T
502

90859

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

"EVALUACIÓN EN LINFOCITOS DE NIÑOS DEL DAÑO AL ADN PRODUCIDO POR LA DESNUTRICIÓN CALÓRICO-PROTEICA SEVERA, LAS INFECCIONES Y LOS MEDICAMENTOS"

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Presenta

MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ TORRES

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

Junio 2002

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la
Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el
Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT
y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo,
con el Convenio PFP-20-93.

El jurado designado por las

Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud

de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ TORRES

El día 14 de Junio del año 2002

Comité Tutorial:

Tutora: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Asesor: Dr. Mario Altamirano Lozano

Asesor: Dr. José Miguel Betancourt Rule

Sinodal: Dra. Sara Frías Vázquez

Sinodal: Dr. Víctor Mendoza

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Comité Tutorial:

Tutora: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Asesor: Dr. Mario Altamirano Lozano

Asesor: Dr. José Miguel Betancourt Rule

DEDICATORIAS

A la memoria de mis dos Franciscos:

Francisco González Santillán, mi padre

y

Francisco González Torres, mi hermano

Su recuerdo estará siempre conmigo.

A David, mi queridísimo hijo. Eres sin duda alguna lo mejor que la vida me ha dado.

A Ramón, mi compañero de tantos años. Te amo.

A TODA mi familia y muy especialmente a mis sobrinos:
Maru, Oscar, Angel, Mario, Paulina, Jimena, Omar, Rodrigo, Mariana y Arely
A quienes deseo lo mejor en la vida.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Celular:
Rocío, Miguel, Oralia, Lety, Reyna, Yvonne, Edith, Mundo, Eduardo, Ernesto, Leo, Irma, Humberto
Sinceramente ha sido un privilegio el conocer y trabajar con personas como ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz, a quien considero un ejemplo de tenacidad y constancia. Gracias por tantas horas de trabajo compartidas.

A la Dra. Guadalupe Toledo del Hospital Infantil Xochimilco D.D.F. y a la Dra. Laura López del Hospital Infantil Iztapalapa D.D.F., por su colaboración para la obtención de las muestras.

A Oralia Nájera por su entusiasta apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Miguel Betancourt y al Dr. Mario Altamirano, por formar parte de mi Comité Tutorial. A la Dra. Sara Frías y al Dr. Víctor Mendoza, les agradezco haber aceptado revisar mi trabajo de tesis. Para los cuatro toda mi admiración.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por el apoyo que me brindó para concluir mi doctorado.

Y.....aún cuando resulte trillado.....

A la vida, que me ha dado tanto.....

INDICE

CONTENIDO	PÁGINAS
RESUMEN	**1**
ABSTRACT	**5**
1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	**8**
1.1 Desnutrición	**8**
1.2 Infecciones	**17**
1.3 Medicamentos	**18**
1.4 Ensayo cometa: detección de daño y reparación del ADN	**20**
2. OBJETIVO GENERAL	**25**
2.1 Objetivos particulares	**25**
3. HIPÓTESIS	**27**
4. MATERIALES Y METODOS	**28**
4.1 Evaluación del daño basal presente en el ADN en los tres grupos de estudio: niños bien nutridos (BN), niños bien nutridos infectados (BN-I) y niños desnutridos (DES)	**29**
4.1.1 Características de los niños estudiados	**29**
4.1.2 Aislamiento de linfocitos	**33**
4.1.3 Electroforesis unicelular	**33**
4.2 Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BNI-T y DES-T)	**34**
4.2.1 Características de los niños bien nutridos infectados	**34**
4.2.2 Características de los niños con desnutrición severa	**36**

4.3 Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en los niños BN, BN-I Y DES 37

4.3.1 Características de los niños en los que se evaluó la reparación del ADN 38

4.4 Análisis de datos 38

5. RESULTADOS 40

5.1 Evaluación del daño basal presente en el ADN en los tres grupos de estudio: niños bien nutridos (BN), niños bien nutridos infectados (BN-I) y niños desnutridos (DES) 40

