva y col., 1997).

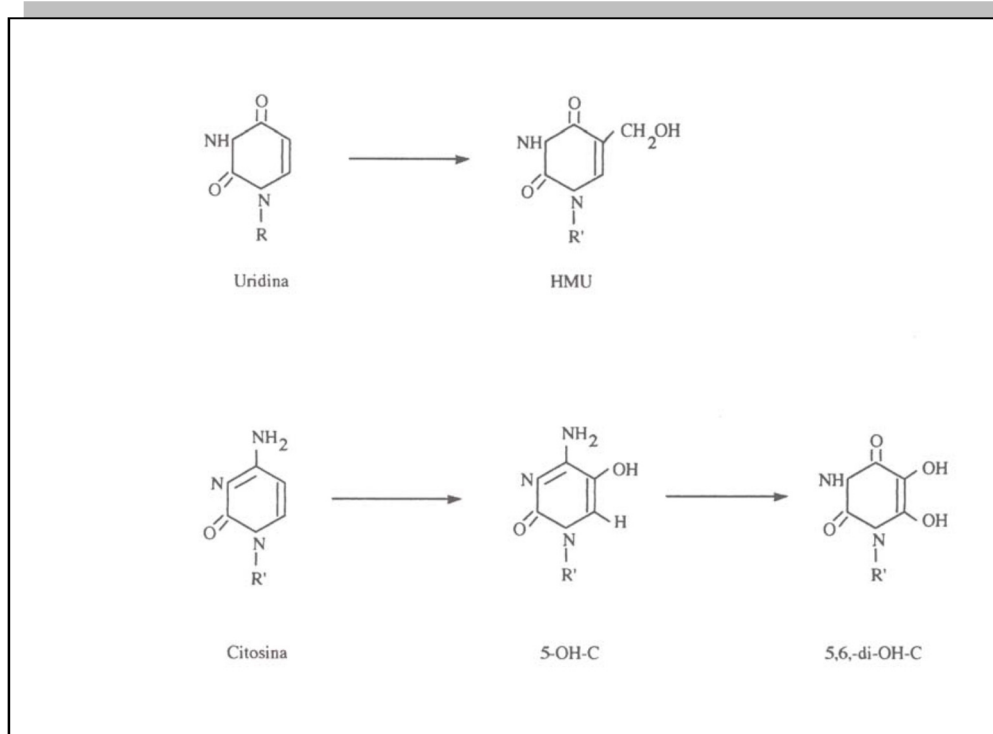


Figura 24. Oxidación de Uridina y Citosina. HMU: 5-hidroxi-metil-uridina, 5-OH-C: 5-hidroxicitosina, 5,6 -di-OH-C: 5,6-dihidroxi-citosina, R: ribosa, R': desoxirribosa (Modificada de Oliva y col., 1997).

En el caso del ADN nuclear se cree que el hierro juega un papel importante en el daño oxidante. Si una molécula de H₂O₂ llegara al núcleo, podría reaccionar con el hierro ferroso, generando el •OH que atacaría en ese mismo lugar al azúcar o a la base produciendo roturas en la hebra y modificaciones en las bases. Estas lesiones pueden dar lugar a mutaciones y a fenómenos carcinogénicos. Se ha sugerido el cobre también puede cumplir un papel similar al del hierro en la mediación del daño oxidante al ADN nuclear (Tuma, 2001).

El daño oxidante al ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear (Richter y col., 1988). Esto se debe a la cercanía del ADN al lugar principal de generación de ERO en la célula (la cadena respiratoria), además el ADN mitocondrial carece de histonas y poliaminas que puedan protegerlo y su capacidad de reparación es mínima en relación con la del ADN nuclear. Como consecuencia las deleciones y mutaciones del ADN mitocondrial son mayores que

en el ADN nuclear (Ozawa, 1995).

Las ERO se han visto involucradas en la mutagenicidad en bacterias, así como de células de mamífero al mismo tiempo que inducen alteraciones genéticas (Simic, 1994).

Diversos estudios experimentales han tratado de dilucidar el mecanismo de acción implicado en la transformación celular maligna inducida por ERO, si bien la oxidación del ADN nuclear parece ser el evento esencial del mismo. Diversos investigadores han demostrado que la oxidación de la guanina a 8-OHdG induce errores en la replicación del ADN por parte de la polimerasa ADN-dependiente.

Cambios conformacionales inducidos por la base oxidada parecen ser los responsables del apareamiento de bases no complementarias. El cambio conformacional se establece, sobre todo, por parte de 8-oxodG cuya disposición planar permite el establecimiento de puentes de hidrógeno con adeninas y timinas en lugar de citosinas. Esta base oxidada es además en términos cuantitativos, la lesión oxidativa más frecuentemente encontrada en el ADN bajo condiciones fisiológicas y es uno de los parámetros más representativos del estrés oxidante *in vivo* (Oliva, 1997).

Numerosos experimentos han puesto de manifiesto que la ADN polimerasa incorpora selectivamente citosinas (C) y adeninas (A) opuestas a una 8-oxo-guanina. El resultado de este cambio será por lo tanto una transición mutacional G-C a A-T, la cual posiblemente sea la más frecuente en términos oxidantes. Estas alteraciones que persisten a pesar de los mecanismos de reparación se producen tanto de forma espontánea como por agentes oxidantes.

El resto de las bases nucleotídicas también son susceptibles de oxidación si bien su potencial mutagénico se conoce menos. El papel de las bases nucleotídicas oxidadas en la carcinogénesis se ve consolidado por el hecho de que diversos agentes con especificidad oncogénica tisular inducen la oxidación del ADN en aquellos tejidos donde tiene lugar el desarrollo tumoral y no en otros (Floyd, 1990, Venereo, 2002). En la figura 25 se observa un esquema general de la generación de ERO y su efecto deletéreo al interaccionar con biomoléculas clave en la fisiología celular.

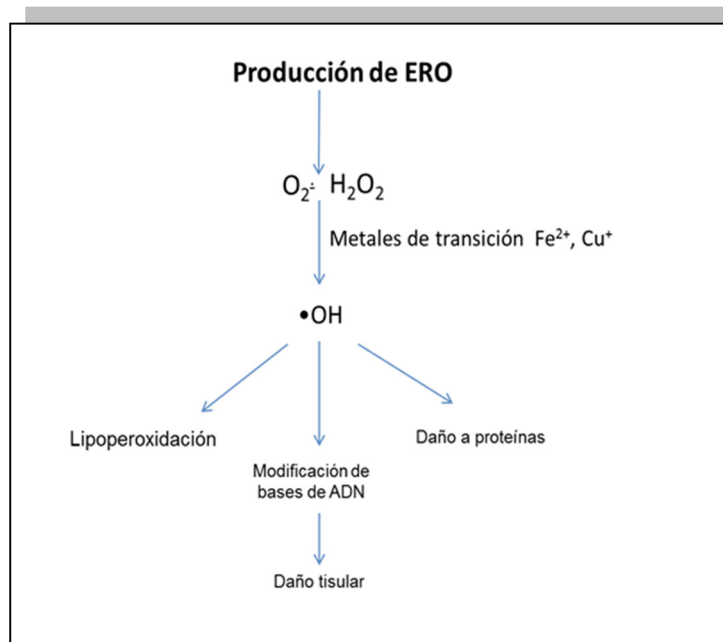


Figura 25. Principales fuentes generadoras de ERO en el organismo y sus consecuencias del daño producido por las mismas (Modificada de Young y col., 2001).

1.10 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa contra los diversos radicales libres de oxígeno, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados (Ríos, 2003). Halliwell (2006) define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical débil no tóxico y que en algunos casos, como las vitaminas, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos, que a su vez reaccionan con los radicales libres. En el Cuadro 2 se muestra un esquema general de la defensa antioxidante de los organismos.

Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse en:

a) **Sistemas de defensa enzimáticos:** Se trata de un mecanismo intracelular en el que las enzimas SOD, CAT y GPx eliminan las ERO una vez formadas.

b) **Captadores de radicales libres o “scavengers” (sistema de defensa no enzimático):** Retrasan considerablemente las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a los radicales libres transformándolos en otras sustancias menos agresivas. Pueden ser hidrosolubles o citosólicos (glutati6n y 1cido asc6rbico) o liposolubles (vitaminas A y E) (Bast y col., 1991; Mart6nez y col., 2006).

c) **Quelantes de metales de transici6n:** Son mol6culas que captan el hierro (ferritina y transferrina) y el cobre (ceruloplasmina) impidiendo que estos metales act6en como catalizadores de las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Cascales, 2005; Souki y col., 2007).

Cuadro 2. Se muestra una de las clasificaciones del sistema antioxidante con el que cuentan los organismos aerobios.

Defensa antioxidante		
	SOD	
	GPx	
1. Antioxidantes enzim1ticos	CAT	
	GR	
	ALDH	
	<i>Hidr6filos</i>	<i>Hidr6fobos</i>
2. Captadores de radicales libres	Vitamina C	Carotenoides
	Glutati6n	Vitamina E
		Flavonoides
3. Quelantes de metales de transici6n	Prote6na	l6n Metal
	Transferrina	Fe
	Ferritina	Cu
	Ceruloplasmina	

Esta clasificaci6n establece que existen antioxidantes de tipo enzim1tico, captadores de radicales libres y quelantes de metales de transici6n.

1.10.1 Superóxido Dismutasas (SOD)

Las SOD son enzimas que dismutan o eliminan al $O_2^{\cdot-}$. Durante su mecanismo de acción emplean dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$, una de ellas se oxida hasta O_2 molecular, mientras que la otra se reduce a H_2O_2 , por tanto, más que eliminar formas activas del oxígeno, esta enzima transforma una en otra (Tatli y col., 2000). En animales superiores existen tres formas moleculares de SOD, las cuales difieren en el tipo de metal que se encuentra en su sitio activo y en su localización subcelular (Tuma, 2001).

Las SOD1 y SOD3 tienen un centro Cu-Zn (el átomo de Cu es el que realiza directamente la dismutación) (Figura 26).

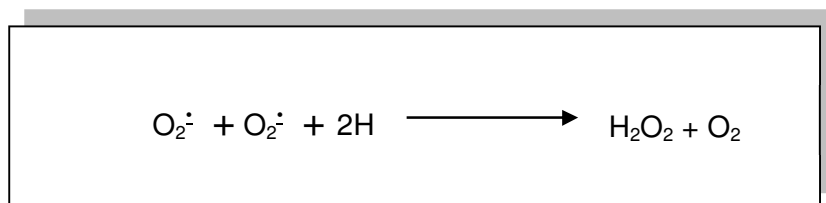


Figura 26. Acción enzimática de SOD. Se transforman 2 moléculas de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y en O_2 .

La SOD1 o Cu/ZnSOD se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas, y en el espacio intermembranal de la mitocondria. La enzima es un homodímero de 32 KDa con un Cu y un Zn por cada subunidad de 153 aminoácidos. Sólo el cobre tiene importancia catalítica, mientras que el zinc confiere estabilidad a la estructura proteica; sin embargo, ambos metales están conectados por el imidazolato que provee la histidina 63.

Por otro lado, SOD2 o MnSOD se encuentra principalmente en la matriz mitocondrial. Aunque se localiza dentro de este organelo, la SOD2 está codificada en el núcleo, por lo que su expresión está regulada, en gran parte, en el estado redox de la mitocondria. Esta enzima es un homotetrámero con un peso de 22 KDa por subunidad, y posee un Mn^{+3} por monómero.

La SOD3 o EC-SOD es la única proteína extracelular que puede eliminar el $O_2^{\cdot -}$. Se sabe que es una proteína tetramérica de casi 135 KDa y 222 aminoácidos que contiene un átomo de cobre y uno de zinc por subunidad.

La SOD3 está presente en la matriz extracelular, principalmente unida a la heparina y a las fibras de colágena tipo I de la mayor parte de los tejidos. La SOD3 posee 60% de homología con la SOD1, y tiene muy poca homología con SOD2.

La reacción catalítica de las SOD se divide en dos pasos:

1. El $O_2^{\cdot -}$ llega al centro de reacción y se une por una interacción electrostática a la arginina 143. El $O_2^{\cdot -}$ requiere donar su electrón desapareado para poder ser convertido en oxígeno molecular, ya que es ese electrón el que le confiere su naturaleza reactiva y tóxica. El electrón es transferido al Cu^{2+} , que transforma al metal a Cu^+ . Esta transferencia electrónica genera que el enlace entre el Cu^+ y la histidina 63 se rompa, lo que provoca que el nitrógeno de la histidina 63 se protone. El O_2 formado se disocia de la arginina y se libera (Figura 27a).

2. El $O_2^{\cdot -}$ llega al centro catalítico y se une por interacción electrostática con la arginina 143, aunado a esto, se genera en la proximidad del centro catalítico, la protonación de una molécula de agua (H_3O^+). El electrón que recibió el Cu en la primera parte de la reacción, es ahora transferido al segundo $O_2^{\cdot -}$, permitiendo la oxidación del metal a Cu^{2+} . Los dos electrones que posee en este momento el superóxido pueden formar inmediatamente dos enlaces covalentes con dos protones, los cuales son donados, uno por la molécula de agua protonada, y el otro por el nitrógeno de la histidina 63, lo que favorece que se restablezca el enlace que originalmente formaba con el Cu^{2+} . Esto permite la liberación del H_2O_2 y la regeneración de la enzima, que participará en otro ciclo catalítico (Gómez y col., 2008) (Figura 27 b).

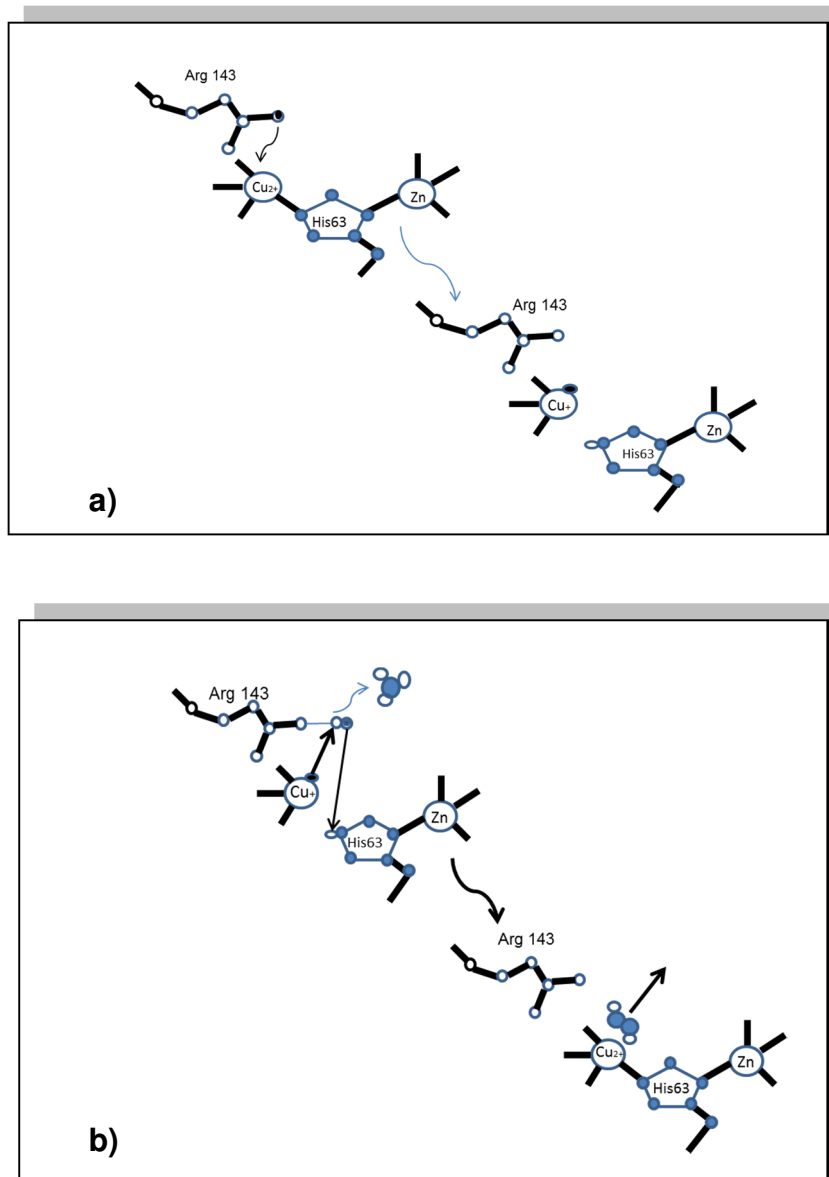


Figura 27. a) Primera parte del mecanismo catalítico de SOD1: Se elimina el primer $O_2^{\cdot -}$ y se reduce el cobre. b) Segunda parte del mecanismo catalítico de SOD1: El segundo $O_2^{\cdot -}$ se transforma en H_2O_2 y se regenera el centro catalítico (Modificada de Gómez y col., en Radicales libres y estrés oxidativo, 2008).

1.10.2 Catalasa (CAT)

Estas enzimas catalizan dos tipos de reacciones. En la reacción catalítica se produce la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 . Una molécula se oxida a oxígeno y la otra se reduce para formar dos moléculas de agua (Figura 24). En la

reacción peroxidativa se utiliza un sustrato inespecífico como reductor para transformar una sola molécula de H₂O₂ en dos de agua, en este caso la enzima actúa como una peroxidasa (Gunduz y col., 2004). Es una de las enzimas más activas que se conocen, exhibiendo una actividad molecular de 5,600,000 moléculas de H₂O₂ por minuto por molécula de enzima. Abunda en los peroxisomas en animales como la rata, pero en otras especies como el cobayo hay datos que apoyan su presencia en citosol. Su peso molecular es de 240 kDa y es una homoenzima tetramérica en la que el átomo de hierro realiza el intercambio redox (Barja, 1997) (Figura 28).

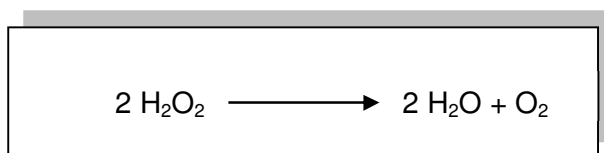


Figura 28. Reacción catalítica mediada por CAT. El H₂O₂ es transformado en H₂O y O₂.

1.10.3 Glutación peroxidasa (GPx)

La GPx elimina hidroperóxidos utilizando GSH (glutación reducido) como reductor. Es de localización citosólica y mitocondrial. Existen varias formas: la tipo I dependiente de selenio, que elimina tanto los peróxidos de hidrógeno como los hidroperóxidos lipídicos precursores de las prostaglandinas, reduciéndolos a ácidos grasos hidroxilados, y la tipo II que es independiente de selenio y sólo elimina a los hidroperóxidos lipídicos (Weitzel y col., 1990), entre otras.

La GPx tipo I es tetramérica y tiene entre 76 y 105 KDa. Elimina tanto hidroperóxidos orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H₂O₂). La GPx tipo II tiene un peso molecular menor, es dimérica y sólo es capaz de eliminar ROOH (Ríos, 2003) (Figura 29).



Figura 29. La GPx dependiente de Se elimina hidroperóxidos en presencia de GSH, generándose GSSG, agua y compuestos estables.

La forma de selenio con más relevancia biológica es el aminoácido selenocisteína, que es un análogo de la cisteína, pero en lugar del grupo tiol, que contiene azufre, la selenocisteína posee al grupo selenol, que contiene selenio. Este grupo catalítico se encuentra en el sitio activo, y participa en la catálisis redox. La GPx es una enzima que requiere GSH para reducir el H_2O_2 a agua. El GSH es un donador de equivalentes reductores en dicha reacción; de esta manera, la reducción del H_2O_2 a agua y la oxidación del GSH a GSSG ocurren simultáneamente.

Existen cuatro isoenzimas principales en tejidos de mamíferos, todas son dependientes de selenio:

1. GPx clásica o citosólica (GPx-1 o cGPx): Se expresa en todas las células, las concentraciones de esta enzima son altas en hígado, riñón, pulmón y eritrocitos sometidos a estrés oxidante por largo tiempo.

2. GPx gastrointestinal (GPx-2 o GPx-G1): Su expresión parece estar restringida al epitelio del tracto intestinal en las ratas, pero en los humanos también se ha encontrado en el hígado. Esta distribución en los humanos ha permitido sugerir la hipótesis de que la GPx-2 representa el primer punto de defensa contra los hidroperóxidos lipídicos producidos de la ingesta de lípidos en la dieta.

3. GPx plasmática (GPx-3 o pGPx): Su concentración más significativa es en el riñón, en donde es producida por las células epiteliales del túbulo proximal y por las células parietales de la cápsula de Bowman para ser liberada a la circulación sanguínea, en donde su concentración es de 30 μM . Esta concentración no es suficiente para mantener la actividad de GPx plasmática, por lo que no se han comprendido por completo la función de esta enzima.

4. GPx de fosfolípidos (GPx-4 o PHGPx): Se ha encontrado que presenta una actividad elevada en testículos de rata y parece que juega un papel importante en la regulación de los procesos de oxidorreducción, maduración sexual y diferenciación.

Las primeras dos GPx son específicas a sustratos similares, y reducen rápidamente al H_2O_2 o a los ácidos grasos a hidroperóxidos. La GPx-3 posee una

débil actividad para reducir hidropéroxidos de colesterol, mientras que la GPx-4 reduce eficazmente los hidropéroxidos de fosfolípidos, pero de manera ineficaz al H₂O₂ (Cárdenas-Rodríguez y col., 2008).

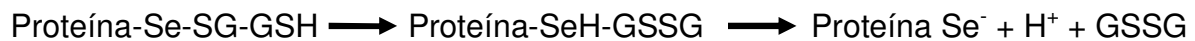
Por otro lado, la capacidad reductora de las isoenzimas GPx se basa en altas concentraciones de GSH. Durante el mecanismo catalítico de las GPx, un selenol (proteína Se⁻) reacciona con un peróxido para dar ácido selénico (proteína SeOH):



Entonces, el primer GSH es enlazado:



Ahora, el segundo GSH es enlazado:



La relación entre el GSH y el GSSG en las células normales por lo general favorece a la primera especie, ya que existe un mecanismo para regenerar al GSH. La molécula de GSSG que se forma durante la reacción enseguida es reducida por la glutatión reductasa, de acuerdo a la siguiente reacción:



El NADPH utilizado por la glutatión reductasa es proporcionado por diversos sistemas enzimáticos, aunque el mejor conocido es la vía de las pentosas fosfato en su fase oxidante (Cárdenas-Rodríguez y col., 2008).

1.10.4 Glutación reductasa (GR)

Las GR regeneran a una molécula de GSSG en dos de GSH a expensas de equivalentes de reducción en forma de NADPH. Dado que la poza de GSH celular es limitada y la elevación de la tasa GSSG/GSH es altamente tóxica para la célula, esta enzima es de vital importancia para el funcionamiento de la eliminación de H_2O_2 por la vía de la GPx, así como para la reconstitución del GSH oxidado no enzimáticamente. Las GR presentan un FAD unido a la enzima, que es esencial al actuar como coenzima. Están presentes en el citosol y en las mitocondrias. Puesto que la GR precisa a su vez de NADPH como fuente de equivalentes de reducción, las enzimas de la vía de las pentosas glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y 6-fosfluconato deshidrogenasa (productoras citosólicas de NADPH) constituyen una segunda línea de defensa antioxidante (Cisneros, 1995).

1.10.6 Glutación (GSH)

El glutación (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina que constituye el principal tiol no proteico celular.

Esta molécula se encuentra en organelos como la mitocondria y los peroxisomas, así como en la matriz nuclear (Wu y col., 2004).

Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiol de la cisteína. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzimáticas (como la de la GPx) o no enzimáticas. Al reaccionar con oxidantes, dos moléculas de GSH se oxidan a GSSG formando un puente disulfuro entre ellas (Lu, 2000). El GSH juega un papel fundamental en la protección celular contra el daño oxidante, reduce el peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por la GPx, participa en la detoxificación de electrófilos, mantiene los niveles esenciales de los tioles de las proteínas, participa en los procesos de captura de radicales libres, es reservorio de cisteína y modulador de procesos como la síntesis de ADN (Sarrasague y col., 2006) (Figura 30).