5.1.1 Longitud de las estelas y coeficiente de dispersión 40

5.1.2 Porcentaje de células con daño y proporción de células con daño bajo, medio y alto 43

5.2 Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BNI-T Y DES-T) 46

5.2.1 Longitud de las estelas, coeficiente de dispersión, porcentaje de células con daño y proporción de células con daño bajo, medio y alto antes del tratamiento con medicamentos 46

5.2.2 Longitud de las estelas, coeficiente de dispersión, porcentaje de células con daño y proporción de células con daño bajo, medio y alto después del tratamiento con medicamentos 48

5.3 Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en linfocitos de niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BN-I) y desnutridos (DES) 51

5.3.1 Niveles de daño antes y después del tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 51

5.3.2 Capacidad reparativa (CR) 55

5.3.3 Coeficiente H 56

6. DISCUSIÓN 59

6.1 Evaluación del daño basal presente en el ADN en los tres grupos de estudio: niños bien nutridos (BN), niños bien nutridos infectados (BN-I) y niños desnutridos (DES) 59

6.2 Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BNI-T Y DES-T) 63

6.3 Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en los niños BN, BN-I Y DES 66

7. CONCLUSIONES 72

8. BIBLIOGRAFIA 73

9. ANEXOS

9.1 Ficha de datos 84

9.2 Soluciones 87

9.2.1 Solución de lisis (Stock) 87

9.2.2 Solución amortiguadora para el corrimiento electroforético 87

9.2.3 Solución amortiguadora para neutralización 87

9.2.4 Solución de bromuro de etidio 88

9.3 Método para evaluar viabilidad 88

10. ARTICULOS PUBLICADOS (Producto de la Tesis) 90

RESUMEN

La desnutrición infantil y las infecciones graves constituyen dos problemas de Salud Pública en México. Ambos padecimientos interactúan frecuentemente debido a que los organismos desnutridos presentan una respuesta inmune disminuida, lo que los hace mas susceptibles a las infecciones y trae como consecuencia que deban ser tratados con diferentes tipos de medicamentos. En algunos estudios se ha establecido que tanto la desnutrición, como algunos tipos de infecciones, al igual que algunos medicamentos pueden inducir daño al ADN. Esto sirvió como base para plantear el presente estudio, en el que se tuvo como objetivo general: Evaluar en linfocitos de niños, por medio de la técnica de electroforesis unicelular, el daño producido en el ADN por la desnutrición calórico-proteica severa, las infecciones graves y los medicamentos mas comúnmente empleados en el tratamiento de éstas, y analizar el efecto de la desnutrición calórico-proteica severa y de las infecciones graves sobre la capacidad de reparación, del daño inducido a esta molécula por el peróxido de hidrógeno.

La técnica de electroforesis unicelular o ensayo cometa ha mostrado ser muy sensible para evaluar el daño al ADN, además de tener ventajas tales como que: requiere una cantidad pequeña de muestra para realizarse, puede evaluar el daño al ADN en células no proliferantes, el análisis se efectúa en células individuales y es además relativamente simple y rápida. Sus características han permitido se le utilice también en estudios de reparación del daño al ADN.

Para la realización del estudio se obtuvieron muestras de sangre de niños de entre uno y cinco años de edad, que fueron incluidos en alguno de los siguientes grupos: **Niños Bien Nutridos (BN)** - (Testigo) Integrado por niños sanos con peso y talla adecuados para su edad cronológica. **Niños Bien Nutridos Infectados (BN-I)** - Integrado por niños con infección grave de vías respiratorias o gastrointestinal grave, que no se encontraban tomando medicamentos al momento de la toma de la muestra, con peso y talla adecuados para su edad cronológica. **Niños Bien Nutridos Infectados con tratamiento (BN-IT)** - Integrado por los mismos niños del grupo anterior, después de un período de hospitalización durante el cual fueron tratados con medicamentos. **Niños Desnutridos**

Infectados (DES-I) - Integrado por niños con desnutrición severa e infección grave de vías respiratorias o gastrointestinal, que no se encontraban tomando medicamentos al momento de la toma de la muestra. **Niños Desnutridos Infectados con tratamiento (DES-IT)** - Integrado por los mismos niños del grupo anterior después de un período de hospitalización y de tratamiento con medicamentos. Las muestras se obtuvieron en los hospitales Infantiles Xochimilco e Iztapalapa del D.D.F.

El trabajo experimental se dividió en tres partes:

I.- Evaluación del daño al ADN en los grupos BN, BN-I y DES-I. Para establecer la influencia de las infecciones y de la desnutrición sobre el daño al ADN.

II.- Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BN-IT y DES-IT).

III.- Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en los niños BN, BN-I y DES-I.

De las muestras de sangre se aislaron los linfocitos, se hicieron los geles, se realizó la electroforesis unicelular y se analizaron las preparaciones en un microscopio de fluorescencia, 50 células por muestra (25 revisadas en dos preparaciones diferentes del mismo niño).

Para establecer la influencia de la desnutrición y de las infecciones sobre el daño al ADN, se estudiaron 12 niños BN, 16 BN-I y 11 DES-I. Para establecer la influencia de los medicamentos sobre el daño al ADN, se tomó una muestra a seis niños bien nutridos y a seis niños desnutridos, ambos infectados, a los que no se les habían administrado medicamentos. A estos mismos 12 niños se les tomó una segunda muestra después de un período de tratamiento con medicamentos en el hospital. Para evaluar la reparación del ADN se utilizaron seis niños BN, seis BN-I y siete niños DES-I. En los linfocitos aislados se indujo daño al ADN utilizando peróxido de hidrógeno.

En todos los casos se determinó el promedio de la longitud de las estelas, el error estándar, el coeficiente de dispersión (coeficiente H) y el número de células dañadas. Adicionalmente para evaluar la reparación del daño inducido al ADN se calculó la llamada capacidad reparativa (CR), que se refiere a la disminución relativa del promedio de la

longitud de las estelas o del porcentaje de células con daño, con respecto al tiempo de reparación. Los resultados obtenidos se compararon utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon y la prueba de X^2 para proporciones. Se consideró diferencia estadística cuando $p<0.05$.

Los resultados permitieron apreciar que la desnutrición y las infecciones graves son dos factores que están relacionados con un incremento del daño en el ADN, lo que se vio reflejado en un incremento en la longitud de las estelas, las que en promedio fueron 7 veces mas largas en los niños BN-I, y 14 veces mas largas en los niños DES-I, en relación con la longitud promedio observada en los niños BN. En los niños BN-I el incremento en la longitud de las estelas estaría relacionado con las infecciones que presentaron asociadas, ya que se ha propuesto que algunas bacterias patógenas pueden inducir daño al material genético. Otro factor que podría incrementar el daño al ADN es estos niños es la liberación de radicales libres que ocurre como parte de la respuesta inmune normal. En los niños desnutridos además de los dos factores antes señalados, la falta de antioxidantes que inactiven a los radicales libres y la deficiencia de proteínas necesarias para la duplicación y/o reparación del ADN podrían contribuir a incrementar el daño observado en esta molécula. También el porcentaje de células con daño se vio aumentado por efecto de las infecciones y de la desnutrición.