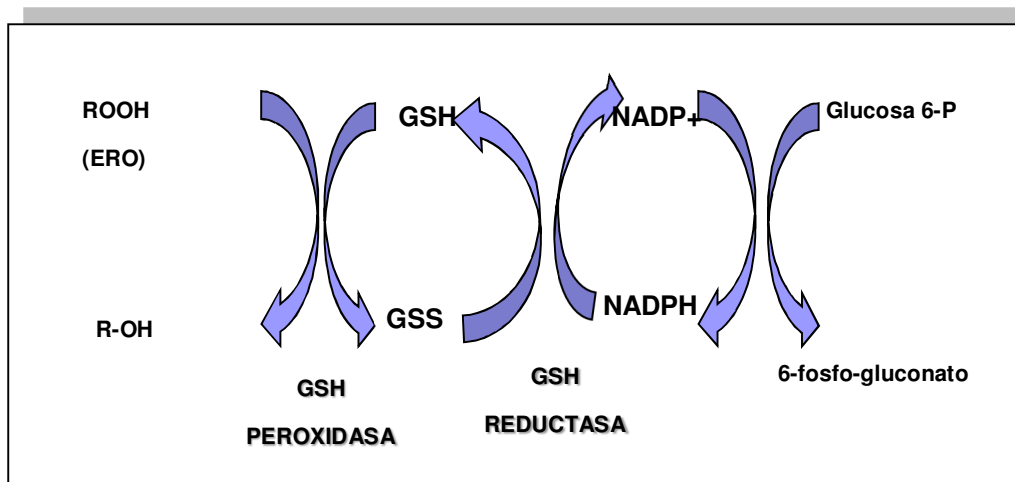


Figura 30. Ciclo redox del glutatión. La conversión enzimática y cíclica de GSH a GSSG y de éste a GSH, asegura que haya un balance entre la concentración de estas dos formas del glutatión.

Además de participar en la defensa antioxidante, el glutatión está involucrado en muchas otras funciones celulares, como el metabolismo y la regulación de algunos procesos (Wu y col., 2004) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Se muestran las diversas funciones del glutatión

Funciones del glutatión	
Defensa antioxidante	Regulación
Captura de ERO	Estado redox intracelular
Remoción de hidrógeno y peróxidos lipídicos	Transducción de señales y expresión de genes
Prevención de la oxidación de biomoléculas	Síntesis de ADN y proteínas
Metabolismo	Proteólisis
Síntesis de leucotrienos y prostaglandinas	Proliferación celular y apoptosis
Conversión de formaldehído a formato	Producción de citocinas y participación en la respuesta inmunitaria
Producción de D-lactato a partir de metilgloxal	Integridad y funcionalidad de mitocondrias
Formación de aductos de glutatión-ON	
Reserva y transporte de cisteína	

El glutatión es una molécula muy versátil, que se encuentra involucrada en una variedad de procesos celulares de gran importancia (Modificada de Wu y col, 2004).

Por otro lado, es importante mencionar que existen otros antioxidantes como la Vitamina C (ácido ascórbico) que es el principal antioxidante hidrosoluble, capaz de eliminar el H_2O_2 , el $O_2^{\cdot-}$, el $\cdot OH$ y el oxígeno singulete. Esta vitamina presenta una configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilo asociados al doble enlace funcionan como agentes de alto poder reductor, lo que le permite, incluso, participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas. La Vitamina E (alfa-Tocoferol), es un lípido isoprenoide sustituido, de la familia de los tocoferoles. Su forma biológicamente activa es el D-alfa-tocoferol. Su actividad es una de las primeras barreras de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Los fosfolípidos de las membranas mitocondrial, del retículo endoplásmico y plasmática, poseen afinidades para el alfa-tocoferol, por lo que está muy concentrado en estos sitios. Su solubilidad en la membrana le permite la accesibilidad directa a grupos peroxil (ROO) que serían reducidos a hidroperóxidos, los cuales serían entonces degradados hasta alcoholes (estables) por la GPx. Finalmente, los carotenoides son los antioxidantes principales de las membranas biológicas. Éstos, dan lugar a reacciones de extinción como la del oxígeno singulete a triplete y también pueden interaccionar con radicales libres a presiones parciales bajas de oxígeno (Benítez, 2006; Cimen, 2008)

1.11 ESTRÉS OXIDANTE

La mayor parte de las ERO son eliminados mediante antioxidantes. De hecho, el mantenimiento de la homeostasis redox del tejido sólo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y la intensidad de eliminación de ERO.

El estrés oxidante es un estado en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de ERO y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular (Molina, 2003). Bajo condiciones de estrés oxidante el balance de oxidantes-antioxidantes se pierde y las ERO atacan lípidos, carbohidratos y

enzimas. Está bien establecido que cualquier alteración en el balance oxidantes-antioxidantes puede causar patologías como kwashiorkor, diabetes mellitus, enfermedades infecciosas y cáncer (Tatli, 2000; Wu, 2003; Agudelo y col., 2006).

1.12 METABOLISMO DE ERO EN ERITROCITOS HUMANOS

La principal función del eritrocito es el transporte de oxígeno y su mediación en la producción del bióxido de carbono. Cuando el eritrocito sale de la médula ósea, pierde el núcleo, los ribosomas, las mitocondrias, así como la capacidad de replicación y de síntesis de proteínas. Ante la ausencia de mitocondrias, el eritrocito no se encuentra expuesto a las reacciones de óxido-reducción que se llevan a cabo en este organelo.

La membrana del eritrocito consiste de una bicapa lipídica compuesta de proteínas (50%), lípidos (40%) y carbohidratos (10%). La hemoglobina (Hb) constituye el 95% de las proteínas citoplasmáticas y el hierro contenido en los grupos hemo debe estar en su forma reducida con el fin de que el intercambio gaseoso se lleve a cabo (Cimen, 2008).

Las proteínas asociadas al citoesqueleto incluyen a la espectrina, ankirina, la banda 3 (proteína de intercambio aniónico), glicoforina C y la proteína banda 4.1, que tiene un papel importante en el control de la forma bicóncava del eritrocito, en la unión a otras células y sustratos, así como en la organización de las regiones especializadas de la membrana. Todos los lípidos del eritrocito maduro se encuentran en la membrana y consisten de fosfolípidos y colesterol en una relación 1.2:1 (Cimen, 2008).

La glucosa es la única fuente de obtención de energía del eritrocito, y básicamente es metabolizada por glucólisis anaerobia. El metabolismo de la glucosa favorece que el GSH se mantenga en su forma reducida, lo cual favorece la protección de la membrana celular contra la oxidación.

Dado que los eritrocitos carecen de mitocondria, se piensa que las ERO producidas en este tipo celular provienen de la alta tensión de O₂ en la sangre arterial y al alto contenido de hierro contenido en los grupos hemo de la Hb (Cimen, 2008). De modo que la fuente generadora de ERO en el eritrocito es la

Hb, que experimenta autooxidación para producir $O_2^{\cdot-}$. Dado que la concentración intraeritrocítica de Hb oxigenada es 5mM, incluso una tasa de autooxidación muy baja, puede generar niveles altos de ERO. La reducción de O_2 a $O_2^{\cdot-}$ está acompañada por la oxidación de la Hb a metHb, que es una forma de proteína que no une ni transporta O_2 . Aunque el estrés oxidante puede dañar al eritrocito por sí mismo, se propone que grandes cantidades de ERO acumuladas en el eritrocito, podrían tener un efecto dañino en otros componentes de la circulación, por lo que es de especial interés determinar el alcance del reto oxidante y el balance de ERO en el eritrocito (Johnson y col., 2005).

Los organismos de respiración aerobia han adquirido la capacidad de mantener un flujo continuo de O_2 a sus tejidos y al mismo tiempo, protegerse de la toxicidad inherente de este elemento. Esto puede ocurrir por dos mecanismos: por proteínas acarreadoras de O_2 y por sistemas de defensa antioxidante (Scott y col., 1989).

Los ácidos grasos poliinsaturados dentro de la membrana, así como un ambiente rico en oxígeno y el alto contenido de hierro en la Hb, hacen que el eritrocito sea muy susceptible a peroxidación. Las ERO pueden iniciar las reacciones de lipoperoxidación que pueden derivar en la pérdida de la integridad de la membrana y en la muerte celular (Baynes, 2005).

Diversos reportes *in vitro* han documentado que la exposición del eritrocito a oxidantes, incrementa la inestabilidad de la membrana eritrocitaria debido a que la proteína 4.1 se ve dañada. Este daño provoca que la proteína 4.1 forme un complejo disfuncional espectrina-banda 4.1-actina. Las proteinasas unidas a la membrana funcionan como un mecanismo secundario de defensa antioxidante, y protegen al eritrocito degradando preferentemente a las proteínas que han sufrido daño oxidante (Dumaswla y col., 1999).

Aunque muchos componentes de la membrana del eritrocito pueden ser objeto de daño oxidante, la Ca-ATPasa puede ser de crucial importancia para la supervivencia del eritrocito ya que esta enzima contiene uno o más grupos sulfhidrilos que son susceptibles de oxidación, con la consecuente pérdida de funcionalidad de la enzima. Debido a que esta enzima es esencial para el

mantenimiento del gradiente entre el calcio intra y extracelular, la pérdida de su actividad, está asociada con una disminución en flexibilidad del eritrocito y su destrucción prematura (Durak y col., 2001).

Dentro del eritrocito, se han identificado al menos dos fuentes de generación de $O_2^{\cdot-}$. La primera cuando la oxiHb se autooxida y se produce metHb y O_2 . (Giulivi y col., 1990). La segunda, es cuando el estado de oxidación del hierro (Fe^{+3}), indica que durante su formación se ha perdido un electrón. Este electrón podría estar involucrado en la formación de $O_2^{\cdot-}$ (Hebbel y col., 1982).

Como ya se ha mencionado, la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ genera H_2O_2 . El H_2O_2 puede cruzar las membranas celulares con gran facilidad, mientras el $O_2^{\cdot-}$ puede atravesar las membranas sólo por vía de canales aniónicos transmembranales. El H_2O_2 no es especialmente tóxico en el ambiente intracelular, pero en el ambiente extracelular puede tener efectos dañinos, ya que en este ambiente, existen pocos mecanismos de defensa antioxidante (Al-Omar y col., 2004).

Los agentes generadores de $O_2^{\cdot-}$ pueden favorecer la formación de metHb por la generación de H_2O_2 . Así mismo, cuando la oxiHb experimenta autooxidación favorece la generación de $O_2^{\cdot-}$, que a su vez, favorece la generación de H_2O_2 .

Debido a la alta permeabilidad del H_2O_2 , la Hb esta en constante exposición a un flujo intra y extracelular de este metabolito. La exposición de la oxiHb al H_2O_2 puede generar modificaciones oxidativas, que podrían “funcionar” como señales específicas para favorecer la proteólisis en los eritrocitos (Giulivi y col., 2001).

A medida que la concentración de H_2O_2 aumenta, se incrementará también la concentración de metHb, la tasa de lipoperoxidación y la formación de complejos espectrina-hemoglobina. Synder y col. (1985) demostraron que el H_2O_2 induce la unión covalente de la espectrina y la Hb, y que esto provoca alteraciones en la forma celular, en la deformabilidad de la membrana, en la organización de los fosfolípidos y en las características de la superficie celular.

El H_2O_2 puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ y con iones de hierro o de cobre para producir $\cdot OH$, que es la más reactiva de las ERO. Por otro lado el $\cdot OH$ es producido predominantemente a partir del H_2O_2 por medio de la reacción de Haber-Weiss (Al-Omar y col., 2004).

Existe evidencia de que el NO• es un componente clave en el ciclo respiratorio de los eritrocitos, ya que es un gas que junto con el O₂ y el CO₂, es transportado por los eritrocitos (Han y col., 2003). Algunos estudios han demostrado la importancia de la Hb en el control del tono vascular mediado por NO• (Telen y col., 1999). En la circulación, los eritrocitos son los principales acarreadores de NO•, debido a su alta concentración de Hb (Han y col., 2003). El NO• es secuestrado dentro de los eritrocitos a través de reacciones con el grupo hemo y con los residuos de cisteína en la cadena α de la Hb. Se piensa que la Hb con el grupo Fe²⁺ unido a O₂ convierte el NO• a nitrato, mientras que la Hb con el Fe²⁺ se une al NO• para formar Hg-Fe²⁺-NO• (Han y col., 2003).

La pérdida de O₂ en los tejidos periféricos, resulta en la transición de la Hb al estado T y en la subsecuente liberación del NO•, el cual puede ser transferido directamente al endotelio y de ahí ser exportado por los eritrocitos. Así, el gradiente de O₂ en las arteriolas favorece la liberación de O₂ (Telen y col., 1999).

En un eritrocito humano, aproximadamente 3% del total de la Hb es ciclada a metHb cada día, principalmente a través de la reacción de la Hb con el O₂. *In vivo*, la metHb es reducida por el sistema NADH-citocromo-β-5-metahemoglobina reductasa (Kennet y col., 2005).

La deficiencia de Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa es la más común de las deficiencias enzimáticas en humanos. Esta condición genera una elevada susceptibilidad a los agentes generadores de H₂O₂ y está relacionada con la ausencia de NADPH y con la función alterada de GSH, GPx y CAT. La disminución en la actividad de GPx en los eritrocitos, puede estar relacionada con una baja concentración de GSH (Scott y col., 1991; Gaetani y col., 1989).

1.12.1. Estado redox de Fe y estrés oxidante en eritrocitos

El hierro es el metal de transición más abundante, importante y esencial en las reacciones bioquímicas (Volpe y col., 1993). El hierro, no sólo une al oxígeno reversiblemente, también participa en un número importante de reacciones de óxido-reducción. Para unir al oxígeno, el hierro debe estar en su estado reducido, si este mecanismo falla, la Hb será una proteína no funcional (Telen y col., 1999).

Como resultado de este proceso, el hierro es liberado de la Hb (o sus derivados), y esta liberación va acompañada de la formación de la metHb. Si los eritrocitos no tienen suficiente cantidad de GSH, la liberación del hierro irá acompañada por lipoperoxidación y hemólisis (Comporti y col, 2002).

En una célula, los niveles de hierro, deben estar balanceados, ya que un desbalance puede generar daño celular por ERO. El cobre y el hierro presentes en el ambiente intracelular, pueden promover la formación de ERO por medio de la reacción de Fenton, la cual ocurre cuando un exceso de hierro reacciona con H_2O_2 para generar $\bullet OH$ (Durak y col., 2001; Church y col., 1985). Para mantener niveles apropiados de hierro en el ambiente intracelular, existe una batería de proteínas que regulan el almacenamiento y transporte del mismo (Dunn y col., 2007).

La liberación de hierro de estas moléculas de almacenamiento, representa la fuente generadora de estrés oxidante mediado por este catión. Por otro lado, debido a la abundancia de O_2 en el medio acuoso intracelular, se puede dar la autooxidación del ión ferroso, la cual podría ser una importante ruta de iniciación para reacciones de oxidación. Estas reacciones podrían resultar en la formación de complejos Fe-O, que son conocidos como iones ferrilo o perferrilo. Estas especies químicas son oxidantes fuertes y afectan a moléculas como la vitamina E, la vitamina C, el colesterol, las catecolaminas, lipoproteínas y a los lípidos de membranas (Giulivi y col., 2001). Debido a su alta afinidad electrónica, estos iones podrían tener un comportamiento similar al $\bullet OH$, provocando daño oxidante (Qian y col., 1999).

1.12.2 Antioxidantes en los eritrocitos

Los eritrocitos que están expuestos a un estrés oxidante severo, por tanto pueden sufrir reacciones aceleradas de lipoperoxidación y aberraciones celulares (Durak, 2001). Para evitar estos daños, los eritrocitos cuentan con un mecanismo antioxidante protector que está compuesto por vías enzimáticas y no enzimáticas (Masella y col., 2005).

Las enzimas que previenen el daño oxidativo en los eritrocitos son SOD, CAT, GPx, GR, y NADPH-metahemoglobina reductasa (Cimen, 2008).

En cuanto a la síntesis de GSH, está limitada por la disponibilidad de sus sustratos, especialmente la cisteína (Maella y col., 2005; Dumaswala y col., 2001) que se encuentra presente en los eritrocitos. El GSH no sólo provee defensa antioxidante, sino que también es un importante amortiguador de los grupos sulfidrilo, ya que mantiene a los grupos SH que forman parte de la Hb en un estado reducido (Cimen, 2008).

1.12.3 Propiedades antioxidantes de la hemoglobina

Los eritrocitos son los principales captadores de NO en la circulación, debido a que contienen altas concentraciones de Hb. La OxiHb convierte el NO a nitrato, mientras que HbFe⁺² se une al NO para formar HbFe⁺²NO. Por otro lado, oxiHb se autooxida a una tasa baja para formar metHb y O₂⁻, el cual dismuta a H₂O₂. Se sabe que una reacción prolongada de la Hb con H₂O₂, daña a la Hb *in vitro* e *in vivo* (Giulivi y col., 1990). Estos datos ponen de manifiesto lo importante que es que exista un balance entre antioxidantes y oxidantes en los eritrocitos.

1.12.4 Papel de ERO en la muerte de los eritrocitos

La muerte celular inducida por ERO es por vía de la necrosis. El daño ocasionado por ERO propicia la destrucción de la membrana y la pérdida de la homeostasis celular. Se ha observado un marcado decremento de GSH durante la apoptosis, lo cual puede indicar que un incremento en el estrés oxidante induce la muerte celular. También se ha observado que algunos antioxidantes como SOD y CAT pueden inhibir la apoptosis (Cimen, 2008).

Sin embargo Shimizu y col., (1996), han propuesto que en sistemas apoptóticos, las ERO intracelulares pueden estar aumentadas por el proceso apoptótico en sí, y que estas ERO no tienen un papel inductor de la apoptosis, de tal forma que el incremento de las ERO podría interpretarse como una respuesta secundaria. Este mecanismo puede ser llamado “eriptosis”. Se presume que cuando el eritrocito sufre estrés oxidante, se activan canales sensibles a Ca⁺² y a K⁺ en la membrana del eritrocito vía la generación de prostaglandinas, lo cual estimula la eriptosis (Lang y col., 2005).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La desnutrición es un padecimiento que se asocia con diversos factores, entre ellos la presencia de infecciones y el desbalance entre la concentración de ERO y la eficiencia de los mecanismos de defensa antioxidante. Lo anterior tiene efectos sobre la estabilidad genómica e inducen la ruptura de la cadena de ADN.

En trabajos previos se demostró que los niños con desnutrición moderada y grave con infecciones presentaban una alta frecuencia de RET-MN, siendo los niños tipo marasmo los más afectados. La formación de MN proporciona un panorama confiable sobre el grado de daño al ADN que un organismo presenta, y se ha reportado que una alta frecuencia de MN puede asociarse con la aparición de mutaciones, pérdida de información genética y cáncer.

De acuerdo con algunos investigadores, la formación de MN puede vincularse con el rompimiento de la cadena de ADN, la cual podría ser provocada por los efectos lesivos de las ERO.

Esta situación podría presentarse en niños con desnutrición, pues se sabe que en general, poseen una defensa antioxidante poco eficiente.

Tomando en consideración lo arriba expuesto, es de primordial importancia dilucidar los factores que favorecen la formación de MN en los niños con desnutrición, así como analizar el origen de estas estructuras, por ello, en este trabajo se plantea determinar si los MN son el resultado de una ruptura del ADN o de alteraciones en el huso mitótico. Puesto que el origen del daño al ADN pudiera ser el estrés oxidante, es interesante medir el daño oxidante, así como la eficiencia de la repuesta antioxidante en los niños desnutridos.

Como indicador de daño al ADN se considerará la frecuencia de MN, y como marcadores de estrés oxidante la lipoperoxidación, así como la actividad de las enzimas GPx y la SOD. Así se espera que los niños con desnutrición moderada y grave con infecciones presentaran mayor daño al ADN y que éste se relacionara con una respuesta antioxidante poco eficiente.

Este estudio es de especial importancia, ya que en la actualidad se han implementado terapias nutricionales en las que se incluyen micronutrientes como el selenio y el cobre. Estas terapias se han aplicado a niños desnutridos que

presentan una respuesta antioxidante deficiente y se ha reportado que después de la terapia, la respuesta antioxidante se restablece. De esta manera los resultados obtenidos en este trabajo podrían encaminarse a una aplicación clínica.

3. JUSTIFICACIÓN

Al ser la desnutrición un padecimiento que produce múltiples alteraciones en los organismos que la padecen, es importante hacer hincapié en que es necesario seguir generando datos que ayuden a dilucidar los efectos que tiene la desnutrición sobre el material genético, así como profundizar en el estudio de algunos factores involucrados en estos efectos, con el propósito de entender y analizar mejor este padecimiento.

Por otro lado, la medición del estrés oxidante y la capacidad antioxidante en niños en edad pediátrica, no ha sido bien establecida, ya que hasta el momento, no existe un método de medición ampliamente aceptado. Bajo estas circunstancias, es importante implementar estrategias que permitan medir eficientemente el estado redox de niños menores de cinco años.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la desnutrición moderada y grave y de las infecciones asociadas, en la generación y tipo de MN, así como su relación con la respuesta antioxidante en niños menores de cinco años.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la frecuencia y tipo de MN en RET y E de sangre periférica de niños BN, BNI, DESMI y DESGI.
2. Cuantificar la lipoperoxidación de la membrana de eritrocitos de sangre periférica de niños BN, BNI, DESMI y DESGI.
3. Cuantificar la respuesta antioxidante en niños BN, BNI, DESMI y DESGI, tomando como indicadores la actividad de la GPx y la actividad de la SOD.
4. Correlacionar la lipoperoxidación de la membrana de eritrocitos con la eficiencia de la respuesta antioxidante y con el daño al ADN, tomando como

indicador de este daño, la frecuencia de MN.

6. HIPÓTESIS

Si el grado y el tipo de desnutrición y las infecciones asociadas con ésta se relacionan con una respuesta antioxidante deficiente, entonces se observará un incremento en la frecuencia de MN, vinculado con los factores mencionados.

7. MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio contó con la aprobación del Comité de Ética y Bioseguridad del Hospital Pediátrico Iztapalapa, del Gobierno del Distrito Federal, así como del Centro de Salud Rural Disperso Agostadero, del Estado de México.

Se realizó un muestreo aleatorio simple para coleccionar muestras de sangre periférica de pacientes pediátricos con edades entre los 6 y los 60 meses. Se contó con el consentimiento informado de los padres de los niños que participaron en este estudio.

Para coleccionar las muestras, se utilizaron jeringas heparinizadas. Una vez tomadas las muestras, fueron almacenadas a 4 °C para ser transportadas en nevera portátil para muestras biológicas hasta el laboratorio, en donde fueron procesadas.

7.1 Pacientes

Las edades de los niños estuvieron comprendidas entre los 6 y los 60 meses. De acuerdo a los siguientes criterios se conformaron cuatro grupos de estudio tomando en consideración el estado nutricional de los niños y la presencia de infecciones.

→ Criterios de Inclusión:

Grupo BN: Niños bien nutridos sin infecciones, con peso y talla adecuados para la edad.

Grupo BNI: Niños bien nutridos con peso y talla adecuados para la edad, con infecciones gastrointestinales y respiratorias de tipo bacteriano.

Grupo DESMI: Niños con desnutrición moderada que presentaron déficit de

peso/talla mayor al 25% y menor al 40% para la edad y talla, así como infecciones gastrointestinales y/o respiratorias de tipo bacteriano.

Grupo DESGI: Niños con desnutrición grave, que presentaron déficit de peso/talla superior al 40% además de infecciones gastrointestinales y/o respiratorias de tipo bacteriano.

El grado de la desnutrición se evaluó de acuerdo a los signos clínicos y a los síntomas presentados, así como con la valoración del déficit peso/talla, según lo establecido en las tablas de peso/talla para niños mexicanos de Ramos- Galván (1976). Las infecciones bacterianas fueron diagnosticadas rigurosamente de acuerdo a los datos clínicos y a las pruebas de laboratorio de rutina.

→ **Criterios de exclusión:** Niños que presentaron infecciones virales, tuberculosis, enfermedades cardíacas o alergias.

→ **Criterios de no inclusión:** Las muestras que no presentaron integridad celular, que se encontraron hemolizadas o coaguladas al momento del estudio, no se analizaron.

Es importante recalcar que el número de niños incluidos en cada estudio, varía debido a que en ocasiones la cantidad de sangre obtenida no fue suficiente para llevar a cabo todas las mediciones. Los datos específicos para cada estudio, se muestran en el apartado de resultados.

7.2 Evaluación de MN y tipo de MN en RET y E de sangre periférica de niños de los cuatro grupos de estudio

7.2.1 Obtención y fijación de la muestra

Las muestras de sangre periférica de todos los niños se obtuvo por venopunción posterior utilizando 100µL de heparina sódica (250 U/mL, microlab) como anticoagulante. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y fueron fijadas dentro de las tres horas siguientes a la extracción. Para fijarlas se tomó una alícuota de 100 µL de sangre periférica y se diluyó (1:2) en BBS (0.9 g de NaCl+0.0444 g de NaHCO₃ en 100 mL de H₂O destilada) a pH 7.5. De la muestra diluida se tomaron 100 µL y se fijaron (agitando vigorosamente) en criotubos que contenían 2 mL de metanol (Merck) ultrafrío (-70°C). Las muestras

se almacenaron en un ultracongelador a -70°C al menos durante 24 horas antes de ser teñidas para su posterior análisis (Dertinger y col., 1996).

7.2.2 Tinción celular

Detección de MN en RET y E en sangre periférica de niños de los cuatro grupos de estudio

El día del análisis, las muestras fueron retiradas del ultracongelador. Se resuspendió el volumen total y se tomó una alícuota de 1 mL. Con el fin de eliminar el fijador, se lavó con BBS a 4°C , centrifugando a 600 xg durante 5 minutos a 4°C . El botón recuperado se resuspendió y redistribuyó en alícuotas de 25 μL en 3 tubos de polipropileno que contenían 80 μL de RNasa (1mg/mL, M.P. Biomedicals, Inc. Francia). El primer tubo fue utilizado para detectar la autofluorescencia, al segundo tubo se agregaron 5 μL de anti-IgG1-FITC (Millipore, Australia Pty. Limited), y fue usado como control negativo. En el tercer tubo se agregaron 5 μL de anti-CD71-FITC (Chemicon International, USA & Canada) para marcar RET y 10 μL de anti-CD61-PE (Chemicon International, USA & Canada) para marcar plaquetas y poder excluirlas de la región de análisis (Dertinger y col., 1996; Tourus y col., 1998).

Todos los tubos se incubaron a 4°C durante 40 minutos, y por 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al término de la incubación se agregaron 500 μL de BBS y se procedió a su análisis por citometría de flujo. En este momento se agregaron a todos los tubos 2 μL de yoduro de propidio frío (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma) para evidenciar la presencia de MN (Dertinger y col., 2000).

7.2.3 Análisis por Citometría de Flujo

El ensayo de MN utilizado en este trabajo se basó en el uso de anti-CD71-FITC para marcar a los RET y diferenciarlos de los E, el uso de IP para detectar MN en ambas poblaciones celulares y anti-CD61-PE para excluir agregados plaquetarios.

Se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA) con láser de argón a 488 nm de

excitación y el paquete computacional Cell Quest (versión 3.0.1, Becton Dickinson) para analizar los datos. Se adquirieron 500,000 células por muestra. Las señales de anti-CD71-FITC, anti-CD61-PE e IP fueron detectadas en los canales FL1, FL2 y FL3 respectivamente.

Para el análisis de los datos se desplegaron gráficas de puntos, con las cuales se implementó la siguiente estrategia de regionalización (figura 31):

- a) Se seleccionó la población de análisis graficando “Forward Scatter” (dispersión frontal de la luz) contra “Side Scatter” (dispersión lateral de la luz), para delimitar la región de células individuales.
- b) Posteriormente, en una gráfica de FL3 vs. FL1 se identificó la región de acuerdo al contenido de ADN para excluir a las células nucleadas.
- c) Por último se delimitó la región, excluyendo a las plaquetas (anti-CD61-PE vs. anti-CD71-FITC).

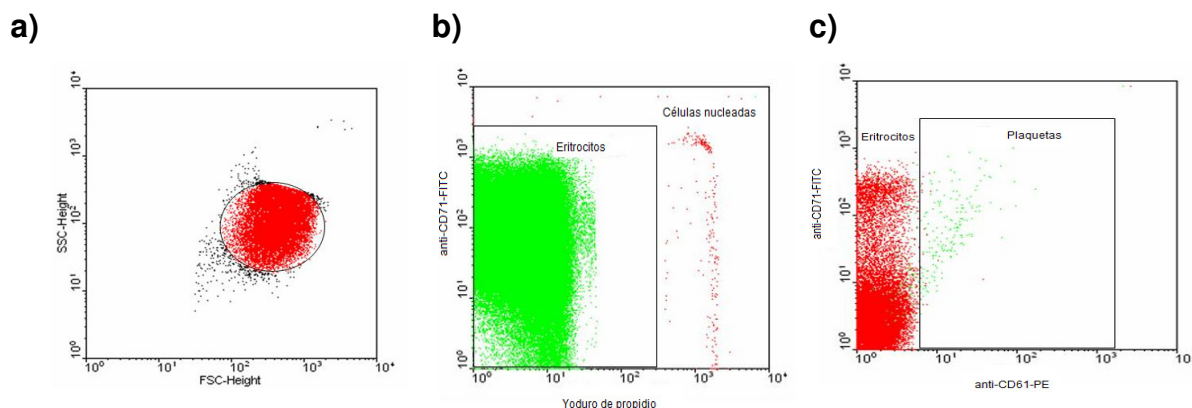


Figura 31. Secuencia de análisis para delimitar la región de interés. a) Selección de la población de E en base a la dispersión frontal (FSC-Height) y lateral (SSC-Height) de la luz. b) Eliminación de células nucleadas en base a la tinción de IP vs. anti-CD71-FITC. c) Eliminación de las plaquetas en base a la tinción anti-CD61-PE vs. anti-CD71-FITC.

Una vez delimitada la región de análisis y de acuerdo a la tinción con anti-CD71-FITC y a IP, se detectaron los porcentajes de las diferentes poblaciones de eritrocitos: RET, RET-MN, E y E-MN (Figura 32). Los porcentajes de RET, RET-

MN y E-MN se calcularon de acuerdo a la forma propuesta por los laboratorios Litron (Rochester, NY).

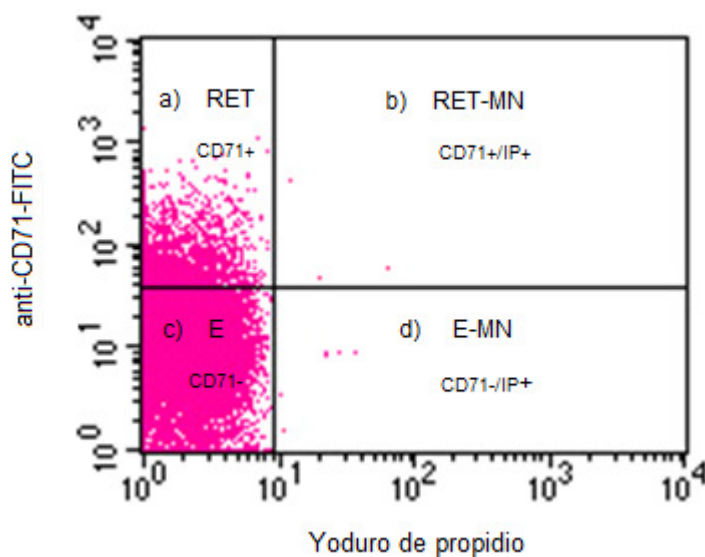


Figura 32. Gráfica de puntos en la que se observan las poblaciones de interés. a) RET (tinción positiva a anti-CD71-FITC), b) RET-MN (tinción positiva a anti-CD-FITC y a IP), c) E (Tinción negativa a anti-CD-FITC y d) E-MN (tinción negativa a anti-CD71-FITC y positiva a IP).

7.3 Determinación del tipo de MN en RET y E en sangre periférica de los cuatro grupos de estudio.

7.3.1 Obtención y fijación de la muestra

Las muestras fueron fijadas en metanol dentro de las tres horas siguientes a la obtención, de la misma manera como se describió previamente.

7.3.2 Tinción de células

El día del análisis, las muestras fueron retiradas del ultracongelador. Se resuspendió el volumen total y se tomó una alícuota de 1 mL. Se lavó con BBS a 4°C, centrifugando a 600 xg durante 5 minutos a 4°C. El botón recuperado se resuspendió y redistribuyó en alícuotas de 25 µL en 3 tubos de polipropileno.

El tubo 1 se incubó con BBS mas Tween al 0.1% por 5 minutos, después se centrifugó a 600 xg por 5 minutos. Al botón recuperado se le agregaron 20 µL de anti-Cinetocoro (anti-K) (Chemicon International, USA & Canada) y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se centrifugó y al botón recuperado se agregaron 50 µL de Cy5 (Chemicon International, USA & Canada) y se incubó a temperatura ambiente. Se centrifugó y se agregaron 80 µL de RNasa (1mg/mL) (M.P. Biomedicals, Inc. Francia) más 5 µL de anti-CD71-FITC (Chemicon International, USA & Canada). Al tubo 2 (para calibrar) se le agregaron 80 µL de RNasa (1mg/mL) más 5 µL de anti-CD71-FITC (Chemicon International, USA & Canada). Al tubo 3 (control negativo) se agregaron 5 µL de anti-IgG1-FITC (Millipore, Australia Pty. Limited).

Todos los tubos se incubaron a 4°C durante 40 minutos, y por 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al término de la incubación se agregaron 500 µL de BBS y se procedió a su análisis por citometría de flujo. En este momento se agregaron a todos los tubos 2 µL de IP de propidio frío (2 µg/mL) para evidenciar la presencia de MN (Dertinger y col. 2003).

7.3.3 Análisis por citometría de flujo

Para determinar el tipo de MN, se utilizó anti-CD71-FITC para marcar a los RET y diferenciarlos de los E, IP para detectar MN en ambas poblaciones celulares y anti-cinetocoro acoplado a Cy5 para detectar la presencia de cinetocoro, partiendo de la premisa de que si se observa “señal” para cinetocoro, el MN es de tipo aneugénico y si no se detecta “señal”, el MN es de tipo clastogénico.

Se utilizó el mismo citómetro de flujo descrito previamente. Se adquirieron 500,000 células por muestra. Las señales de anti-CD71-FITC, IP y Cy5 fueron detectadas en los canales FL1, FL2 y FL3 respectivamente.

Para el análisis de los datos se desplegaron gráficas de puntos, con las cuales se implementó la siguiente estrategia de regionalización (Figura 33):

- a) Se seleccionó la población de análisis para delimitar la región de células individuales.

b) En una gráfica de FL3 vs. FL1 se identificó la región de acuerdo al contenido de ADN para excluir a las células nucleadas.

c) En base a la tinción de IP y anti-CD71-FITC, se identificaron las poblaciones de RET, RET-MN, E y E-MN.

d) Por último se delimitó la región, de acuerdo a la tinción con anti-CD71-FITC y a Cy5 para detectar los porcentajes de las diferentes poblaciones de eritrocitos: RET-MN, RET-MN que presenten cinetocoro (RET-MN-K+), E-MN y E-MN que presenten cinetocoro (E-MN-K+). Los porcentajes de estas poblaciones se calcularon usando una hoja de cálculo en EXCEL.

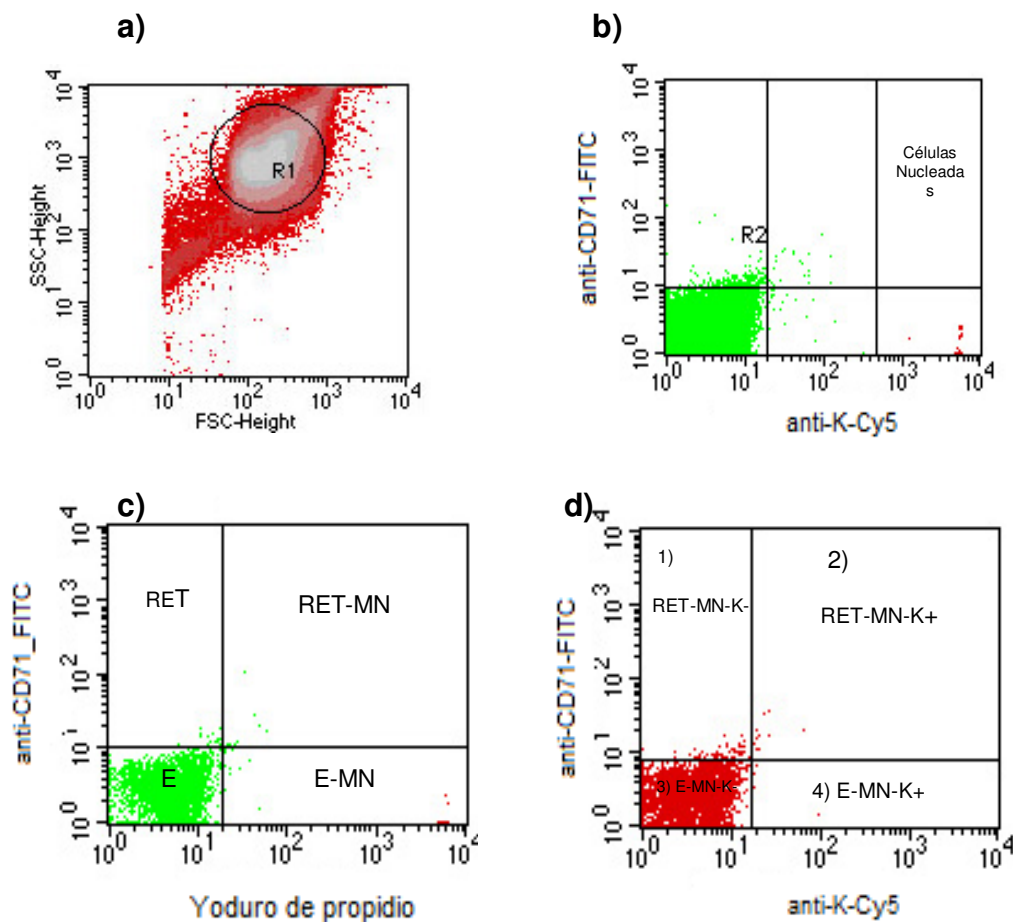


Figura 33. Las gráficas de puntos muestran la secuencia de regionalización, así como las poblaciones de interés. a) Se ubica a la población de E en base a la dispersión frontal (FSC-Height) y lateral (SSC-Height) de la luz. b) Eliminación de células nucleadas en base a la tinción de anti-K-Cy5 vs. anti-CD71-FITC. c) Se delimitan las poblaciones de RET, RET-MN, E y E-MN. D) Se identifican las poblaciones de interés: 1) RET-MN-K-: RET positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e

IP, pero negativos a la tinción con anti-K-Cy5 (RET con MN de tipo clastogénico). 2) RET-MN-K+: RET positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e IP, así como a la tinción con anti-K-Cy5 (RET con MN de tipo aneugénico). 3) E-MN-K-: E positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e IP, pero negativos a la tinción con anti-Cy5 (E con MN de tipo clastogénico). 4) E-MN-K+: E positivos a la tinción con anti-CD71-FITC e IP, así como a la tinción con anti-K-Cy5 (RET con MN de tipo aneugénico).

7.4 Evaluación de lipoperoxidación de la membrana de eritrocitos de sangre periférica de los cuatro grupos de estudio

El método utilizado se basó en el ensayo de hemólisis, incubando las muestras durante 3 horas con [2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloro] (AAPH Cayman Chemicals, USA). El AAPH es un compuesto AZO soluble en agua, que es usado como un generador de radicales libres, así como en la peroxidación de lípidos y en la caracterización de antioxidantes. La descomposición del AAPH produce nitrógeno molecular y dos radicales carbono.

Los radicales carbono pueden combinarse para generar productos estables o reaccionar con moléculas de oxígeno y formar radicales peroxilo. La vida media del AAPH es de alrededor de 175 horas a 37°C y pH neutro, dando una tasa de generación de radicales libres esencialmente constante durante las primeras horas de ensayo.

Se utilizó 1 mL de sangre entera, a la cual se le agregaron 3 mL de PBS y se centrifugó 3 veces a 3000 xg durante 10 minutos. Del paquete eritrocitario se tomaron alícuotas de 250 µL y se colocaron en 3 tubos de polipropileno. En el tubo 1 se adicionaron 250 µL de PBS (control negativo), en el tubo 2 se agregaron 250 µL de AAPH 150 mM, y en el tubo 3 se agregaron 250 µL de agua destilada (control positivo). Se incubó en baño maría a 37⁰ C durante un tiempo total de 3 horas. Cada hora se tomó una alícuota de cada tubo y se hizo una dilución 1:200 con PBS, se centrifugó a 3000 xg durante 5 minutos. Se tomaron 1000 µL del sobrenadante y se colocaron en una celda.

La concentración de hemoglobina liberada se midió espectrofotométricamente a 410 nm, cada hora durante las 3 horas, utilizando un espectrofotómetro UV-visible Beckman DU 650.

Se calculó el porcentaje de hemólisis tomando como referencia el control positivo tratado con agua destilada: Para cada individuo se tomó el valor máximo de absorbancia del control positivo como hemólisis completa (A) y se realizó una regla de tres para encontrar el porcentaje de hemólisis para cada tubo tratado con AAPH (B).

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{B \times 10}{A}$$

7.5 Evaluación de la actividad de Glutación peroxidasa (GPx)

Se utilizó el estuche comercial RANSEL (Randox Laboratories Ltd, County Antrim, UK) para determinar la actividad de GPx por un método espectrofotométrico que emplea GR, usando hidroperóxido de cumeno como sustrato y midiendo la absorción a 340 nm en un espectrofotómetro UV-visible Beckman DU 650. La actividad se expresó como U/L de sangre total.

7.5.1 Preparación de la muestra

Se diluyeron 50 µL de sangre entera heparinizada en 1 mL de solución diluyente, se incubó durante 5 minutos a 37 °C. En una celda se colocaron 20 µL de la muestra diluida, 1 mL de reactivo (glutación 4 mmol/L, glutación reductasa \geq 0.5 U/L, NADPH 0.34 mmol/L) y 40 µL de cumeno (hidroperóxido de cumeno 0.18 mmol/L). Se agitó con vortex y se leyó la absorbancia inicial de la muestra y del reactivo blanco al cabo de un minuto y se empezó a cronometrar simultáneamente para leer las absorbancias 2 y 3 al cabo de 1 y 2 minutos respectivamente.

Los reactivos utilizados y sus concentraciones se muestran en el siguiente cuadro (Cuadro 4).

Cuadro 4. Se muestra la composición de los reactivos utilizados en la determinación de la actividad de GPx.

Reactivos	
Componentes	
Concentraciones en la prueba	
1. Reactivo	
GSH	4 mmol/L
GR	≥ 0.05 U/L
NADPH	0.28 mmol/L
2. Amortiguador	
Amortiguador de fosfato	0.05 mmol/ L pH 7.2
EDTA	4.3 mmol/L
3. Hidropéroxido de cumeno	0.18 mmol/L
4. Diluyente	

La preparación de las soluciones se hizo de la siguiente manera:

1. Reactivo: Se reconstituyó un vial de reactivo 1 con 6.5 mL de amortiguador 2

2. Hidroperóxido de cumeno: Se diluyeron 10 µL con 10 mL de agua bidestilada y se mezcló agitando vigorosamente. Se utilizó la solución fresca preparada en el día.

3. Diluyente: Se reconstituyó el contenido de un vial de Diluyente 4 con 200 mL de agua bidestilada.

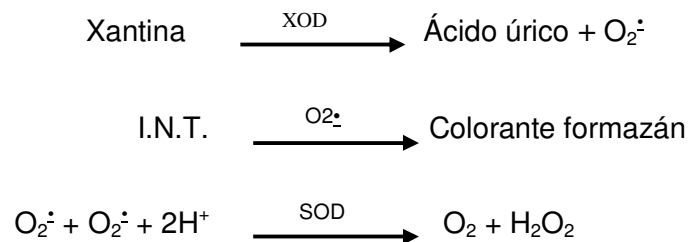
La concentración de GPx se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{U/L de hemolisado} = 8412 \times \Delta A_{340\text{nm}}/\text{minuto}$$

7.6 Evaluación de la actividad de Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se midió usando el estuche comercial SD125 RANSOD (Randox Laboratories Ltd, County Antrim, UK).

Este método emplea xantina y xantin-oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazoilo (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la SOD por el grado de inhibición de esta reacción (Woolliams y col, 1983; Arthur y col., 1985).



La absorbancia se midió mediante un espectrofotómetro UV-visible Beckman DU 650.

7.6.1 Preparación de la muestra

Se utilizaron 500 μL de sangre total heparinizada y se centrifugaron a 3000 xg durante 10 minutos. Se separó el paquete eritrocitario, se adicionaron 3 mL de solución fisiológica al 0.9 % y se centrifugó 4 veces a 3000 xg durante 10 minutos. Al botón resultante se le agregaron 2 mL de agua bidestilada fría, se mezcló y se incubó a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Se tomó una alícuota de esta dilución, y se diluyó en amortiguador fosfato 0.01 mM. En una celda se agregaron 50 μL de la dilución y se agregaron 1.7 mL de sustrato mixto (xantina + I. N. T.), se agitó con vortex, se adicionaron 250 μL de xantin-oxidasa, se agitó con vortex. Se registró la absorbancia A_1 al cabo de 30 segundos y se comenzó a cronometrar el tiempo para leer la absorbancia A_2 a los 3 minutos, frente a blanco de agua a una longitud de onda de 505 nm y a una temperatura de 37 $^{\circ}$ C. La actividad se reportó en USOD/mL.

Los reactivos utilizados y sus concentraciones se muestran en el siguiente cuadro (Cuadro 5).

Cuadro 5. Se muestra la composición de los reactivos utilizados en la determinación de la actividad de SOD.

Reactivos	
Componentes	Concentraciones iniciales de las soluciones
1. Sustrato mixto	
Xantina	0.05 mmol/L
I.N.T.	0.025 mmol/L
2. Amortiguador	
CAPS	40 mmol/ L pH 10.2
EDTA	0.94 mmol/L
3. Xantin oxidasa	80 UI
4. Patrón	Valor asignado en el vial

La preparación de las soluciones se hizo de la siguiente manera:

1. Sustrato mixto: Se reconstituyó un vial de sustrato mixto con 20 mL de amortiguador.
2. Xantin oxidasa: Se reconstituyó un vial con 10 mL de agua bidestilada.
3. Patrones: Se reconstituyó el contenido de un vial de Patrón con 10 mL de agua bidestilada, Posteriormente se hicieron diluciones con muestra diluyente Ransod. Las diluciones se muestran en el siguiente cuadro (Cuadro 6).

Cuadro 6. Se muestra la construcción de la curva patrón para determinar la actividad de SOD.

	Volumen de soluciones patrón	Volumen de muestra diluyente
	Patrón neto	-----
6		
	5 mL de S6	5mL
5		
	5 mL de S5	5 mL
4		
	5 mL de S4	5 mL
3		
	3 mL de S3	5mL
2		
	S1: Muestra diluyente	

Para realizar los cálculos se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A / \text{min de patrón o de muestra}$$

Índice de muestra diluyente (SI) = índice de reacción sin inhibir = 100%

Los índices de los patrones y de las muestras diluidas se convirtieron en porcentajes del índice del blanco y se restaron del 100% para obtener un porcentaje de inhibición:

$$100 - \frac{(\Delta A \text{ patrón} / \text{min} \times 100)}{(\Delta A S1 / \text{min})} = \% \text{ inhibición}$$

$$100 - \frac{(\Delta A \text{ muestra} / \text{min} \times 100)}{(\Delta A S1 / \text{min})} = \% \text{ inhibición}$$

Se presentó el porcentaje de inhibición para cada patrón frente a Log_{10} [concentración de patrón en unidades SOD/mL]. Se utilizó el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades (U) de SOD de la curva patrón (CP).