En cuanto al efecto de los medicamentos, se observó que después del tratamiento el daño al ADN incrementó tanto en los niños BN-I como en los DES-I. La migración del ADN antes del tratamiento con medicamentos fue dos veces mayor en los niños DES-I (32.6 μm) que en los BN-I (16.5 μm). Después del tratamiento con medicamentos el promedio de las longitudes de las estelas fue nuevamente dos veces mayor en los DES-IT (59.8 μm) al observado en los BN-IT (28.8 μm). De la misma manera el porcentaje de células con daño se vio incrementado en las muestras tomadas después del tratamiento con respecto a lo observado antes del mismo. Los resultados parecen indicar que las células de los niños DES-I fueron mas susceptibles a presentar daño inducido por los medicamentos.

El tratamiento con peróxido de hidrógeno afectó mayormente a las células de los niños BN-I y a las de los DES-I. Al colocar las células a 37°C para permitir la reparación

del daño inducido, y al evaluar las longitudes de las estelas y el porcentaje de células con daño a 5, 15, 30 y 60 minutos de incubación, se observó una disminución progresiva en ambos parámetros, lo que se vio reflejado en la CR que incremento conforme al tiempo de reparación. No obstante, los resultados mostraron que los niños DES-I presentaron una capacidad de reparación inferior a la observada en los dos grupos de niños BN.

Las conclusiones obtenidas del trabajo, son las siguientes:

a) Las infecciones y la desnutrición son dos factores que están relacionados con niveles altos de daño en el ADN.

b) Los medicamentos, aunque necesarios para el tratamiento de las infecciones, pueden inducir efectos colaterales no deseados, tales como aumentar el daño en el ADN.

c) Los linfocitos de los niños DES-I parecen ser mas susceptibles al daño inducido al ADN por los medicamentos.

d) Los datos parecen indicar que las infecciones, la desnutrición y los medicamentos, tienen entre si un efecto sumatorio, que incrementa el daño al ADN.

e) El ADN de los linfocitos de los niños DES-I no presenta una mayor susceptibilidad a ser dañado por el peróxido de hidrógeno.

f) Las infecciones no interfieren con la capacidad de reparación del daño en el ADN de las células de los niños bien nutridos infectados.

g) La capacidad de reparación del daño inducido al ADN en los linfocitos de niños desnutridos está disminuida.

ABSTRACT

Infectious disease and malnutrition in children are public health problems in developing countries. Since malnutrition is associated with an impaired immune response, malnourished children are more susceptible to infection, and therefore must receive antimicrobial therapy. Malnutrition, infections and some agents used for antimicrobial therapy may cause DNA damage. The aim of this study was to assess DNA damage produced by protein-calorie malnutrition, severe infectious disease and by the more used antimicrobial agents in lymphocytes of children. In addition, DNA repair capacity was evaluated by way of the single-cell gel electrophoresis (comet assay) (SCGE).

The comet assay or SCGE is in widespread use in genotoxicity testing. It detects DNA damage derived from DNA double and single strand breaks, DNA interstrand cross-linking, alkali labile sites and completely repaired excision sites. The comet assay is sensitive and simple, requires a small number of cells, can evaluate DNA damage in non proliferating cells, and since the DNA migration data are obtained on a cell by cell basis, it be able to measure the intracellular distribution of DNA damage. Moreover SCGE has been used to assess DNA repair.

Heparinised peripheral blood samples were obtained in the "Hospital Infantil Iztapalapa" and "Hospital Infantil Xochimilco", from children between one and five years old. Children were included in one of the next groups: **Well-nourished children (WN)** – This group included children with no evidence of infection. All had adequate height and weight according to age. **Well-nourished infected children (WN-I)** – In this group were included children hospitalized because of respiratory, gastrointestinal, or urinary bacterial infections, without drug treatment. All had adequate weight/height ratios according to age. **Well-nourished infected children, after a period with drug treatment (WN-IT)** – After a period with drug treatment, a second blood sample was obtained from six children of the preceding group. **Malnourished infected children (MN-I)** – In this group were included children with severe malnutrition, all severely infected. **Malnourished infected children, after a period with drug treatment (MN-IT)** - After a period with drug treatment, a second blood sample was obtained from six children of the preceding group.