U de SOD/mL de sangre entera = U de SOD en la CP/mL x factor de dilución

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada grupo se calculó el promedio y el error estándar (Prom. \pm e.e.) de cada uno de los parámetros evaluados (%RET, % RET-MN, % E-MN, %RET-MN-K+, %E-MN-K+, % hemólisis, U/L de GPx en sangre total y USOD/mL en sangre total). Además para el caso de RET, RET-MN y E-MN, se analizó la dispersión de los datos (mostrando mediana) con la finalidad de observar la variabilidad entre y dentro de los grupos de estudio.

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

9. RESULTADOS

En la primera parte del estudio se evaluó, por citometría de flujo, la frecuencia de RET, de RET con MN y de E con MN en sangre periférica de niños de los cuatro grupos de estudio. Con base en los criterios de inclusión, exclusión y no inclusión, para esta parte del estudio, se conformaron los siguientes grupos de niños:

Grupo BN: Se incluyeron 23 bien nutridos y con buen estado de salud (11 del sexo masculino y 12 del sexo femenino).

Grupo BNI: Se conformó por 27 bien nutridos con infección asociada (16 del sexo masculino y 10 del sexo femenino).

Grupo DESMI: Este grupo consistió de 30 infantes con las características mencionadas previamente (16 del sexo masculino y 14 del sexo femenino).

Grupo DESGI: Se colectaron las muestras de 14 niños (7 del sexo masculino y 7 del sexo femenino) Las edades de todos los niños oscilaban entre los 6 a los 31 meses.

En la Cuadro 7 se resumen las características clínicas de los niños incluidos en todo el estudio. Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y

promedios de la edad, peso, estatura y déficit de peso, así como el porcentaje de niños con un tipo particular de infección.

Es importante recalcar que en esta tabla se muestra el total de los niños analizados, sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, para cada estudio el tamaño de muestra (n) cambió, debido a que el volumen de sangre extraído no siempre fue el suficiente para llevar a cabo todas las determinaciones contempladas.

Cuadro 7. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio.

Grupo	n	Edad (meses) $\bar{x} \pm ds$	Peso (Kg) $\bar{x} \pm ds$	Estatura (cm) $\bar{x} \pm ds$	Déficit de peso (%)	Tipo de Infección
BN	23	31.6 \pm 18.5 (6-60)	13.3 \pm 4.30 (6.15-22)	91.8 \pm 18.5 (51-123)	< 10	Sin infección
BNI	27	28.7 \pm 14.3 (6-60)	12.4 \pm 4.04 (7-24.5)	87.9 \pm 15.8 (65-123)	< 10	Respiratorias (81.4%) Gastrointestinales (18.5%)
DESMI	30	21.7 \pm 18.1 (6-60)	8.2 \pm 3.25 (3.1-17.5)	74.9 \pm 16.7 (50-128)	28.8 (23.1-38.5)	Respiratorias (66.6%) Gastrointestinales (30%) Mixta ^b (3.3%)
DESGI	14	12.6 \pm 7.53 (5-31)	5.14 \pm 1.57 (3-9)	61.8 \pm 3.60 (58-68)	46.5 (34-58)	Respiratorias (42.8%) Gastrointestinales (50%) Mixta ^b (7.1%)

Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y promedios de la edad \pm D.E., peso \pm D.E., estatura \pm D.E. y déficit de peso, así como porcentaje de niños con un tipo particular de infección. ^a Entre paréntesis se muestra el número de niños que presentaban ese tipo de infección. ^b Mixta: El niño presenta infección gastrointestinal y respiratoria.

9.1 Frecuencia Reticulocitos

Los datos de las frecuencias de RET observados en cada uno de los niños de los diferentes grupos estudiados se muestran en la Cuadro 8.

El porcentaje promedio de RET en los niños del grupo BN fue de 1.71 ± 0.26 %, con un intervalo de valores de 0.08% a 5.07%. Al comparar el grupo BN con los BNI se observa que la infección induce un incremento en la frecuencia de RET, ya que los datos obtenidos muestran que el porcentaje promedio de RET en los niños del grupo BNI fue significativamente mayor (2.36 ± 0.26 %, $p \leq 0.05$), con intervalo de valores de 0.02-5.33%, en comparación con el grupo de niños BN sin infecciones.

En los grupos de niños con desnutrición se observó un incremento en la frecuencia de RET en comparación con los niños BN y BNI, en el grupo DESMI el promedio fue de 3.22 ± 0.50 % (intervalo de 0.02 a 10.73%) y en el grupo DESGI fue 4.07 ± 0.87 % (intervalo de 0.18 a 9.38%) (Figura 34).

De este modo se puede observar una tendencia que indica que los niños con desnutrición moderada e infecciones muestran un aumento en la frecuencia de RET en comparación con los BNI, lo cual podría relacionarse con el hecho de que la desnutrición induce un incremento en la frecuencia de RET (Figura 34). Del mismo modo, se observa que a mayor grado de desnutrición la frecuencia de RET circulantes es superior, como se observa en el caso de los niños DESGI, los cuales mostraron un aumento estadísticamente significativo (4.07 ± 0.087 %, $p \leq 0.05$) en comparación con los BNI. No se observó diferencia estadística entre los dos grupos de niños desnutridos, a pesar de que se existió un aumento en la frecuencia de RET en los niños DESGI.

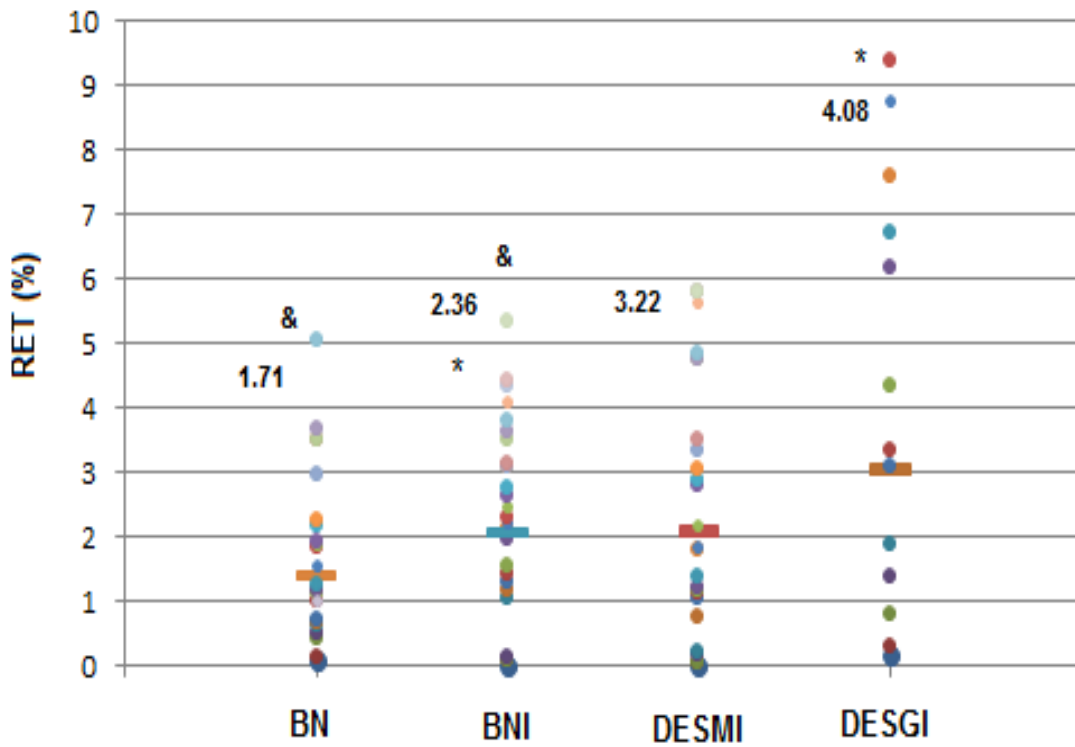


Figura 34. Frecuencia de RET: Gráfica de puntos que muestra la dispersión y mediana de los datos obtenidos para cada niño. Niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada (DESMI) y grave (DESGI) ambos con infecciones. Diferencia significativa: &BN vs &BNI; * BNI vs. DESGI ($p \leq 0.05$).

Cuadro 8. Frecuencia de RET en muestras de sangre periférica los niños incluidos en el estudio.

RET (%)			
BN	BNI	DESMI	DESGI
0.08	0.02	0.02	0.18
0.11	0.08	0.04	0.29
0.41	0.1	0.04	0.81
0.5	0.12	0.17	1.39
0.61	1.03	0.22	1.89
0.69	1.19	0.75	3.05
0.7	1.31	1.03	3.11
1	1.42	1.14	3.36
1.14	1.53	1.17	4.35
1.18	1.98	1.21	6.18
1.26	2.07	1.37	6.7
1.39	2.12	1.78	7.61
1.53	2.2	1.82	8.76
1.85	2.31	2.09	9.38
1.87	2.45	2.17	
1.94	2.64	2.81	
2.18	2.74	2.89	
2.27	3.11	3.03	
2.98	3.11	3.33	
3.51	3.14	3.5	
3.51	3.51	4.76	
3.68	3.62	4.77	
5.07	3.81	4.86	
	4.11	5.62	
	4.36	5.79	
	4.42	5.79	
	5.33	5.82	
		8.18	
		9.73	
		10.73	
1.71±0.26 ^a	2.36±0.26 ^a	3.22±0.50 ^a	4.08±0.87 ^a

Niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada (DESMI) y grave (DESGI) ambos con infecciones. ^a Promedio ± error estándar de cada grupo de estudio.

9.2 Frecuencia de reticulocitos con micronúcleos

Los datos de las frecuencias de RET-MN observados en cada uno de los niños de los cuatro grupos de estudio se muestran en el Cuadro 9. Los datos indican que el grupo DESGI presenta mayor frecuencia de RET-MN con un promedio de $2.63 \pm 0.44\%$ (intervalo de 0.54 a 4.94%) en comparación con el grupo de niños DESMI $1.63 \pm 0.17\%$ (intervalo de 0.52 a 3.67%), sin embargo no existe diferencia significativa entre estos dos grupos (Figura 35). En relación a los niños BN la frecuencia de RET-MN es de $0.44 \pm 0.05\%$ (intervalo de 0.09 a 1.13%), esta frecuencia es significativamente menor a la observada en los BNI $1.08 \pm 0.11\%$ (intervalo de 0.09 a 2.38%, $p \leq 0.05$). Estos valores indican que la frecuencia de RET-MN de los niños BNI muestra un incremento asociado con la infección. Por otro lado, al comparar al grupo de niños BNI con el grupo DESMI, estos últimos mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$). Con relación al grupo DESGI el porcentaje también es significativamente mayor al de BNI ($1.93 \pm 0.51\%$ y $0.99 \pm 0.14\%$, respectivamente; $p \leq 0.05$) (Figura 35).

Al comparar las frecuencias de RET-MN de los niños BN con las de los niños con diferentes grados de desnutrición, se observó que ambos grupos muestran un incremento estadísticamente significativo en comparación con los niños bien nutridos sin infecciones ($p \leq 0.05$ en ambos casos).

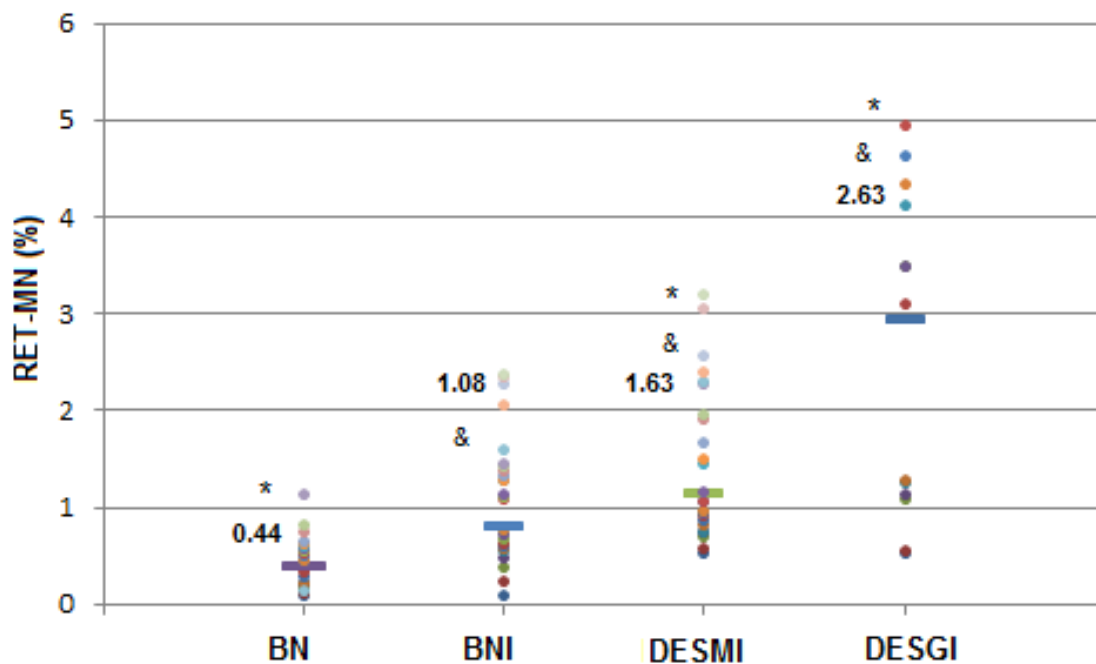


Figura 35. Frecuencia de RET-MN: Gráfica de puntos que muestra la dispersión y mediana de los datos obtenidos para cada niño. Niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada (DESMI) y grave (DESGI) ambos con infecciones. Diferencia significativa: * BN vs. DESMI, DESGI; & BNI vs. DESMI, DESGI ($p \leq 0.05$).

Cuadro 9. Frecuencia de RET-MN en muestras de sangre periférica de los niños incluidos en el estudio.

RET-MN (%)			
BN	BNI	DESMI	DESGI
0.09	0.09	0.52	0.54
0.12	0.24	0.57	0.56
0.14	0.38	0.69	1.08
0.16	0.47	0.74	1.14
0.21	0.55	0.75	1.25
0.22	0.58	0.83	1.29
0.22	0.61	0.87	2.94
0.29	0.62	0.91	3.11
0.33	0.68	0.93	3.48
0.4	0.73	0.93	3.49
0.4	0.76	0.96	4.12
0.45	0.77	0.97	4.35
0.46	0.8	1.06	4.63
0.5	1.08	1.07	4.94
0.54	1.11	1.15	
0.55	1.14	1.16	
0.57	1.27	1.46	
0.6	1.28	1.49	
0.62	1.34	1.67	
0.66	1.37	1.9	
0.74	1.43	1.97	
0.83	1.45	2.27	
1.13	1.59	2.29	
	2.05	2.39	
	2.27	2.56	
	2.34	3.05	
	2.38	3.19	
		3.5	
		3.56	
		3.67	
0.44 ±	1.08 ±	1.63 ±	2.63 ±
0.05 ^a	0.11 ^a	0.17 ^a	0.44 ^a

Niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada (DESMI) y grave (DESGI) ambos con infecciones. ^a Promedio ± error estándar de cada grupo de estudio.

Para cada grupo de estudio se analizaron los datos de la frecuencia de RET-MN por género. Los resultados mostraron que en el grupo BN el porcentaje de RET-MN fue de 0.40% para niños y 0.48% para niñas. En el grupo BNI se observó una frecuencia de 1.22% para los niños y 0.85% para las niñas. Para los grupos DESMI y DESGI se observó que, igual que en los grupos anteriores, los niños tienen un mayor porcentaje de RET-MN que las niñas (1.76% vs. 1.62 para DESMI y 3.01% vs. 2.25%) (Figura 36). Sin embargo, a pesar de que los niños muestran mayor frecuencia de RET-MN, este aumento no fue significativo.

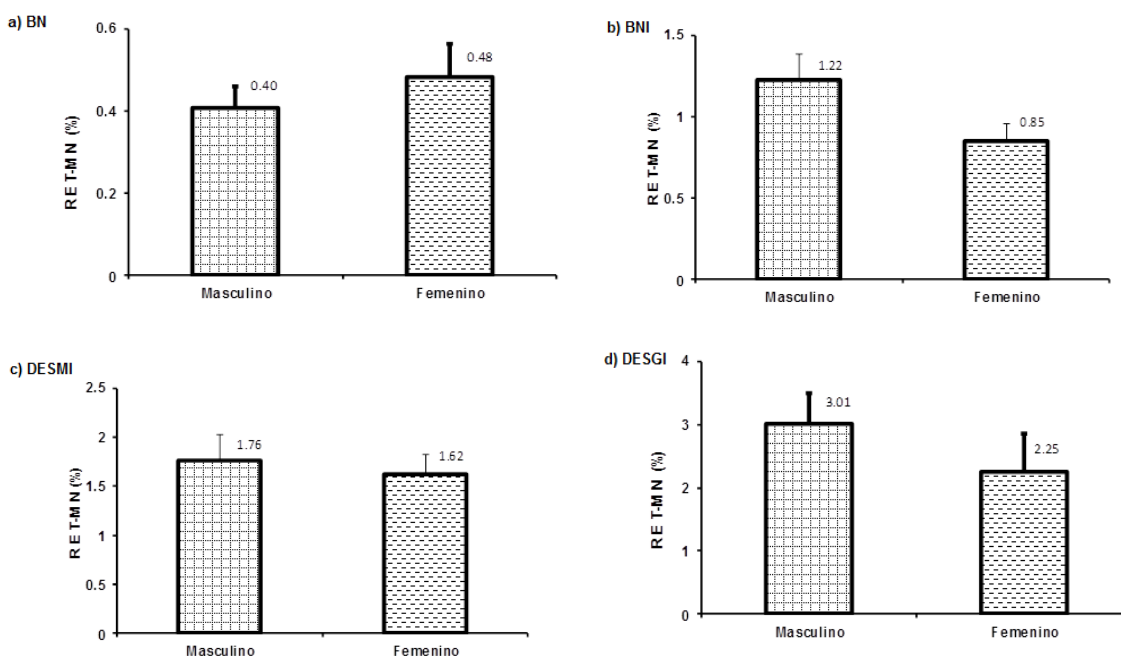


Figura 36. Análisis de la frecuencia de RET-MN por género (niños vs. niñas). a) Bien nutridos (BN), b) Bien nutridos infectados (BNI), c) Con desnutrición moderada (DESMI) y d) grave (DESGI) ambos con infecciones. Se muestra promedio y error estándar. No se encontró diferencia significativa $p > 0.05$.

9.3 Frecuencia de eritrocitos maduros con micronúcleos

Los datos de las frecuencias de E-MN observados en cada uno de los niños, así como el promedio y el error estándar se muestran en el Cuadro 10. Los niños del grupo BN presentaron un porcentaje promedio menor ($0.04 \pm 0.008\%$, con un intervalo de 0.01 a 0.16%, en comparación con el grupo BNI $0.05 \pm 0.009\%$ (intervalo de 0% a 0.19%). En los niños del grupo DESMI el promedio fue de $0.07 \pm 0.01\%$ (intervalo de 0.01 a 0.30%), lo que indica que la desnutrición moderada no induce daño al ADN determinado por la presencia de MN en eritrocitos. Sin embargo al comparar a los niños BNI con el grupo de niños con desnutrición grave, se observó un incremento significativo en la frecuencia de E-MN en estos últimos ($0.14 \pm 0.05\%$, $p \leq 0.05$) (Figura 37). Del mismo modo cuando se comparan las frecuencias de E-MN de los niños con desnutrición moderada con los niños con desnutrición grave, se observó un incremento significativo en estos últimos ($p \leq 0.05$).

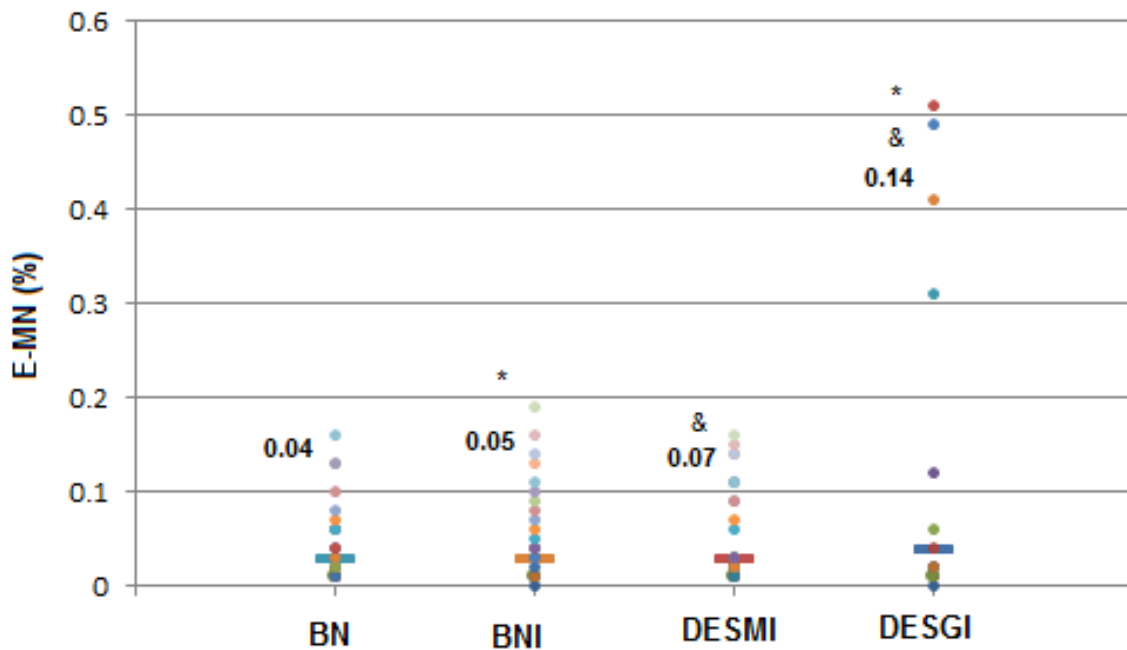


Figura 37. Frecuencia de E-MN: Gráfica de puntos que muestra la dispersión y mediana de los datos obtenidos para cada niño. Niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada (DESMI) y grave (DESGI) ambos con infecciones. Diferencia significativa: * BNI vs. DESGI; & DESMI vs. DESGI ($p \leq 0.05$).

Cuadro 10. Frecuencia de E-MN en muestras de sangre periférica de los niños incluidos en el estudio.

E-MN (%)			
BN	BNI	DESMI	DESGI
0.01	0	0.01	0
0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.01	0.01	0.02
0.01	0.01	0.01	0.02
0.01	0.01	0.02	0.02
0.01	0.02	0.02	0.04
0.02	0.03	0.02	0.04
0.02	0.03	0.02	0.06
0.03	0.03	0.02	0.12
0.03	0.03	0.02	0.31
0.03	0.03	0.02	0.41
0.04	0.03	0.03	0.49
0.04	0.04	0.03	0.51
0.06	0.04	0.03	
0.06	0.04	0.03	
0.06	0.05	0.06	
0.07	0.06	0.07	
0.08	0.07	0.09	
0.1	0.08	0.09	
0.13	0.09	0.11	
0.13	0.1	0.11	
0.16	0.11	0.11	
	0.13	0.14	
	0.14	0.14	
	0.16	0.15	
	0.19	0.16	
		0.16	
		0.26	
		0.3	
0.04±0.00	0.05±0.00	0.07±0.01 ^a	0.14±0.05 ^a
8 ^a	9 ^a		

Niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada (DESMI) y grave (DESGI) ambos con infecciones. ^a Promedio ± error estándar de cada grupo de estudio.

9.4 Determinación del tipo de MN en E y RET en sangre periférica en los cuatro grupos de estudio

En esta parte del estudio se analizó, por citometría de flujo, el tipo de MN presentes en RET y E de sangre periférica de niños bien nutridos y desnutridos. El tipo de MN se determinó de acuerdo a la presencia de cinetocoro, el cual fue detectado con el anticuerpo anti-cinetocoro acoplado a Cy5. Para este análisis se detectaron las siguientes poblaciones: reticulocitos con micronúcleos (RET-MN), reticulocitos con MN de tipo aneugénico (presentan cinetocoro, RET-MN-K+), eritrocitos micronucleados (E-MN) y eritrocitos con MN que presentaban cinetocoro (E-MN-K+). En el Cuadro 11 se resumen las características clínicas de los niños incluidos en el estudio. Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y promedios de la edad, peso, estatura y déficit de peso, así como el porcentaje de niños con un tipo particular de infección.

Cuadro 11. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio.

Grupo	n	Edad (meses) $\bar{x} \pm ds$	Peso (Kg) $\bar{x} \pm ds$	Estatura (cm) $\bar{x} \pm ds$	Déficit de peso (%)	Tipo de Infección
BN	18	39.5 \pm 18.53 (6-60)	14.4 \pm 3.64 (7-21)	95.7 \pm 18.68 (51-123)	< 10	Sin infección
BNI	23	29.3 \pm 14.80 (8-60)	12.6 \pm 4.18 (7-24.5)	89 \pm 15.84 (65-123)	< 10	Respiratorias (82.6%) Gastrointestinales (17.3%)
DESMI	21	18.6 \pm 14.53 (6-60)	7.8 \pm 3.13 (3-17.5)	76.2 \pm 16.9 (50-128)	28.7 (23.1-35.4)	Respiratorias (52.3%) Gastrointestinales (33.3%) Mixta ^b (14.2%)
DESGI	14	14.9 \pm 12.18 (6-45)	5 \pm 1.59 (3-9)	64 \pm 6.86 (58-83)	48.2 (34-75)	Respiratorias (50%) Gastrointestinales (35.7%) Mixta ^b (14.2%)

Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y promedios de la edad \pm D.E., peso \pm D.E., estatura \pm D.E. y déficit de peso, así como porcentaje de niños con un tipo particular de infección. ^a Entre paréntesis se muestra el número de niños que presentaban ese tipo de infección. ^b Mixta: El niño presenta infección gastrointestinal y respiratoria.

El porcentaje promedio de RET-MN-K+ y E-MN-K+ en los niños del grupo BN fue de 0.02±0.01% y de 0.55±0.15% respectivamente. El grupo BNI mostró un porcentaje promedio de RET-MN-K+ de 0.11±0.02% y de 0.63±0.09% para E-MN-K+.

En el grupo de niños DESMI se observó que los porcentajes promedio de RET-MN-K+ y E-MN-K+ fueron de 0.03±0.1% y de 0.43±0.06% respectivamente, mientras que para el grupo DESGI los valores encontrados fueron de 0.13±0.01% de RET-MN-K+ y de 0.42 ±0.14 de E-MN-K+.

Para calcular el porcentaje de MN de tipo clastogénico se hizo una resta, la cual consistió en tomar el total de eventos analizados como un 100% (ver estrategia de regionalización para tipo de MN). A este 100% se le restó el porcentaje de MN de tipo aneugénico y el resultado fue tomado como el porcentaje de MN de tipo clastogénico. Por ejemplo: en el caso del grupo BN se obtuvo un porcentaje de RET-MN-K+ de 0.02% (MN de tipo aneugénico) si se hace la resta de 100%-0.02%, se obtiene 99.9% de RET-MN-K- (MN de tipo clastogénico). Estos resultados se concentran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Porcentaje de MN de tipo aneugénico y clastogénico en RET y E de sangre periférica de los niños incluidos en el estudio.

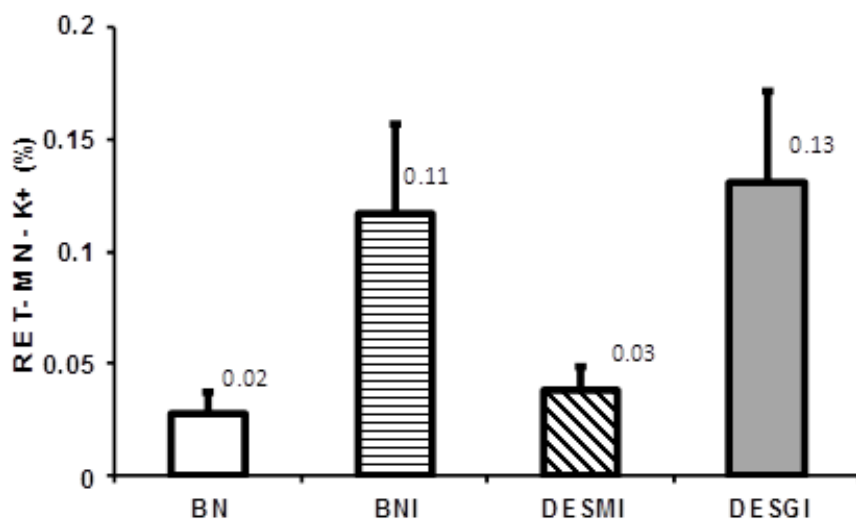
Tipo de MN (%)	BN	BNI	DESMI	DESGI
RET-MN-K+ (Aneugénico)	0.02± 0.01	0.11±0.04	0.03± 0.04	0.13± 0.04
RET-MN-K- (Clastogénico)	99.9	99.8	99.97	99.87
E-MN-K+ (Aneugénico)	0.55± 0.15	0.63±0.15	0.43± 0.07	0.4± 0.08
E-MN-K- (Clastogénico)	99.45	99.37	99.57	99.6

Niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada (DESMI) y grave (DESGI) ambos con infecciones. Promedio ± error estándar de cada grupo de estudio.

Los datos indican que los MN de tipo aneugénico, es decir, cinetocoro positivos, representan una fracción muy pequeña de las dos poblaciones celulares (Figura 38). También se observa que los E-MN presentan mayor frecuencia de MN

de tipo aneugénico, en comparación con los RET, en todos los grupos. Como puede observarse, la gran mayoría de MN fue de tipo clastogénico, los cuáles están relacionados con la ruptura de la cadena de ADN.

a)



b)

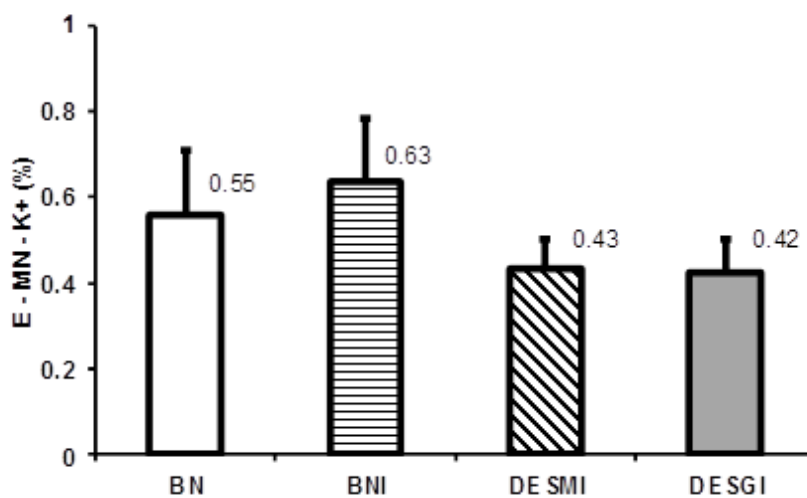


Figura 38. Porcentaje de RET y E que presentan MN de tipo aneugénico (RET-MN-K+ y E-MN-K+) en muestras de sangre periférica de niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada e infecciones (DESMI) y con desnutrición grave e infecciones (DESGI). Los datos son presentados como promedio \pm

error estándar. a) Porcentaje de RET-MN-K+ para todos los grupos b) Porcentaje de E-MN-K+ en los cuatro grupos de estudio. No se encontró diferencia significativa $p>0.05$.

9.5 Evaluación de daño oxidante

En el presente estudio también se analizó el daño oxidante en sangre periférica de niños bien nutridos y desnutridos. Para lo cual se midió la lipoperoxidación y la actividad de dos enzimas claves en la neutralización de ERO: GPx y SOD.

9.5.1 Medición de lipoperoxidación de la membrana de eritrocitos de sangre periférica

El método utilizado se basó en el ensayo de hemólisis antes descrito.

En el Cuadro 13 se resumen las características clínicas de los niños incluidos en el estudio.

Cuadro 13. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio.

Grupo	n	Edad (meses) $\bar{x}\pm ds$	Peso (Kg) $\bar{x}\pm ds$	Estatura (cm) $\bar{x}\pm ds$	Déficit de peso (%)	Tipo de Infección
BN	10	45.1 \pm 16.65 (19-60)	15.47 \pm 2.89 (17-22)	98.3 \pm 18.49 (90-123)	< 10	Sin infección
BNI	8	37.6 \pm 15.96 (19-60)	14.2 \pm 4.0 (9-21)	94.1 \pm 17.74 (75-123)	< 10	Respiratorias (75%) Gastrointestinales (25%)
DESMI	12	27.6 \pm 23.27 (6-60)	14.14 \pm 15.5 (5.3-17.5)	79.3 \pm 23.11 (65-128)	28 (27-32)	Respiratorias (75%) Gastrointestinales (25%)
DESGI	7	6.6 \pm 1.49 (6-44)	3.7 \pm 0.45 (3-4)	59.5 \pm 1.80 (58-65)	54.8 (40-75)	Respiratorias (42.8%) Gastrointestinales (42.8%) Mixta ^b (14.2%)

Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y promedios de la edad \pm D.E., peso \pm D.E., estatura \pm D.E. y déficit de peso, así como porcentaje de niños con un tipo particular de infección. ^a Entre paréntesis se muestra el número de niños que presentaban ese tipo de infección. ^b Mixta: El niño presenta infección gastrointestinal y respiratoria.

Los datos obtenidos muestran que el grupo BN tuvo un porcentaje de hemólisis de $22\pm 7.03\%$ (1 h), $37\pm 8.52\%$ (2h) y de $78\pm 11.01\%$ (3h). Para el grupo BNI los porcentajes registrados a la 1, 2 y 3 horas fueron $17\pm 02.8\%$, $33\pm 8.51\%$ y $52\pm 14.25\%$ respectivamente. El porcentaje registrado para los niños del grupo DESMI fueron de $15\pm 2.48\%$ a la primera hora, de $70\pm 23.24\%$ a la segunda hora y de $87\pm 21.37\%$ a la tercera hora de incubación. En relación al grupo DESGI se observó un porcentaje de hemólisis de $19\pm 4.8\%$, $71\pm 24.2\%$ y $119\pm 31.41\%$ a la primera, segunda y tercera hora respectivamente.

Los datos muestran que para todos los grupos, el porcentaje de hemólisis aumenta cada hora, lo que demuestra que hay un incremento en la lipoperoxidación de la membrana de los eritrocitos con el transcurso del tiempo de incubación.

Del mismo modo se observa que al finalizar el período de incubación (3 horas), el grupo DESGI presenta el mayor porcentaje de hemólisis, lo cual estaría reflejando que estos niños presentan mayor daño oxidante en comparación con los otros grupos de estudio. Al comparar el grupo BN con el BNI se observa que durante las tres horas de incubación, el porcentaje de hemólisis es mayor en los BN. Este resultado indica que las infecciones aparentemente no influyen en la generación de daño oxidante.

Por otro lado al comparar al grupo BNI con los dos grupos de desnutridos (DESMI y DESGI), se observa que en estos últimos hay un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de hemólisis durante todo el tiempo de incubación. Esto muestra que los niños con desnutrición, especialmente los que sufren desnutrición grave, presentan mayor lipoperoxidación; lo cual a su vez revela que sufren mayor daño oxidante (Figura 39).

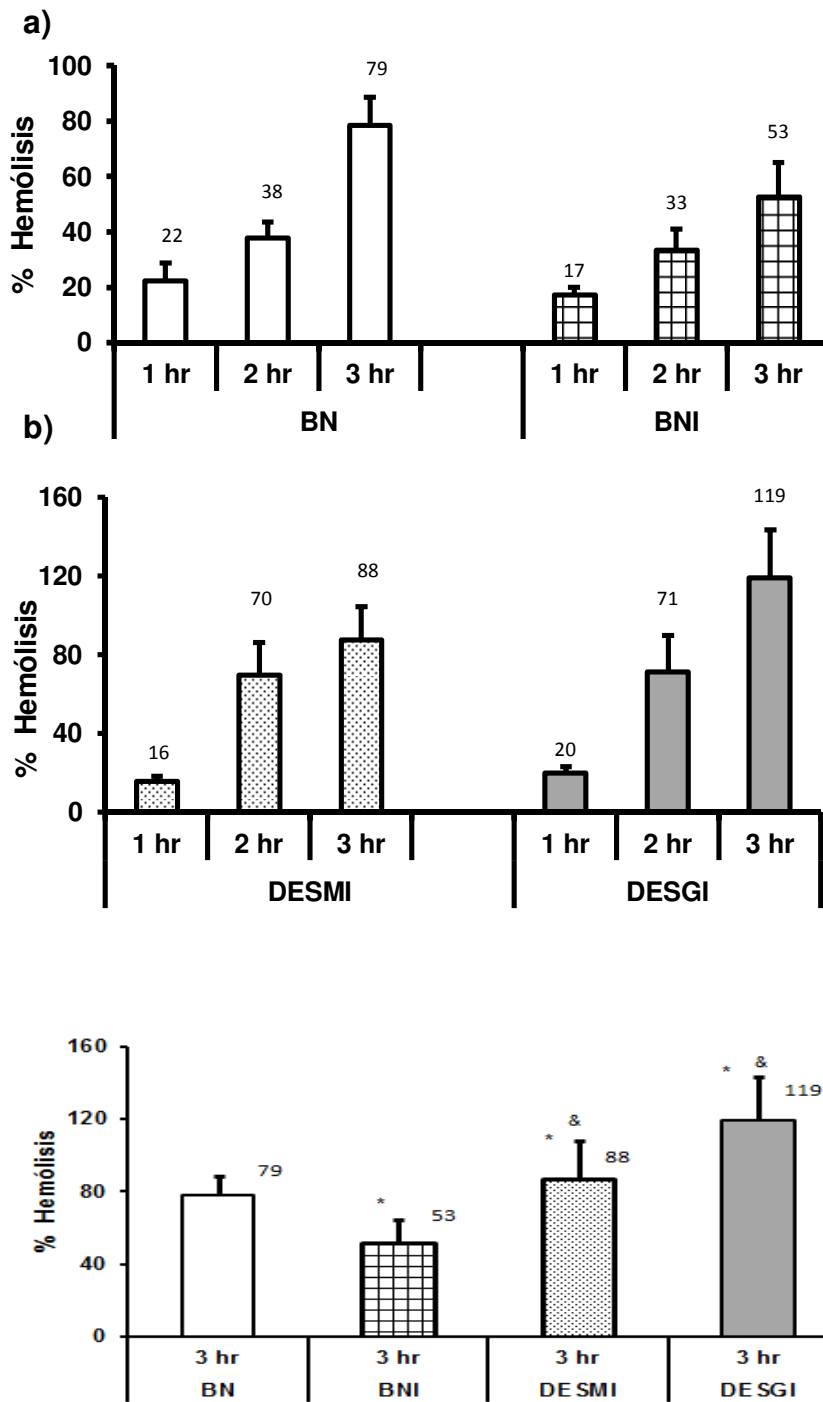


Figura 39. Porcentaje hemólisis en muestras de sangre periférica de niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada e infecciones (DESMI) y con desnutrición grave e infecciones (DESGI). Los datos son presentados como promedio \pm error estándar. a) Niños BN y BNI durante los tres intervalos de tiempo de incubación. b) Grupos DESMI y DESGI en cada tiempo de incubación. c) Porcentaje

de hemólisis para los cuatro grupos de estudio a las 3 horas de incubación. Diferencia significativa a las tres horas:* BNI vs. DESMI, DESGI; & DESMI vs. DESGI ($p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos con la evaluación de la lipoperoxidación, muestran que los niños con desnutrición moderada y grave presentan mayor daño oxidante, el cual podría estar relacionado con una deficiente respuesta antioxidante. Partiendo de esta premisa, la siguiente etapa de este trabajo consistió en medir la actividad de dos enzimas claves en la neutralización de ERO: SOD y GPx. Los resultados obtenidos para esta última parte del trabajo, se presentan a continuación.

9.5.2 Evaluación de la actividad de Glutatión peroxidasa

En el Cuadro 14 se resumen las características clínicas de los niños incluidos en el estudio. Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y promedios de la edad, peso, estatura y déficit de peso, así como el porcentaje de niños con un tipo particular de infección.

Cuadro 14. Características clínicas de los niños incluidos en el estudio.

Grupo	n	Edad (meses) $\bar{x} \pm ds$	Peso (Kg) $\bar{x} \pm ds$	Estatura (cm) $\bar{x} \pm ds$	Déficit de peso (%) $\bar{x} \pm ds$	Tipo de Infección ^a
BN	6	32.5 \pm 23.8 (19-60)	11.67 \pm 4.33 (17-22)	87.75 \pm 16.67 (90-123)	< 10	Sin infección
BNI	9	18.44 \pm 1.10 (9-41)	10.04 \pm 2.55 (7-10.3)	70.22 \pm 28.33 (71-105)	< 10	Respiratorias (66.6%) Gastrointestinales (33.3%)
DESMI	11	20.63 \pm 16.1 3 (6-59)	7.863 \pm 2.23 (5-13.5)	75.36 \pm 15.17 (56-105)	28.0 (27-31.9)	Respiratorias (36.3%) Gastrointestinales (54.5%) Mixta (9%)
DESGI	8	15.85 \pm 12.2 (6-44)	5.03 \pm 1.02 (4-6.1)	53.7 \pm 22.10 (63-60)	51.2 (37-75)	Respiratorias (62.5%) Gastrointestinales (25%) Mixta ^b (12.5%)

Se muestra el número de niños en cada grupo (n), los intervalos y promedios de la edad \pm D.E., peso \pm D.E., estatura \pm D.E. y déficit de peso, así como porcentaje de niños con un tipo particular de infección. ^a Entre paréntesis se muestra el número de niños que presentaban ese tipo de infección. ^b Mixta: El niño presenta infección gastrointestinal y respiratoria.

Se midió la actividad de GPx (U/L de sangre total) en los cuatro grupos de estudio (BN, BNI, DESMI y DESGI). Los resultados muestran que el grupo BNI presenta una actividad de GPx de 14,336 U/L de sangre, mientras que los niños BN presentaron una actividad de 14,354 U/L de sangre. Con relación a los niños con desnutrición, el grupo DESMI mostró una actividad de 12,480 U/L de sangre, mientras que el grupo DESGI registró una actividad de 11,727 U/L de sangre. Los resultados indican que los niños con desnutrición moderada y grave muestran una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la actividad de la GPx en comparación con el grupo BNI. Esto refleja que los niños con desnutrición no son capaces de desplegar una respuesta antioxidante eficiente aún en presencia de infecciones. Aunque no se encontró diferencia significativa entre los grupos DESMI y DESGI, la tendencia en los datos muestra que los niños con desnutrición grave presentan una respuesta menos eficiente en relación a la actividad de esta enzima (Figura 40).

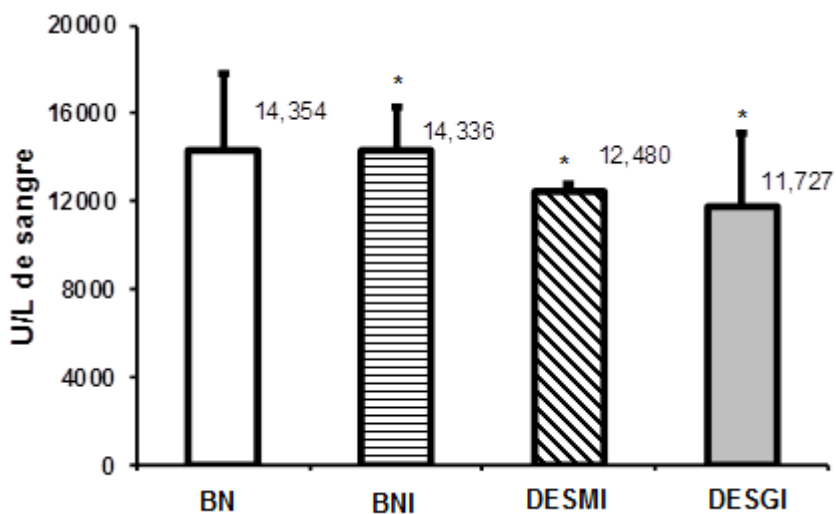


Figura 40. Actividad de GPx en sangre periférica de niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada e infecciones (DESMI) y con desnutrición grave e infecciones (DESGI). Los datos son presentados como promedio \pm error estándar. Diferencia significativa: * BNI vs. DESMI y DESGI. ($p \leq 0.05$).

9.5.3 Evaluación de la actividad de Superóxido Dismutasa

Se midió la actividad de SOD (USOD/mL de sangre) en los cuatro grupos de estudio (BN, BNI, DESMI y DESGI). Los valores muestran que la actividad de esta enzima en el grupo de niños BN es de 303 USOD/mL de sangre; mientras que en el grupo BNI esta actividad es mayor (428 USOD/mL de sangre, no se encontró diferencia significativa $p > 0.05$).

Los grupos DESMI y DESGI mostraron significativamente menor actividad (299 USOD/mL y 230 USOD/mL respectivamente, $p \leq 0.05$) en comparación con los grupos BN y BNI (Figura 41). La tendencia en los resultados indica que en los niños bien nutridos con infecciones la actividad de la enzima se ve modificada en comparación con los niños bien nutridos sin infecciones, mientras que en los niños desnutridos la actividad de la enzima se ve disminuida. Aunque no existe diferencia significativa entre los grupos DESMI y DESGI, los niños con desnutrición grave presentan la menor actividad enzimática, por lo que la tendencia de los datos muestra que estos niños presentan una respuesta antioxidante deficiente en comparación con los otros grupos.

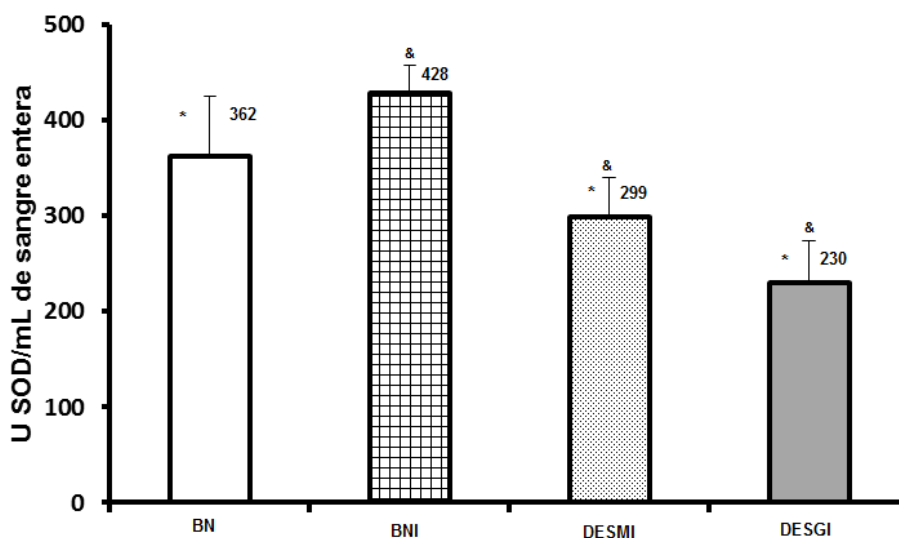


Figura 41. Actividad de SOD en sangre periférica de niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BNI), con desnutrición moderada e infecciones (DESMI) y con desnutrición grave e infecciones (DESGI). Los datos son presentados como promedio \pm error estándar. Diferencia significativa: * BN vs. DESMI, DESGI; & BNI vs. DESMI, DESGI ($p \leq 0.05$).

10. DISCUSIÓN

La desnutrición es una condición que provoca la muerte prematura de millones de niños en países en vías de desarrollo (Rodríguez y col., 2011). En las condiciones específicas de México ha quedado bien establecido que el principal problema de desnutrición infantil, es consecuencia directa de las condiciones de marginación y pobreza que acontece en los primeros años de vida (Hernández, 2003; Instituto Nacional de Salud Pública, 2006).

Estudios epidemiológicos muestran que la desnutrición genera un complejo círculo vicioso de infecciones, alteraciones en la alimentación, disminución de la absorción y biodisponibilidad de nutrimentos, incremento en el gasto energético, disminución de la resistencia inmunológica, lo cual frecuentemente conduce a un estado de desnutrición más grave que, a su vez, favorece la presencia de episodios infecciosos más frecuentes y graves (Muller y col., 2005; Kaler, 2008) y así sucesivamente.

Aunado a estas complicaciones, diversos estudios han reportado que los organismos desnutridos presentan diferentes alteraciones a nivel citogenético. Estas alteraciones observadas en células de organismos desnutridos, se han relacionado con varios factores, entre ellos, una respuesta antioxidante deficiente que permite que ciertas ERO interactúen con el ADN y provoquen su ruptura (Jain, 2008).

Por lo tanto en el presente estudio se consideró importante analizar la frecuencia y tipo de MN en RET y E de sangre periférica, así como evaluar el daño oxidante y la eficiencia de la respuesta antioxidante (por medio de la medición de la actividad de SOD y GPx) en niños bien nutridos, bien nutridos infectados y con desnutrición moderada y grave con infecciones bacterianas.

Los resultados del presente estudio indican que el porcentaje promedio de RET en sangre periférica de niños BN es de 1.71%, este valor se encuentra dentro del intervalo de valores normales reportados por el Servicio de Hematología del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (Benítez, 2009). En el caso de los niños BNI se observó un incremento de 1.3 veces en el porcentaje promedio de RET, lo que indica que la infección induce un aumento en el número de RET en sangre periférica. En

relación al grupo de niños con desnutrición moderada, estos presentaron un incremento de 1.9 veces en el porcentaje de RET circulantes en comparación con los niños BN, no se encontró diferencia significativa entre estos grupos, lo que indica que la desnutrición moderada parece no mostrar efecto en el número de RET circulantes.

No obstante, el grupo DESGI presentó un incremento de 2.3 veces en el porcentaje promedio de RET en relación con la frecuencia de RET en los niños BN y de 1.7 veces en comparación con los niños BNI. Del mismo modo, se observó un aumento en el porcentaje de RET en los niños DESGI en comparación con los DESMI. Esto sugiere que los niños con desnutrición grave sufren alteraciones hematológicas más marcadas. En relación a lo anterior, se ha determinado que la evaluación del número de RET en sangre, es útil para valorar la actividad eritropoyética de la médula ósea. Los RET se clasifican de acuerdo a su morfología y se ha demostrado que los RET más inmaduros son liberados a sangre periférica durante periodos de estimulación eritropoyética. Actualmente, con el uso de la citometría de flujo, es posible identificar a estas poblaciones y esto ha permitido realizar estudios analizando a esta población celular. Uno de los primeros estudios reportó que en individuos que padecen anemia existe un incremento en la frecuencia de RET jóvenes circulantes (Watanabe y col., 1994).

Se ha establecido que la anemia se relaciona frecuentemente con la desnutrición (Van den Broeck, 1995) y ésta podría ser uno de los factores que estimulan la producción de RET en los dos grupos de niños desnutridos analizados en este estudio, ya que se ha reportado que en casos de anemia crónica, el número de RET circulantes es mayor debido a que la anemia se acompaña siempre de un estímulo eritropoyético compensador (Nawawy, 2002). Los datos de este estudio demuestran que los niños con desnutrición muestran alteraciones hematológicas, que podrían relacionarse o interpretarse como una adaptación al estado patológico que el organismo experimenta, fenómeno conocido como homeorexis (Amador y col., 1985; Ramos y col., 1986).

Del mismo modo, el aumento en el porcentaje de RET en los niños bien nutridos infectados en comparación con los bien nutridos sin infecciones, podría

deberse precisamente a la presencia de la infección. Un reporte reciente demostró que durante una infección se incrementa la población de RET en bazo (Jackson y col., 2010), esto podría estar sucediendo en el caso de los niños bien nutridos con infecciones analizados en el presente estudio. Del mismo modo se ha demostrado que los niños hospitalizados, como es el caso de los niños de este estudio, por padecer infecciones agudas graves presentan anemia (Jansson y col., 1986). En relación a esto, como se sabe, los eritrocitos son producidos en la médula ósea y son liberados al torrente sanguíneo; el equilibrio entre la producción y liberación se mantiene por un complejo mecanismo de retroalimentación. Algunos patógenos o cambios ambientales extremos pueden alterar este equilibrio, matando prematuramente las células rojas o bien liberando eritrocitos inmaduros (RET) como mecanismo de compensación (Savill y col., 2009).

Con relación a los trabajos sobre el material genético en desnutrición, estudios previos realizados en organismos desnutridos, han demostrado incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Armendares y col., 1971; Betancourt y col., 1979; Alu y col., 1993), intercambio de cromátidas hermanas (Betancourt y col., 1986; Ortiz y col., 1994, Ortiz y col., 2011), incremento en la frecuencia de MN (Ortiz y col., 1995) y daño al ADN (Betancourt y col., 1995; Cortés y col., 2001).

En particular el ensayo de MN se ha establecido como un método confiable para analizar *in vivo* daño cromosómico y es utilizado por muchos investigadores para monitorear la integridad del ADN después de la exposición a agentes tóxicos o bien después de someter a organismos a una deficiente nutrición (Ofer y col., 2004). En humanos, el bazo remueve de la circulación sanguínea a los eritrocitos con MN, sin embargo, diversos investigadores han demostrado que los RET representan una población celular adecuada para realizar el ensayo de micronúcleos por citometría de flujo (MacGregor y col., 2006; Dertinger y col., 2007; Hotchkiss y col., 2008).

La evaluación del daño citogenético usando el ensayo de MN es una importante herramienta para estudiar la asociación entre la nutrición y el daño al ADN (Mateuca y col., 2006). Se considera importante incluirlo en los estudios

citogenéticos, ya que proporciona información adicional y complementaria a la obtenida con el análisis de AC y de la frecuencia de ICH. Además, es un método altamente sensible, relativamente fácil de realizar y con un significado biológico claro. Con respecto al análisis del daño génico, los resultados mostraron que los niños BNI presentaron un incremento significativo (2.45 veces) en la frecuencia de RET-MN en comparación con los BN. Este aumento en el porcentaje de RET-MN parece estar asociado a la presencia de infección ya que ambos grupos de niños se encuentran bien nutridos, por lo tanto se deduce que la infección induce daño cromosómico. Estos datos concuerdan con reportes previos, en los cuales se demostró que niños con infecciones gastrointestinales o respiratorias mostraron mayor susceptibilidad a la inducción de MN por Mitomicina C (Ortiz y col., 1997).

Con respecto a la determinación del tipo de MN, los datos del presente estudio muestran que en los cuatro grupos de estudio, la frecuencia de RET-MN de tipo aneugénico, es muy baja. Esto podría reflejar, que en los niños incluidos en este estudio, la cadena de ADN sufrió rupturas que no pudieron ser reparadas y por lo tanto se generaron MN de tipo clastogénico.

En relación a lo anterior, se ha reportado que el rompimiento de la cadena de ADN tiene como consecuencia la formación de MN de tipo clastogénico (Fenech y col, 2011). El rompimiento de la cadena de ADN podría estar relacionado con la presencia de algunas ERO como el $\bullet\text{OH}$ que es un radical muy reactivo que tiene la capacidad de abstraer átomos de hidrógeno de la molécula de ADN, así como de pegarse a las bases formando aductos, lo que provoca una diversidad de daños (Medeiros, 2008).

El aumento en la frecuencia de MN, observado en los niños BNI, podría deberse a alteraciones en el metabolismo celular que incrementa los niveles de agentes tóxicos endógenos, o a moléculas liberadas por el agente infeccioso que podrían producir daño genético en el huésped (D'Souza y Das, 1994). Los niños que se analizaron en este estudio presentaban infecciones de tipo respiratorio o gastrointestinal, como se mostró en la tabla 1. En relación a esto, estudios epidemiológicos han revelado que la mayoría de las infecciones gastrointestinales de tipo bacteriano, que padecen niños de países en vías de desarrollo, son

provocadas por *V. cholera* y *E. coli* (Rodríguez y col., 2011). Particularmente, se ha demostrado que *E. coli* produce enterotóxicas que tienen efecto citotóxico (Kurioka y col., 1999; Matise y col., 2000). También se ha demostrado que estas enterotóxicas interfieren con la síntesis de proteínas e inhiben la reparación del ADN (Brigotti y col., 2002; Sestili y col., 2005).

Asimismo se ha reportado que algunas enzimas bacterianas pueden actuar como DNAsas y de esta forma provocar rupturas en el ADN de la célula huésped (Ahuja, 1991). En relación a esto último, se ha documentado que *Streptococcus pneumoniae* produce una ADN recombinasa que toma cadenas sencillas de ADN de la célula huésped y las incorpora en el ADN bacteriano. Este proceso genera inestabilidad en el ADN del huésped lo que provoca rupturas de cadenas sencillas (Steffen y Bervant, 2000), lo cual podría estar relacionado con el incremento en el porcentaje de RET-MN observado en el grupo de niños bien nutridos con infecciones. Del mismo modo, el daño observado como mayor frecuencia de MN, puede asociarse con la producción de radicales libres por las células inmunocompetentes, esto como resultado de la respuesta inmunológica desencadenada para combatir la infección (Ames y col., 1993). Por todo lo anterior, los datos del presente estudio demuestran que las infecciones tienen un efecto deletéreo en la estabilidad genómica de los niños que presentan infecciones respiratorias y/o gastrointestinales bacterianas, ya que los niños bien nutridos infectados presentaron mayor frecuencia de RET-MN. En relación a los niños desnutridos, los datos muestran que el grupo DESMI presenta menor frecuencia de RET-MN en comparación con el grupo de niños DESGI, sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar las frecuencias de RET-MN de los niños BN con las de los dos grupos de niños desnutridos, se observó un incremento significativo en estos últimos. El grupo DESMI mostró un incremento de 3.7 veces y los DESGI un incremento de 5.9 veces en la frecuencia de RET-MN. Del mismo modo, cuando se comparó al grupo de niños BNI con el grupo DESMI, se observó un incremento significativo de 1.5 veces y este aumento fue mayor al compararlos con el grupo DESG el cuál mostró un incremento de 2.4 veces en relación al grupo BNI.

Por lo tanto, los datos del presente estudio concuerdan y complementan reportes previos. En un estudio realizado con linfocitos de sangre periférica de niños bien nutridos y desnutridos con infecciones, se encontró un incremento en la frecuencia de MN inducida por mitomicina C en las células provenientes de los niños desnutridos (Ortiz y col., 1997). De igual modo, se ha demostrado que ratas a las cuales se induce la desnutrición por competencia de alimento, presentan una elevada frecuencia de RET-MN, lo cual indica que existe incremento en el daño citogenético en estos organismos (Ortiz y col., 2004; Ortiz y col., 2011).

Previamente, Dertinger y col. (2003) establecieron una frecuencia basal de RET-MN en adultos sanos de 0.09%. Nuestros datos no coinciden con este valor, pero es importante mencionar que en niños no se ha reportado un valor basal de la formación de estas estructuras. Sin embargo, Maluf y col. (2001) evaluaron la frecuencia de MN en niños sanos y niños con síndrome de Down. Los valores reportados por estos autores mostraron en niños sanos una frecuencia de MN de 0.45%.

Se ha establecido que el daño al ADN en células de niños desnutridos puede estar relacionado con diversos factores, entre ellos la ingesta y absorción insuficiente de vitaminas, de micronutrientes como el folato y el zinc; así como con el estrés oxidante (Agudelo y col, 2006).

Específicamente, se ha demostrado una íntima relación entre el contenido de proteínas y la cantidad de zinc en los alimentos, por lo que la ingesta insuficiente de proteínas, frecuentemente causa la deficiencia de este micronutriente indispensable (Wapnir, 2000). Este micronutriente es esencial para el adecuado funcionamiento de muchas enzimas, además está involucrado en diferentes procesos metabólicos, en los que se incluyen la síntesis de ADN y ARN, de tal forma que su carencia puede favorecer la función deficiente de enzimas implicadas en la síntesis y reparación del ADN (Kovacic y col., 2000; Muller, 2005). De igual forma, han reportado que la depleción de zinc, el cual es un cofactor en distintas vías de reparación del ADN, incrementa la ruptura de cadenas sencillas de ADN (Song y col., 2009).

Anteriormente se demostró, que en general, los organismos desnutridos presentan deficiencia de zinc (Brewster y col., 1997), por lo que podría estar estrechamente relacionado con la mayor frecuencia de RET-MN en sangre periférica de niños desnutridos observada en este estudio.

El incremento en la frecuencia de RET-MN en los niños desnutridos de este estudio, podría deberse también a la deficiencia de folato, previamente se ha reportado que su carencia, propicia la incorporación de uracilo a la cadena de ADN, lo cual genera inestabilidad y favorece el rompimiento de esta molécula, hecho que se ve reflejado en la formación de MN (Macgregor y col., 1997). Esto también fue demostrado por Fenech y col. (1999) quienes reportaron que la deficiencia de ácido fólico provoca daño genético debido a rompimientos en la cadena del ADN.

Por otro lado, la coenzimas dependientes de folato se requieren para la síntesis *de novo* de los nucleótidos que serán usados para la replicación del ADN y para la metilación de esta molécula. De tal forma, que si existe una deficiencia de folato habrá un efecto deletéreo en la estabilidad genómica (Stover, 2004).

Otra posible causa de que en los niños desnutridos se observe mayor frecuencia de RET-MN, podría ser que se ha establecido que la desnutrición calórico proteica va acompañada de deficiencia de vitaminas C, E y D. Previamente se demostró que la deficiencia en estas vitaminas causa oxidación del ADN, daño cromosómico y rompimiento de doble cadena de ADN (Chatterjee, 2001; Halliwell, 2001; Claycombe, 2001). Los datos de este estudio indican que la desnutrición provoca daño al ADN, además se observó que al aumentar el grado de desnutrición existió mayor frecuencia de RET-MN, lo que estaría reflejando una relación con la gravedad del padecimiento. Debido a que los niños con desnutrición grave e infecciones presentan la mayor frecuencia de RET-MN y al existir diferencia significativa al compararlos con el grupo de los niños BNI, se infiere que la desnutrición y la presencia de infecciones podrían causar alteraciones a nivel citogenético en los niños desnutridos.

El incremento en la formación de RET-MN en los niños con desnutrición, también podría estar relacionado con el hecho de que los agentes infecciosos, en

este caso de tipo bacteriano, desencadenan en el organismo una respuesta inmunológica, lo cual incrementa la concentración de radicales libres (Ames y col., 1993). Previamente, se ha reportado que en organismos que padecen desnutrición, los sistemas antioxidantes son deficientes; esto provoca una excesiva acumulación de ERO, lo cual a su vez genera daño al ADN (Ball y col., 1998; Ashour y col., 1999; Fang, 2002).

Por lo tanto, si los niños con desnutrición no presentan una respuesta antioxidante eficiente, se puede generar daño oxidante con el consecuente rompimiento de la cadena de ADN (Sies, 1986; Ames y col., 1993).

En el caso del ADN nuclear se cree que el hierro juega un papel importante en el daño oxidante. La presencia de los grupos fosfato en el ADN, le confieren una carga sustancialmente negativa, de modo que los cationes metálicos como el Na^+ , el K^+ , y los iones de hierro y cobre pueden unirse al ADN (Medeiros, 2008). De esta forma, si el H_2O_2 generado por la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$, llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando el $\cdot\text{OH}$ que ataca en ese mismo lugar al azúcar o a la base correspondientes, produciendo rupturas en la hebra y modificaciones en las bases (Tuma, 2001).

Las alteraciones generadas por estas ERO van desde modificaciones oxidantes conducentes a mutaciones puntuales y pérdida de fragmentos polinucleotídicos, hasta ruptura de cadenas o pérdida total o parcial de cromosomas (Simic, 1994).

Por otro lado, existen reportes de que en niños con desnutrición grave las concentraciones séricas de moléculas antioxidantes se encuentran marcadamente bajas, por lo que se ha establecido una relación directa entre la desnutrición grave y la deficiencia de micronutrientes antioxidantes (Enwonwn y col., 2001).

Diferentes autores han reportado que la concentración de GSH en plasma de niños con desnutrición grave es baja en comparación con los niños bien nutridos. Esta menor concentración de GSH induce un estado de estrés oxidante, lo cual provoca daño al ADN por oxidación y esto favorece el rompimiento de la molécula de ADN con la subsiguiente formación de MN de tipo clastogénico (Becker y col., 1995; Lehartz y col., 1998; Reid, 2000; Golden, 2002). De igual

forma, se ha reportado una disminución en la actividad de la SOD en niños con desnutrición grave (Thakur y col., 2004). Otros estudios han confirmado que los niños con desnutrición tipo marasmo muestran sistemas antioxidantes poco eficientes (Catal y col., 2007).

Es importante mencionar que un incremento en la frecuencia de MN está asociado con el riesgo de desarrollar en un futuro algún tipo de cáncer (Lal y col., 2011). Se ha reportado que la mayoría de los tumores sólidos muestran una gran cantidad de aberraciones cromosómicas complejas. La adquisición de inestabilidad genómica, es una condición que predispone a las células a acumular mutaciones estables, este hecho representa el primer evento en el proceso de carcinogénesis. Con respecto a este punto, Bonassi y col. (2011), reportan que en pacientes con diferentes tipos de cáncer muestran un incremento significativo de MN en comparación con pacientes sanos.

En relación a los eritrocitos con MN, los resultados muestran que los niños BN presentan baja frecuencia de E-MN. Al comparar la frecuencia de E-MN de los niños BN con los BNI, se observó un incremento de 1.25 veces en la frecuencia de E-MN en comparación con los BN sin infecciones. Esto indica nuevamente, que las infecciones que padecen los niños de este estudio, inducen daño al ADN, detectado por la presencia de MN. También, los niños con desnutrición e infecciones asociadas, presentan un incremento de 1.75 para los DESMI y de 3.5 veces para los DESGI en comparación con los niños bien nutridos sin infecciones, es decir, las infecciones y la desnutrición provocan un aumento en la frecuencia de E-MN. Al comparar al grupo de niños BNI con el grupo DESGI, se observó incremento significativo de 2.8 veces ($p \leq 0.05$), también, se observó diferencia entre los grupos DESMI y DESGI (incremento de 2 veces) ($p \leq 0.05$). Este aumento está relacionado con la desnutrición, ya que los tres grupos de niños presentan infecciones y son los niños con desnutrición grave los que presentaron mayor frecuencia de eritrocitos con MN. Por lo tanto podemos considerar que la desnutrición, en asociación con las infecciones, son factores que inducen daño citogenético cuando se padecen por largos períodos de tiempo.

En humanos, la frecuencia de E-MN en sangre periférica puede ser usada como un índice de daño genético en las células precursoras de eritrocitos en la médula ósea, aunque los E-MN sean removidos por el bazo (Schreinemachers y Everson, 1991). Sin embargo, los E-MN no son removidos de sangre periférica cuando el bazo no tiene una función adecuada (Smith y col., 1990). En relación a esto, se ha demostrado que en organismos desnutridos tanto el bazo como la médula ósea se encuentran severamente atrofiados (Borelli y col., 2007). Esta atrofia podría relacionarse con la pérdida de la función del bazo, que consiste en la filtración de E-MN o elementos senescentes de la sangre (Leuenberger y Sartori, 2010). La elevada frecuencia de E-MN observada en los niños desnutridos, incluidos en este estudio, podría relacionarse con esta pérdida de funcionalidad del bazo, sin embargo, en este estudio no se realizaron análisis que permitieran evaluar la funcionalidad del bazo.

Por otro lado, en relación a la determinación del tipo de MN, los datos del presente estudio muestran que en los cuatro grupos de estudio, la frecuencia de E-MN de tipo aneugénico, es muy baja, lo cual estaría reflejando que en los niños incluidos en este estudio, la cadena de ADN sufrió rupturas que no pudieron ser reparadas y por lo tanto, se generaron MN de tipo clastogénico.

El daño al ADN en células de niños desnutridos puede deberse a varios factores, entre ellos, una respuesta antioxidante deficiente que permita que ciertas ERO interactúen con el ADN y provoquen su ruptura (Jain, 2008), generándose de este modo MN de tipo clastogénico. En relación a esto, se ha reportado que en organismos que padecen desnutrición, los sistemas antioxidantes son poco eficientes (Granot y col., 2001; Granot y col., 2004; Ciliberto y col., 2005).

Cuando las ERO se encuentran por encima de ciertos niveles, el balance oxidantes/antioxidantes se pierde y es entonces cuando algunas ERO pueden atacar a lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN. Esto genera daño como lipoperoxidación e incluso ruptura de la cadena de ADN (Jain, 2008), lo cual podría resultar o reflejarse en la formación de MN.

Con respecto al argumento de que una respuesta antioxidante deficiente puede incidir sobre el daño oxidante al ADN, existen datos consistentes de que la

concentración de moléculas antioxidantes en niños tipo kwashiorkor, se encuentran disminuidas, lo cual genera un estado de estrés oxidante, que podría desembocar en el daño al ADN por oxidación (Becker y col. 1995; Lehhartz y col. 1998). En diversos estudios se ha observado que en niños con desnutrición grave las concentraciones de GSH en plasma y sangre total se encuentran especialmente bajas, este hecho se relaciona con daño a las membranas celulares, y probablemente al ADN (Reid, 2000; Golden, 2002).

El hecho de que existan ERO en exceso, capaces de interactuar con el ADN, refleja que existe estrés oxidante, el cual es consecuencia de una respuesta antioxidante poco adecuada o disminuida. Bajo este razonamiento, es que, en este trabajo se propuso medir el daño oxidante en niños desnutridos para tener un panorama general de la respuesta antioxidante. Existen diversos marcadores de estrés oxidante, como la medición de la lipoperoxidación y la evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes, que permiten interpretar el estado redox de niños sanos o con alguna patología como la desnutrición.

Para medir el daño oxidante en los niños incluidos en este estudio, se utilizó el ensayo de hemólisis, que da un panorama general de la respuesta antioxidante en un organismo, pues al agregar AAPH se generan radicales libres y se propicia la lipoperoxidación de la membrana del eritrocito. Si este fenómeno no se detiene a tiempo, por acción de la respuesta antioxidante, la membrana del eritrocito se “rompe” y la hemoglobina de los eritrocitos se libera. La liberación de la Hg da una medida indirecta del daño ocasionado por la adición del AAPH y los eventos desencadenados. En relación a esto, se encontró que los niños del grupo DESGI mostraron un incremento significativo en la lipoperoxidación ($p \leq 0.05$) de 2.2 veces en relación a los BNI, mientras que el incremento no significativo en comparación con BN fue de 1.5 veces. Del mismo modo, el grupo DESMI mostró un incremento significativo de 1.6 veces en comparación a BNI y una disminución significativa de 1.3 veces comparación con los DESGI.

Estos resultados, indican que los niños del grupo DESGI presentan mayor lipoperoxidación y por ende, mayor daño oxidante, el cual podría estar relacionado con una respuesta antioxidante deficiente. Estos resultados concuerdan con

Vertogen y col. (1981), que encontraron que los eritrocitos de niños con desnutrición grave tratados con un agente oxidante, mostraban un alto porcentaje de hemólisis, lo cual era un indicador de una respuesta antioxidante pobre.

Así mismo, Sive y col. (1993) reportaron que los niveles de lipoperoxidación estaban significativamente elevados en niños con desnutrición grave tipo kwashiorkor en comparación con niños tipo marasmo. Dentro de sus conclusiones sugirió que la capacidad antioxidante se encuentra más abatida en niños tipo kwashiorkor que en los niños tipo marasmo, siendo la primera, la manifestación clínica más agresiva.

Por otro lado, Tatli y col. (2000) y Catal y col. (2007), midieron la lipoperoxidación en niños bien nutridos y con desnutrición grave tipo marasmo. Los autores reportaron que en los niños desnutridos se encuentran niveles altos de malondialdehído, que es un producto de la lipoperoxidación de la membrana celular. En base a este hallazgo, concluyeron que los niños con desnutrición sufrían mayor daño oxidante en comparación con niños sanos y que esto, era consecuencia de la acción de sistemas antioxidantes poco eficientes.

Como ya se ha mencionado, la respuesta antioxidante en un organismo está compuesta por sistemas enzimáticos, captadores de radicales libres o "scavengers (Bast y col., 1991; Martínez y col., 2006) y quelantes de metales de transición (Souki y col., 2007). Dentro del sistema de defensa antioxidante enzimático se encuentran la SOD y GPx.

La SOD neutraliza al $O_2^{\cdot-}$ dando como resultado la formación de H_2O_2 . Por otro lado, GPx elimina hidroperóxidos utilizando GSH como agente reductor. La GPx dependiente de selenio, elimina tanto los peróxidos de hidrógeno como los hidroperóxidos lipídicos, reduciéndolos a ácidos grasos hidroxilados (Ríos, 2003). Durante la oxidación univalente del oxígeno, estas dos enzimas, al neutralizar al $O_2^{\cdot-}$ y al H_2O_2 , estarían impidiendo la formación del $\cdot OH$, que, como ya se ha mencionado, es una ERO capaz de interactuar con el ADN oxidándolo y favoreciendo su ruptura.

Por otro lado, la actividad enzimática de SOD y de GPx en eritrocitos es mayor en comparación con otros tejidos del cuerpo, por lo que se ha establecido

que la medición de sus actividades pueden ser marcadores importantes para conocer el estado de la respuesta antioxidante del organismo (Tatli y col., 2000). Con respecto a la actividad de SOD, los resultados muestran que los niños DESMI y DESGI presentan un decremento significativo ($p \leq 0.05$) de 1.1 y 1.4 veces, respectivamente, en comparación con los niños BN y BNI.

En relación a la actividad de GPx, se observó que los grupos DESMI y DESGI mostraron un decremento significativo ($p \leq 0.05$) de 1.4 y 2.1 veces, respectivamente, en comparación con el grupo BNI. Estos datos indican que los niños con desnutrición, ya sea moderada o grave, presentan una respuesta antioxidante deficiente.

Nuestros datos correlacionan con lo reportado por Kocaturk y col. (2002), quienes encontraron una baja actividad de SOD en niños con desnutrición cuando fueron comparados con niños sanos. De igual manera, Vertogen y col. (1981) encontraron niveles bajos de GPx y SOD en niños con desnutrición grave. Estos resultados dieron la pauta para proponer la hipótesis de que la depleción de elementos como el hierro, el cobre y el zinc observada en organismos desnutridos, podrían ser responsables de la actividad disminuida de estas enzimas.

Por otro lado, en otro estudio se reportaron resultados similares, posteriormente, después de someter a los niños a terapia nutricional en la cual se incluía la ingesta de antioxidantes, se encontró que GPx y SOD mostraban actividades normales. Por lo cual los autores sugieren que los antioxidantes pueden ser introducidos durante la terapia nutricional para elevar la eficiencia de la respuesta antioxidante y abatir los índices de morbilidad y mortalidad en los niños con desnutrición (Shaaban y col. 2002).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se estudiaron niños con desnutrición grave tipo marasmo y tipo kwashiorkor que presentaron alteraciones en el estado redox. Se desconoce por qué unos niños desarrollan marasmo y otros kwashiorkor como expresión extrema de la desnutrición. Según la teoría clásica, la desnutrición tipo kwashiorkor se debe a una deficiencia de proteínas, en particular la presencia de hipoalbuminemia, la cual disminuye la presión oncótica y propicia la salida del líquido extracelular. Por otro lado, Gopalan (1968) reportó

que el consumo de proteínas no difiere entre los niños con marasmo y kwashiorkor. Posteriormente, otros investigadores encontraron que la hipoalbuminemia no explica en todos los casos la aparición del edema (Golden y col., 1980; Golden, 1982). En 1987, Golden y Ramdath proponen a las ERO como agentes que conducen hacia el kwashiorkor, desde entonces son varias las evidencias que han permitido implicar al estrés oxidante como factor etiológico (Rodríguez y col., 2007).

Diversos estudios han reportado un aumento del riesgo de estrés oxidante en niños con desnutrición edematosa (tipo kwashiorkor) por tener mayores concentraciones de hierro libre en plasma y depósitos aumentados de este metal en hígado y médula ósea (Sive y col., 1996; Sive y col., 1997; Ashour y col., 1999). El hierro libre en los sistemas biológicos genera ERO por autooxidación con el oxígeno molecular y participa en reacciones (Kruszewski, 2003) que inducen la formación de $\bullet\text{OH}$, el cual puede iniciar la lipoperoxidación (Emerit y col., 2001).

Por otro lado, Ashour y col. midieron la capacidad antioxidante en niños con desnutrición grave, tomando como indicador la actividad de SOD, GPx y concentración de ceruloplasmina. Así mismo, midieron los niveles plasmáticos de Cu, Zn y Se. Se encontró que la actividad de GPx, así como los niveles de ceruloplasmina, Cu y Se, estaban especialmente bajas en estos niños. No así la actividad de SOD, la cual, junto con las concentraciones de Zn se vieron incrementadas. Estas alteraciones mostraban que los niños con desnutrición están sometidos a estrés oxidante (Ashour y col., 1999).

Por otro lado, en un estudio realizado en niños con desnutrición grave tipo kwashiorkor y tipo marasmo, se encontró que las concentraciones de catalasa (CAT) y SOD son similares en ambas manifestaciones clínicas, mientras que las concentraciones de GPx y GSH se encuentran dramáticamente disminuidas en los niños tipo kwashiorkor (Sive y col., 1993). La actividad de SOD en los niños DESGI se encontró especialmente disminuida. Este hecho podría estar relacionado con la disponibilidad de metales como el zinc y el cobre. En relación a esto, se ha documentado que en niños con marasmo las concentraciones séricas de cobre son especialmente bajas y que éstas se relacionan directamente con la

actividad disminuida de la enzima, sin embargo, su eficiencia se restablece cuando los pacientes reciben terapia nutricional con cobre (Tatli y col., 2000).

Tomando en cuenta este hecho, diversos autores han medido los niveles de Zn y Cu en niños con desnutrición grave y se han encontrado niveles especialmente bajos. Esta disminución podría a su vez, estar relacionada con la baja actividad de SOD, lo cual podría verse exacerbado por la recurrencia de infecciones respiratorias y gastrointestinales, ya que estas patologías se relacionan significativamente con niveles séricos bajos de Zn y Cu (Rice y col., 2000).

Por otro lado, la hipoproteinemia, la anemia y la presencia de diarrea por infecciones gastrointestinales en niños desnutridos, también están asociadas con una baja concentración de estos metales, por lo que se puede establecer que la deficiencia de estos elementos influye en la eficiencia de la respuesta antioxidante y en las patologías asociadas a la desnutrición (Thakur, 2004; Jain y col., 2008).

Es importante recalcar que los organismos desnutridos son susceptibles a infecciones oportunistas, en particular los niños con desnutrición moderada y grave de este estudio presentaron infecciones de tipo bacteriano. Estas infecciones asociadas con una respuesta antioxidante poco eficiente forman un círculo que deteriora cada vez más a los organismos desnutridos (Chandra, 1996). Las infecciones bacterianas, de tipo respiratorio o gastrointestinal, activan la respuesta inmunitaria, lo cual incrementa las concentraciones de ERO (Ahuja, 1991; Ames y col., 1993) y debido a que en niños con desnutrición las concentraciones séricas de moléculas antioxidantes se encuentran especialmente bajas, el cuadro se agrava aún más.

Durante el curso de una infección, la fuente principal de ERO son los fagocitos del sistema inmunitario. Al encontrarse con un agente infeccioso, las células polimorfonucleares y los macrófagos experimentan un aumento del consumo de glucosa y oxígeno llamado “estallido respiratorio” (Beard, 2001). Dicho consumo ocurre principalmente en la membrana plasmática donde el complejo enzimático NADPH oxidasa, se activa y produce ERO a partir del oxígeno basal y electrones derivados de la vía de las pentosas (Bellavite, 1988,

Morel y col., 1991). Como se mencionó previamente, estas ERO contribuyen a la destrucción o inactivación del agente infeccioso.

Por otro lado, Granot y col. (2001), reportaron que la elevada concentración de ERO y una respuesta antioxidante deficiente estaban relacionadas con la desnutrición y la diarrea. El efecto negativo de la diarrea sobre el estado nutricional del organismo ha sido ampliamente reconocido, ya que numerosos investigadores han reportado que los periodos prolongados de diarrea afectan la absorción de macronutrientes y micronutrientes, posiblemente debido a que el intestino ha perdido su capacidad de absorción (Wapnir, 2000).

Una vez más, uno de los micronutrientes más estudiados dentro de esta problemática es el zinc, ya que su deficiencia acarrea consecuencias serias sobre la integridad de la respuesta antioxidante y del ADN. Diferentes reportes han reforzado la idea que se tenía acerca de la relación entre la desnutrición calórico proteica, la deficiencia de zinc y la diarrea (Prasad y col., 1993; 1998). Esta relación generalmente favorece la deficiencia de zinc, lo cual a su vez provoca que los organismos sean más susceptibles a las toxinas producidas por enterobacterias (Wapnir, 2000). Estas toxinas son capaces de activar la adenilato y guanilato ciclasas, que como consecuencia estimulan la secreción de ácido clorhídrico, produciendo diarrea y disminuyendo la absorción de nutrientes, generándose así un círculo vicioso entre los episodios de diarrea y la desnutrición (Wapnir, 2000). Se ha reportado que en niños con diarrea persistente los niveles séricos de zinc son especialmente bajos, los cuales a su vez se correlacionan inversamente con la duración de estos episodios diarreicos (Black, 1998). El zinc también está relacionado con la protección contra radicales libres, ya que este micronutriente es un constituyente de la SOD, por lo que las bajas concentraciones de este micronutriente también genera daño oxidativo al ADN (Leung, 1998; Wapnir, 2000). En adición se ha reportado una disminución de la actividad de la SOD en niños con desnutrición calórico proteica grave que presentan concentraciones séricas bajas de cobre (Thakur y col. 2004).

Finalmente, en relación a la alta frecuencia de MN de origen clastogénico, en todos los niños incluidos en el estudio, también podría argumentarse que su

generación tiene relación con la baja actividad de SOD exhibida por estos niños, pues se ha documentado que esta enzima tiene un efecto anticlastogénico. Diversos autores han observado que esta enzima, sola o en combinación con la catalasa produce un decremento en la frecuencia del rompimiento cromosómico inducido por radiaciones en cultivos de linfocitos humanos (Emerit y col., 1996). En este sentido, Brawn y Fridovich (1980) demostraron que cuando la molécula de ADN de *E. coli* era expuesta al sistema xantina-xantina oxidasa y se agregaba SOD, no se producía su rompimiento. Estos autores propusieron que el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 colaboraban en la producción de $\cdot OH$, el cuál causa rompimiento de la cadena de ADN.

Por último, es importante hacer hincapié en el comportamiento de los niños del grupo BNI en relación al daño oxidante y actividad de SOD. Los resultados mostraron que el grupo BNI, mostró un porcentaje de hemólisis menor, así como una actividad mayor de SOD en comparación con el grupo BN. Al ser la SOD la primera enzima en la línea de detoxificación de ERO (específicamente del $O_2^{\cdot-}$), podría estar confiriendo protección contra el daño oxidante a estos niños (BNI), y por esta razón muestran menor daño oxidativo.

Con relación a esto, se ha reportado que en niños que sufren infecciones en amígdalas, la concentración de SOD se encuentra elevada en comparación con niños sanos (Callejo y col., 2002). De igual manera Lee y col. (2000), encontraron que en ratas con infección causada por *Streptococcus pneumoniae*, la expresión de SOD estaba elevada en comparación con ratas control. Estos autores proponen en su trabajo, que SOD juega un papel importante en la protección contra daño oxidante durante el transcurso de la infección. Por otro lado, Zeynep y col., en 2004, reportaron que, en niños con inflamación e infección en las amígdalas, la actividad de SOD se encuentra elevada, y que esta disminuía cuando los niños eran sometidos a amigdalotomía.

El hecho de que los resultados muestren que los niños con desnutrición e infecciones asociadas presentan daño al ADN, lo cual se ve reflejado en la elevada formación de RET-MN de tipo clastogénico, es de especial importancia, ya que en estudios previos se ha demostrado que los sujetos que presentan altas

frecuencias de micronúcleos son más susceptibles a desarrollar cáncer (Bonassi y col., 2000; Mateuca y col., 2006). Por lo que se ha establecido que existe una relación directa entre la frecuencia de MN y estados tempranos de carcinogénesis (Olaharski y col., 2006).

Por otro lado, los MN de tipo clastogénico son el resultado de la ruptura de la cadena de ADN. Esta ruptura puede deberse a su interacción con ERO, las cuales no fueron neutralizadas por sistemas antioxidantes eficientes. En este estudio se demostró que la SOD y GPx muestran actividades bajas en niños con desnutrición e infecciones asociadas. Por lo tanto, si los niños con desnutrición no presentan una respuesta antioxidante eficiente, se puede generar daño oxidativo y rompimiento de la cadena de ADN, generando MN de tipo clastogénico.

11. CONCLUSIONES

- El análisis por citometría de flujo de micronúcleos en RET, es una herramienta útil para evaluar el daño cromosómico *in vivo*.
- Los niños bien nutridos infectados y niños con desnutrición moderada y grave, ambos con infecciones; presentan incremento en la frecuencia de RET-MN en comparación con los niños sin infecciones.
- La desnutrición y las infecciones parecen actuar en conjunto para inducir daño al ADN en los reticulocitos de los niños.
- La desnutrición por sí misma es capaz de inducir daño al ADN, los niños con desnutrición grave presentaron mayor frecuencia de micronúcleos en comparación con los niños bien nutridos y con desnutrición moderada también con infecciones asociadas.
- El tipo de micronúcleos observados en los cuatro grupos de estudio son de tipo clastogénico.
- Los niños con desnutrición moderada y grave, presentan mayor daño oxidante, en comparación con los niños bien nutridos con infecciones.
- Los niños con ambos grados de desnutrición muestran disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx
- La desnutrición tiene un efecto deletéreo en la respuesta antioxidante exhibida por los niños incluidos en este estudio.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abramsson-Zetterberg L., Zetterberg G., Berqvist M., Grawe J. (2000). Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **36**, 22-31.
2. Agudelo G., Cardona O., Velásquez C., Parra B., Acosta M., Morales G., Bernal C., Burgos L. (2006). Concentración sérica de cobre “libre” y ceruloplasmina en niños con desnutrición aguda grave antes de iniciar la terapia nutricional y al momento de recuperar el apetito en Turbo, Antioquia, Colombia. *Revista Chilena de Nutrición*. **33**, 188-197.
3. Ahuja Y.R. (1991). Bacterial infection, restriction endonuclease, genetic damage and cancer. *Biologisches Zentralblatt*. **110**, 179-187.
4. Al-Omar M.A., Beedham C., Alsarra I.A. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defense mechanisms. *Saudi Pharmacology Journal* **12**, 1–18.
5. Alu V., Murthy P.B. (1993). Chromosomal abnormalities in starved and marginally malnourished rats and in utero upon rehabilitation. *Experientia*. **49**, 258–262.
6. Amador M., Hermelo M. (1985). Cambios fisiopatogénicos durante la evolución de la desnutrición proteico-energética: IV; homeorresis / Physiopathogenic changes during evolution of protein-energy malnutrition: IV; homeorrhesis. *Revista Cubana de Pediatría*. **57**, 629-648.
7. Ames B.N. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Radicals Research Communications*. **7**, 3-6.
8. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **90**, 7915-7922.
9. Armendares S., Salamanca F., Frenk S. (1971). Chromosome abnormalities in severe protein calorie malnutrition. *Nature*. **232**, 271-273.
10. Aruoma O.I., Halliwell B., Mahmood N., Burke A., Greenspan H.C. (1996). Characterization of Drugs as Antioxidant Prophylactics. *Free Radical Biology*

and Medicine. **20**, 675-705.

11. Ashour M., Salem S., El-Gadban M., Elwan M., Basu K. (1999). Antioxidant status in children with protein-energy malnutrition (PEM). Living in Cairo, Egypt. *European Journal of Clinical Nutrition*. **52**, 669-673.
12. Avila A., Shamah T., Galindo G., Rodríguez G., Barragán L. (1998). La desnutrición infantil en el medio rural mexicano: resultados de una encuesta probabilística. *Salud Pública de México*. **40**, 150-160.
13. Avello M., Suwalsky M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. **494**, 161-172.
14. Ball A.M., Sole M.J. (1998). Oxidative stress and the pathogenesis of heart failure. *Cardiology Clinics*. **16**, 665-675.
15. Barja G. (1997). Los radicales libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad de envejecimiento. *Revista Española de Gerontología y Geriátria*. **31**: 153-161.
16. Barrera L., Drago M., Pérez J., Zamora A., Gómez F., Sainz T., Mendoza F. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. **17**, 42-55.
17. Bast A., Haenen M., Doelman J. (1991). Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*. **91**, 2-13.
18. Baynes JW. (2005). Oxygen and life. In: Baynes J.W., Domoniczak M.H., editors. *Medical Biochemistry*. Philadelphia: Elsevier. pp. 497–506.
19. Beard J.L. (2001). Biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *Journal of Nutrition*. **131**, s568-s580
20. Becker K., Leichserring M., Gana L., Bremer H., Schimer R.H. (1995). Glutathione and associated antioxidant system in protein energy malnutrition: results of a study in Nigeria. *Free Radical Biology and Medicine*. **18**, 257-263.
21. Bellavite P. (1988). The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. **4**, 225-261.
22. Benítez A.H. (2009). Servicio de Hematología del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

23. Bermúdez A. (2001). Xantina oxidasa: Estrés oxidativo. En Biomedicina. Libro electrónico. Ed. Biomed-CECAM. La Habana. Cuba.
24. Betancourt M., Hernández G., Cravioto J. (1979). Essential aminoacids deficiency and the production of chromosomal anomalies. *Revista de Investigación Clínica*. **31**, 45-52.
25. Betancourt M., Balvanera P., Ortiz ,R. (1986). Frequency of sister-chromatid exchange (SCE) in bone-marrow cells of severely malnourished animals during early life. *Mutation Research*. **175**, 29-31.
26. Betancourt M., Ortiz R., González C., Pérez P., Cortés L., Rodríguez L., Villaseñor L. (1995). Assessment of DNA damage by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutation Research*. **331**, 65-77.
27. Bhaskaram P. (1992). Nutritional modulation of immunity to infection. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. **35**, 392-340.
28. Black R.E. (1998). Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood disease in developing countries. *Journal of the American College of Nutrition*. **68**, 476S-479S.
29. Bonassi S., Hagmar L., Stromberg U., Huici-Montagud A., Tinnerberg H., Forni A., Heikkilä P., Wanders S., Wilhardt P., Hansteen I.L., Knudsen L., Norppa H. and the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*. **60**, 1619–1625.
30. Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., Fenech M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutation Research*. **26**, 93-100.
31. Borelli P., Blatt S., Pereira J., de Maurino B.B., Tsujita M., de Souza A.C., Xavier J.G., Fock R.A. (2007). Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *British Journal of Nutrition*. **97**, 307-314.
32. Boveris A. (1998). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicine*. **58**, 350-356.

33. Brawn K., Fridovich I. (1980). Superoxide radical and superoxide dismutase. Threat and defense. *Acta Physiologica Scandinavica Supplement*. **492**, 9-18.
34. Brent J.A, Rumack B.H. (1993). Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury. *Free Radical Biochemistry and Clinical Toxicology*. **31**, 139-71.
35. Brewster D.R., Manary M.J., Menzies I.S., Henry R.L., O'Loughlin E.V. (1997). Comparison of milk and maize based diets in kwashiorkor. *Archives of Disease in Childhood*. **76**, 242–248.
36. Brigotti M., Alfieri R., Seatili P., Bonelli M., Petronini P.G., Guidarelli A., Barbieri I., Stirpe F. , Sperti S. (2002). Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. **16**, 365-372.
37. Brown K.H. (2003). Diarrhea and malnutrition. *Journal of Nutrition*. **133**, 328S-332S.
38. Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. **58**, 79-110.
39. Cammerer Z., Elhajouji A., Kirsch-Volders M., Suter W. (2007). Comparison of the peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to aneugens after single-dose applications. *Mutagenesis*. **22**, 129-134.
40. Campanozzi A., Russo M., Catucci A., Rutigliano I., Canestrino G., Giardino I., Romondia A., Pettoello-Mantovani M. (2009). Hospital-acquired malnutrition in children with mild clinical conditions. *Nutrition*. **25**, 540-547.
41. Cárdenas-Rodríguez N., Medina-Campos O, Pedraza-Chaverrí J. Glutathión peroxidadas: Una familia de enzimas. En *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Konigsberg M. 2008.Ed. Manual Moderno. México, D.F. pp.201-205.
42. Cascales M. (2005). La paradoja de la aerobiosis ¿Por qué es tóxico el oxígeno? En línea: <http://www.racve.es/actividades/detalle/id/326>.
43. Cashat-Cruz M., Morales J.J., Mendoza M.(2005). Respiratory tract infections in children in developing countries. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. **16**, 84-92.

44. Catal F., Avci A., Karadag A., Alioglu B., Avci Z. (2007). Oxidant and antioxidant status of Turkish marasmic children: a single center study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **21**, 108-112.
45. Chandra K. R. (1996). Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **93**, 14304-14307.
46. Chatterjee M. (2001). Vitamin D and genomic stability. *Mutation Research*. **475**, 69-87.
47. Church D.F., Pryor W.A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environmental Health Perspective*. **64**, 111–126.
48. Ciliberto H., Ciliberto M., Briend A., Ashorn P., Bier D., Manary M. (2005). Antioxidant supplementation for the prevention of kwashiorkor in Malawian children: randomized, double blind, placebo controlled trial. *Journal of Molecular Biology*. doi:10.1136/bmj.38427.404259.8F.
49. Cimen Y.M. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. **390**, 1–11.
50. Cisneros E. (1995). La glutati3n reductasa y su importancia biom3dica. En l3nea: [http:// bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol14_1_95/ibi03195.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol14_1_95/ibi03195.htm).
51. Comporti M., Signorini C., Buonocore G., Ciccoli L. (2002). Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radical Biology and Medicine*. **32**, 568–576.
52. Cort3s E., Gonz3lez C., Betancourt M., Ortiz R. (2001). Assessment of DNA Damage in Spleen, Bone Marrow and Peripheral Blood from Malnourished Rats by Single Cell Gel Electrophoresis Assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. **21**, 231–247.
53. Claudio N., Louis J.I. (2003). Nitric Oxide–Releasing Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **43**, 97-123.
54. Claycombe K.J., Meydani S.N. (2001). Vitamin E and genomic stability. *Mutation Research*. **475**, 37-44.

55. Dertinger S., Tourus D., Tometsko C. (1996). Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutation Research*. **371**, 283-292.
56. Dertinger S., Tourus D., Hall N., Tometsko C., Gasiewicz T. (2000). Malaria-infected erythrocytes serve as biological standards to ensure reliable and consistent scoring of micronucleated erythrocytes by flow cytometry. *Mutation Research*. **464**, 195-200.
57. Dertinger S.D., Chen Y., Miller R.K., Rewer K.J., Smudzin T., Tourus D.K., Hall N.E., Olvany K., Murante F.G., Tometsko C.R. (2003). Micronucleated CD71-positive reticulocytes: A blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. *Mutation Research*. **542**, 77-85.
58. Dertinger S.D., Bishop M.E., McNamee J.P., Hayashi M., Suzuki T., Asano N., Nakajima M., Saito J., Moore N., Tourus D.K. (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: Intra -and inter-laboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicological Sciences*. **94**, 83-91.
59. Dertinger S.D., Miller R.K., Brewer K., Smudzin T., Tourus D.K., Roberts D.J., Avlasevich S.L., Sunugan S., Chen, Y. (2007). Automated human blood micronucleated reticulocyte measurements for rapid assessment of chromosomal damage. *Mutation Research*. **626**, 111-119.
60. Dertinger S.D., Tourus D.K., Hayashi M., MacGregor J.T. (2011). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform assessing *in vivo* cytogenetic damage. *Mutation Research*. **26**, 139-145.
61. D'Souza D., Das B.C. (1994). Genotoxic effects of *Mycobacterium leprae* infection in humans. *Mutation Research*. **305**, 211-222.
62. Dumaswala U.J., Zhuo L., Jacobsen D.W., Jain S.K., Sukalski K.A. (1999). Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radical Biology and Medicine*. **27**, 1041-1049.
63. Dumaswala U.J., Zhuo L., Mahajan S. (2001). Glutathione protects chemokine scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *American Journal of Physiology Cell-Physiology*. **280**, 867-873.

64. Dunn L.L., Rahmanto Y.S., Richardson D.R. (2007). Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cell Biology*. **17**, 93–100.
65. Durak I, Karaayvaz M, Cimen M. (2001). Aspirin impairs antioxidant system and causes peroxidation in human erythrocytes and guinea pig myocardial tissue. *Human and Experimental Toxicology*. **20**, 34–37.
66. Emerit I., Garban F., Vassy J., Levy A., Filipe P., Freitas J. (1996). Superoxide-mediated clastogenesis and anticlastogenic effects of exogenous superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **93**, 12799-12804.
67. Emerit J., Beaumont C., Trivin F. (2001). Iron metabolism, free radicals and oxidative injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **55**, 333-339.
68. Enríquez-Rincón F. (2007). Inmunidad innata. En microbiología e inmunología. IPN. México. En línea: www.direval.ipn.mx.
69. Enwonwo C.O., Sanders C. (2001). Nutrition: impact on oral and systemic health. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*. **22**, 12-18.
70. Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**. 872-879.
71. Faruque A.S., Ahmed A.M., Ahmed T., Islam M.M., Roy S.K., Alam N., Kabir I., Sack D.A. (2008). Nutrition: basis for healthy children and mothers in Bangladesh. *Journal of Health, Population and Nutrition*. **26**, 325-339.
72. Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E. and Bonassi S. (1999). The HUMN Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*. **428**, 271-283.
73. Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. **2**, 1084 – 1104.
74. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan AT., Surralles J., Crott J. W., Parry J. Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. **26**, 125–132.
75. Freeman B.A., Grapo J.D. (1982). Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*. **47**, 412-426.

76. Gaetani G.F., Galiano S., Canepa L., Ferraris A.M., Kirkman H.N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*. **73**, 334–339.
77. Giulivi C., Daviess K.J.A. (1990). A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. **265**, 19453–19460.
78. Giulivi C., Davies K.J. (2001). Mechanism of the formation and proteolytic release of H₂O₂-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in haemoglobin and red blood cells. *Journal of Biology Chemistry*. **276**, 24129–24136.
79. Golden M.H., Golden B.E., Jackson A.A. (1980). Albumin and nutritional oedema. *Lancet*. **1**, 114-116.
80. Golden M.H.N. (1982). Transport proteins as indices of protein status. *American Journal of Clinical Nutrition*. **35**, 1159-1165.
81. Golden M.H., Ramdath D. (1987). Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **465**, 53-68.
82. Golden M.H. (2002). The development of concepts of malnutrition. *The American Society for Nutritional Sciences*. 2117S-2122S.
83. Gómez F., Ramos-Galván R., Frenk S., Cravioto J. M., Chávez R., Vázquez J. (1956). Mortality in second and third degree malnutrition. *Journal of Tropical Pediatrics*. **2**, 77-83.
84. Gómez F., Ramos-Galván R., Frenk S., Cravioto J.M., Chávez R., Gómez F. (2003). Desnutrición y Salud Pública de México. **45**, S576-S582.
85. Gómez L.E., Cuevas D.B. Superóxido Dismutasa. En *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Konigsberg M. 2008.Ed. Manual Moderno. México, D.F. pp. 170-179.
86. Gopalan C. (1968). Kwashiorkor and marasmus: Evolution and distinguishing features. En McCance R.A., Widdowson E., editors. *Calorie deficiencies*. London. pp. 48.

87. Granot E., Binsztok M., Fraser D., Deckelbaum R. J., Weizman Z. (2001). Oxidative stress is not enhanced in non-malnourished infants with persistent diarrhea. *Journal of Tropical Pediatrics*. **4**, 284-287.
88. Granot E., Kohen R. (2004). Oxidative Stress in Childhood. In Health and Disease States. *Clinical Nutrition*. **23**, 3-11.
89. Grawé J., Zetterberg G., Amnéus H. (2005). Flow-cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Cytometry Parta. Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. **13**, 750-758.
90. Gray V.B., Cossman J.S., Powers E.L. (2006). Stunted growth is associated with physical indicators of malnutrition but not food insecurity among rural school children in Honduras. *Nutrition Research*. **26**, 549-555.
91. Guerrant R.L., Oriá R.B., Moore S.R., Oriá M.O., Lima A.A. (2008). Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutrition Reviews*. **66**, 487-505.
92. Gunduz K., Ozturk G., Sozmen E.Y. (2004). Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and plasmanitrite and nitrate levels in patients with Behçet disease and recurrent aphthous stomatitis. *Clinical and Experimental Dermatology*. **29**, 176–179.
93. Halliwell B. (2001). Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research*. **475**, 29-35.
94. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed 4. Clarendon Press, Oxford. USA.
95. Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. **141**, 312-322.
96. Hamasaki K., Imai K., Hayashi T., Nakachi K., Kusunoki Y. (2007). Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: Frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body X-irradiated BALB/c and C57BL/6 mice. *Cancer Science*. **98**, 1849-1844.
97. Han T.H., Qamirani E., Nelson A.G. (2003). Regulation of nitric oxide consumption by hypoxic red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **100**, 12504–12509.

98. Hebbel R.P., Eaton J.W., Balasingam M., Steinberg M.H. (1982). Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*. **70**, 1253–1259.
99. Hernández D. (2003). Desnutrición infantil y pobreza en México. Serie de cuadernos de Desarrollo Humano. Secretaría de Desarrollo Social.
100. Hotchkiss C.E., Bishop M.E., Dertinger S.D., Slikker W., Moore M.M., Macgregor J.T. (2008). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: as index of chromosomal damage in the rhesus mionkey (*Macaca mulatta*). *Toxicological Sciences*. **102**, 352-358.
101. <http://biofisica.blogspot.com/2011/05/reacciones-de-oxido-reduccion.htm>
102. <http://dispace.uah.es>
103. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Nutrición. 2006. México.
104. Jackson A., Nanton M.R., O'Donnell H., Akue A.D., McSorley S.J. (2010). Innate immune activation during *Salmonella* infection initiates extramedullary erythropoiesis and splenomegaly. *Journal of Immunology*. **185**, 6198-6204.
105. Jain A., Varma M., Agrawal B.K., Jadhav A.A. (2008). Serum zinc and malondialdehyde concentrations and their relation to total antioxidant capacity in protein energy malnutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **54**, 392-395.
106. Jansson L.T., Kling S., Dallman P.R. (1986). Anemia in children with acute infections seen in a primary care pediatric outpatient clinic. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. **5**, 424-427.
107. Jelliffe D. (1985). Nutrición infantil en países en desarrollo. Edit. Limusa, México, D.F, 95-126.
108. Johnson R.M., Goyette Jr. G., Ravindranath Y., Ho Y.S. (2005). Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. **39**, 1407–1417.
109. Kaler G.S. (2008). Diseases of Poverty with High Mortality in Infants and Children: Malaria, Measles, Lower Respiratory Infections, and Diarrheal Illnesses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1136**, 28–31.

110. Kennett E.C., Ogawa E., Agar N.S., Godwin I.R., Bubb W.A., Kuchel P.W. (2005). Investigation of methaemoglobin reduction by extracellular NADH in mammalian erythrocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **37**, 1438–1445.
111. Krawinkel M. (2003). Kwashiorkor is still not fully understood. *Bulletin of The World Health Organization*. **81**, 910-911.
112. Kocaturk P.A., Siklar Z., Kavas G.O., Dallar Y., Tanyer G. (2002). Zinc treatment affects superoxide dismutase activity in growth retardation. *Biology of Trace Elements Research*. **90**, 39-46.
113. Konigsberg M. Cadena respiratoria mitocondrial. En *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas*. Konigsberg M. 2008. Manual Moderno. México, D.F. pp. 50-57.
114. Kovacic P., Beevar L.E. (2000). Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electrotransfer. *Current Pharmaceutical Design*. **6**, 143-167.
115. Kruszewski M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research*. **531**, 81-92.
116. Kurioka T., Yunou Y., Harada H., Kita E. (1999). Efficacy of Antibiotic Therapy for Infection with Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Mice with Protein-Calorie Malnutrition. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **1**, 561–571.
117. Lal A., Ames N.B. (2011). Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. *Mutagenesis*. **26**, 57-62.
118. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiology and Biochemistry*. **15**, 195–202.
119. Lenhartz H., Ndasi R., Anninos A., Bottcher D., Mayatepek E., Tetanye E., Leischsenring M. (1998). The clinical manifestation of the Kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. *Journal of Pediatrics*. **132**, 879-881.

120. Leung F. (1998). Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition. *Journal of Nutrition Biochemistry*. **9**, 304-307.
121. Leuenberger M., Sartori C. (2010). The spleen: between mysteries and discoveries. *Revue Medicale de la Suisse Romande*. **6**, 2080-2082, 2084-2085.
122. Lu S. (2000). Regulation of glutathione synthesis. *Current Topics of Cellular Regulation*. **36**, 95-116.
123. MacGregor J.T., Werh C.M., Hiatt R.A., Peters B., Tucker J.A., Langlois R.G., Jacob R.A., Jensen R.H., Yager J.W., Shigenaga M.K., Frei B., Eynon B.P., Ames B.N. (1997). "Spontaneous" genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutation Research*. **377**, 125-135.
124. MacGregor J.T., Bishop E.M., McNamee P.J., Hayashi M., Asano N., Wakata A., Nakajima M., Saito J., Aidoo A., Moore M.M., Dertinger D.S. (2006). Flow Cytometric Analysis of Micronuclei in Peripheral Blood Reticulocytes: II. An Efficient Method of Monitoring Chromosomal Damage in the Rat. *Toxicological Sciences*. **94**, 92–107.
125. Maluf W.S., Erdtmann B. (2001). Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. **124**, 71–75.
126. Martínez G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas de oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*. **39**, 1-11.
127. Martínez S. M., Andrés B. D., Zubiliaga M., Hager H., De Paoli T., Boccio J. (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. **4**, 1-7.
128. Masella R., Benedetto R., Vary R., Filesi C., Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **16**, 577–86.

129. Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I., Kirsch-Volders M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. **88**, 1515–1531.
130. Matise I., Sirinarumitr T., Bosworth B.T., Moon H.W. (2000). Vascular ultra-structure and DNA fragmentation in swine infected with Shiga toxin-producing *E. coli*. *Veterinary Pathology*. **37**, 318-327.
131. Maxwell A.J. (2002). Mechanisms of Dysfunction of the Nitric Oxide Pathway in Vascular Diseases. *The Journal of Biological Chemistry*. **6**, 101-124.
132. Medeiros M. Daño al ADN. En *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Konigsberg M. 2008.Ed. Manual Moderno. México, D.F. pp.120.
133. Medina H. (2005). Efecto de la desnutrición y de fármacos sobre la frecuencia y tipo de micronúcleos en eritrocitos de rata. UAM-Iztapalapa. México, D.F.
134. Molina .C. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*. En línea: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar.
135. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*. **43**, 109-143.
136. Morel F., Doussiere J., Vignais P.V. (1991). The superoxide –generating oxidase of phagocytes cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *European Journal of Biochemistry*. **201**, 523-246.
137. Müller O., Krawinkel M. (2005). Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Medical Association Journal Articles*. **173**, 279-286.
138. Nawawy A., Barakat S., Elwalily T., Abdel- Moneim D.A., Hussein M. (2002). Evaluation of erythropoiesis in protein energy malnutrition. *Eastern Mediterranean Health Journal*. **882**, 281-289.
139. Ofer T., Ho E., Traber G.M., Bruno S.R., Kuypers A.F., Ames N.B. (2004). A simple assay for frequency of chromosome breaks and loss (micronuclei) by

- flow cytometry of human reticulocytes. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **19**, 485-487.
140. Olaharski A.J., Sotelo R., Solorza-Luna G., Gonsebatt M.E., Guzman P., Mohar A., Eastmond D. (2006). Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis, *Carcinogenesis*. **27**, 337–343.
141. Oliva M., Muñoz P., Valls V., Iradi A., Catala C. Drehmer E., Saez G. (1997). Radicales libres y modificación oxidativa del ADN. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana. En *Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo*. Real Academia de Farmacia. España. pp. 127-156.
142. Ortiz R., Campos C., Gómez J.L., Espinoza M., Ramos-Motilla M., Betancourt M. (1994). Sister-chromatid exchange (SCE) and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition (PCM). *Mutation Research*. **312**, 33–37.
143. Ortiz R., Cortés E., González C., Pérez L., Betancourt M. (1995). Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **26**, 55-59.
144. Ortiz R., Cortés L., González C., López L., Pérez P., Cortés E., Betancourt M. (1997). Analysis of Mitomycin C-Induced Micronuclei in Lymphocytes from Malnourished Infected Children. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **30**, 363–370.
145. Ortiz R., Medina H., Rodríguez L., González-Márquez H., Cortés E. (2004). Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **43**, 179-185.
146. Ortiz R., Medina H., Cortés E., Cervantes E., Rodríguez L. (2011). Trimethoprim-Sulfamethoxazole increase micronuclei formation in peripheral blood from weanling well-nourished and malnourished rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **52**, 673-680.
147. Ozawa T. (1995). Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Experimental Gerontology*. **30**, 269-290.

148. Padula G., Salceda S.A., Seoane A.I. (2009). Protein-energy malnutrition contributes to increased structural chromosomal alteration frequencies in Argentinean children. *Nutrition Research*. **29**, 35-40.
149. Padula G., Seoane A.I. (2008). Chromosomal effects of infections in malnourished and eutrophic children of Gran La Plata. *Journal of Basic Applied Genetics*. **19**, 248-252.
150. Padula G., Salceda S.A., Seoane A.I. (2009). Protein-energy malnutrition contributes to increased structural chromosomal alteration frequencies in Argentinean children. *Nutrition Research*. **29**:35-40.
- 151.
152. Parra-Gómez L., Reyes T. G., Escobar B. (2003). La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*. **46**, 32-36.
153. Prasad A.S., Fitzgerald J.T., Hess J.W., Kaplan J., Pelen F., Dardenne M. (1993). Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition*. **9**, 218-224.
154. Prasad A.S. (1998). Zinc and immunity. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **188**, 63-69.
155. Qian S.Y, Buettner G.R. (1999). Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radical Biology and Medicine*. **26**, 1447–1456.
156. Ramos-Galván,R. (1976). Somatometría pediátrica. *Archivos de Investigación Médica (México)*. **6**, 1.
157. Ramos R.R.M., Serrano S.C. (1986). Homeorrhexis in 3 Indian groups of Mexico: changes in height and body composition. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. **43**, 599-611.
158. Reid M., Badaloo A., Forrester T., Morlese F.J., Frazer M., Heird W., Jahoor F. (2000). In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in children with severe protein-energy malnutrition. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. **278**, E405-E412.

159. Rice A., Sacco L., Hyder A., Black R. (2000). Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious disease in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*. **78**, 1207-1221.
160. Ríos M. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*, **2**, 1-10.
161. Richter Ch., Park J.W., Ames B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **85**, 6465-6467.
162. Rodríguez L., Cervantes E., Ortiz R. (2011). Malnutrition and Gastrointestinal and Respiratory Infections in Children: A Public Health Problem. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **8**, 1174–1205.
163. Rodríguez C.M., Sosa B., Mira G., Ochoa G., Henao O., Parra C., Herrera L., Acosta M. (2007). Hierro libre, transferrina y ferritina séricas en desnutrición aguda grave. *Annales de Pédiatrie (Barcelona)*. **66**, 17-23.
164. Sauerwein R., Mulder J, Mulder L., Lowe B., Peshu N. (1997). Inflammatory mediators in children with protein energy malnutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. **65**, 1534-1539.
165. Sarrasague M., Barrado D., Zubillaga M., Hager A., Paoli T., Boccio J. (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. **40**, 45-54.
166. Savill N.J., Chadwick W., Reece S.E. (2009). Quantitative analysis of mechanisms that govern red blood cell age structure and dynamics during anaemia. *PLoS Computational Biology*. **5**, e1000416.
167. Schreinemachers D.M., Everson R.B. (1991). Effect of residual splenic function and folate levels on the frequency of micronucleated red blood cells in splenectomized humans. *Mutation Research*. **263**, 63-67.
168. Scott M.D., Eaton J.W., Kuypers F.A., Chiu D.T., Lubin BH. (1989). Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense. *Blood*. **74**, 2542–2549.

169. Scott M.D., Zuo L., Lubin B.H., Chiu D.T. (1991). NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Blood*. **77**, 2059–2064.
170. Sereebutra P., Solomons N., Aliyu M.H., Jolly P.E. (2006). Sociodemographic and environmental predictors of childhood stunting in rural Guatemala. *Nutrition Research*. **26**, 75-60.
171. Sestili P., Alfieri R., Carnicelli D., Martinelli C., Barbieri I., Bonelli M., Petronini P.G., Brigotti M. (2005). Shiga toxin1 and ricin inhibit repair of H₂O₂ induced DNA single strands breaks in cultured mammalian. *DNA repair*, **4**, 271-277.
172. Shaaban S.Y., Nassar M.F., Ibrahim S.A., Mahmoud S.E. (2002). Impact of nutritional rehabilitation on enzymatic antioxidant levels in protein energy malnutrition. *East Mediterranean Health Journal*. **8**, 290-297.
173. Sharda B. (2006). Free radicals: emerging challenge in environmental health in childhood and neonatal disorders. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **3**, 286-291.
174. Shils M.E., Olson J.A., Moshe S. (1999). *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins: 1999.
175. Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W. (1996). Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Research*. **56**, 2161–2166.
176. Shimizu N. (2011). Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis*. **26**, 119–123, 2011
177. Sies H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International*. **25**, 1058-1071.
178. Simic M.G. (1994). DNA markers of oxidative processes in vivo: Relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Research*. **54**, 1918s-1923s.
179. Sive A.A., Subotzky E.F., Malan H., Dempster W.S., Heese H.D. (1993). Red Blood cell antioxidant enzyme concentrations in kwashiorkor and marasmus. *Annals of Tropical Pediatrics*. **13**, 33-38.

180. Sive A.A., Dempster W.S., Rosseau S., Kelly M., Malan H., Heese H.D. (1996). Bone marrow and chelatable iron in patients with protein energy malnutrition. **86**, 1410-1413.
181. Sive A.A., Dempster W.S., Rosseau S., Kelly M., Malan H., Heese H.D. (1997). Plasma free iron: a possible cause of oedema in kwashiorkor. *Archives of Diseases in Childhood*. **76**, 54-56.
182. Smith D.F., MacGregor J.T., Hiatt R.A. (1990). Micronucleated erythrocytes as an index of cytogenetic damage in humans: demographic and dietary factors associated with micronucleated erythrocytes in splenectomized subjects. *Cancer Research*. **50**, 5049-5054.
183. Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Floy R.A., Markesbery W.R. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **88**, 10540-10543.
184. Song Y., Leonard S.W., Traber M.G., Ho E. (2009). Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *Journal of Nutrition*. **139**, 1626-1631.
185. Souki A., Cano C., Mengual E., García D., Torres D., Almarza J., Urdaneta Y., Chávez Z., Molero E., Medina M., Amell A. (2007). Marcadores biológicos de estrés oxidativo. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. **26**, 97-97.
186. Steffen S.E., Bervant F.R. (2000). Purification and characterization of the RecA protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **382**, 303-309.
187. Stopper H., Hempel K., Reiners C., Vershenya S., Lorenz R., Vukicevic V., Heidland A., Grawe J. (2005). Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring. *Toxicology Letters*. **156**, 351-360.
188. Stover P.J. (2004). Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutrition Research*. **62**, S3-S12.

189. Snyder L.M., Fortier N.L., Trainor. (1985). Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *Journal of Clinical Investigation*. **76**, 1971–1977.
190. Tatli M., Huseyin V., Koc A., Kosecik M., Atas A., Atas Ali. (2000). Altered anti-oxidant status increased lipid peroxidation in marasmic children. *Pediatrics International*. **42**, 289-292.
191. Thakur S., Gupta N., Nakkar P. (2004). Serum copper and zinc concentrations and their relation to superoxide dismutase in severe malnutrition. *European Journal of Pediatrics*. **163**, 742-744.
192. Telen M.J., Kaufman R.E. (1999). The mature erythrocyte. In: Greer JP, Foerster J, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 217–247.
193. Torous D., Dertinger S., Hall N., Tometsko C. (1998). An automated method for discriminating aneugen- vs. Clastogen-induced micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **31**, 340-344.
194. Torous D., Hall N., Murante F., Gleason S., Tometsko C., Dertinger S. (2003). Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy. *Toxicological Sciences*. **74**, 309-314.
195. Tuma R. (2001). The two faces of oxygen. *Science of Aging Knowledge Environment*. 1-5.
196. Uauy R. (2008). Determinantes, Prevalencia y consecuencias de la malnutrición a corto plazo (muertes y carga de enfermedad). *Serie de artículos sobre Malnutrición Lancet 2008*. 1-6.
197. Van den Broeck J. (1995). Malnutrition and mortality. *Journal of the Royal Society of Medicine*. **88**, 487-490.
198. Vázquez G. E. (1998). Diagnóstico del estado nutricional en la infancia. *Acta Pediátrica de México*. **19**, S1-S10.
199. Vega-Franco L. (1999). Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteico-energética. *Salud pública de México*. **41**, 328-333.

200. Venereo J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. **31**,126-133.
201. Vertongen F. Heyde-Bruckner C., Fondu P., Mandelbaum I. (1981). Oxidative haemolysis in protein malnutrition. *Clinica Chimica Acta*. **116**, 217-22.
202. Volpe E.P. (1993). Blood and circulation. In: Dubuque WmC, editor. *Biology and Human Concerns*. Dubuque: Wm.C.Brown Publishers. pp. 253–265.
203. Wapnir R. (2000). Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition*. **130**, 1388S-1392S.
204. Watanabe K., Kawai Y., Takeuchi K., Shimizu N., Iri H., Ikeda Y., Houwen B. (1994). Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *Clinical Pathology*. **47**, 736-739.
205. Weitzel F., Ursini F., Wendel A. (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1036**, 88-94.
206. Wilmore D. (1990). Pathophysiology of the hypermetabolic response to burn injury. *Journal of Trauma*. **30**, S84-S90.
207. Witt K.L., Livanos E., Kissling G.E., Torous D.K., Caspary W., Tice R.R., Recio L. (2008). Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals. *Mutation Research*. **649**, 101-113.
208. Wu G., Fang Y., Yang S., Lupron J., Turner N. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*. **134**, 489- 492.
209. Young S.I., Woodside V.J. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. **54**, 176-186.
210. Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. **28**, 227-236.