Experimental design was divided in three sections:

I. - Assessment of DNA damage in WN, WN-I and MN-I children, this allowed to evaluate DNA damage related to infections and malnutrition.
II. - Assessment of DNA damage related to drugs used in WN-IT and MN-IT children.
III. - Assessment of DNA repair capacity in lymphocytes from WN, WN-I and MN-I, after treatment with hydrogen peroxide.

Lymphocytes were isolated from blood samples, and then used to prepare slides. SCGE was carried out, and fifteen cells per sample were analyzed (25 cells per slide, two slides for each child). Mean tail length, H dispersion coefficient and percentage of damaged cells were determined in each sample. In addition, repair capacity at 5, 15, 30 and 60 minutes was estimated, this parameter is defined as the relative decrease (%) of the DNA migration length after the incubation period. The Wilcoxon's matched-pairs rank and the chi-square tests were used to compare data. Statistical significance was considered when $P<0.05$.

Malnutrition and severe infections are two factors related to higher levels of DNA damage. Mean tail lengths were 7-fold longer in WN-I children and 14-fold longer in MN-I, than in WN children. In WN-I children, this increased damage is related to several factors: free radical increase associated with immune response triggered by bacterial infections, or to toxins released by pathogens. Additionally, in MN-I children, deficiency of free radical scavenging molecules and/or protein deficiency that may alter DNA duplication or DNA repair, may contribute to increase DNA damage. Besides, an increase in the percentage of damaged cells related to infection and malnutrition was observed.

DNA migration length before drug treatment was two times higher in WN-I children than in WN-I. After drug treatment, mean tail length was also two times greater in MN-IT children than in WN-IT. As well, the percentage of damaged cells was increased in samples observed after drug treatment. The data obtained seems to indicate that malnourished children are more susceptible to DNA damage induced by drugs.

After hydrogen peroxide treatment WN-I and MN-I showed higher DNA damage levels, in contrast with WN children. The mean tail lengths and the percentage of damaged cells

decreased progressively as the period of DNA repair at 37°C coursed, this determined that repair capacity increased in all groups studied. Moreover, it was clear that MN-I children showed an impaired DNA repair capacity.

Following conclusions were obtained from this study:

a) Severe infections and malnutrition are two factors associated with increased DNA damage.
b) Drugs used for antimicrobial treatment, although necessary may result in undesirable side effects such as increased DNA damage.
c) Infections, malnutrition and drugs may have an accumulative effect that increases DNA damage.
d) Lymphocytes from MN-I children seem to be more susceptible to DNA damage induced by drugs.
e) MN-I children not showed a greater susceptibility to DNA damage induced by hydrogen peroxide.
f) Infections did not interfere with DNA repair capacity in WN-I children.
g) Repair capacity was clearly decreased in MN-I children, who showed delayed damage repair.

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

La desnutrición infantil y las infecciones graves constituyen dos problemas importantes de salud pública en nuestro país. Diversas observaciones y estudios epidemiológicos indican que existe una estrecha relación entre ambos padecimientos, lo que se demuestra en el hecho de que las enfermedades infecciosas son el factor principal que se asocia con un incremento tanto en la gravedad de la desnutrición, como con la frecuencia de fallecimientos de niños (Kumar et al., 1994). La alta incidencia de ambos padecimientos hace necesario el estudio de los efectos causados por ellos y el tratar de establecer la interacción entre ambos. A estos dos factores se tendría que añadir un tercero, que son los medicamentos mas frecuentemente utilizados en el tratamiento de las infecciones, ya que podrían generar efectos adicionales.

1.1 Desnutrición

La desnutrición es una enfermedad que afecta a aproximadamente un tercio de la población infantil del mundo, principalmente de los países subdesarrollados de Africa, Asia, América Latina y Oceanía (De Onís et al., 1993). Las causas que la originan son dos condiciones sociales: la pobreza y la ignorancia, por lo que la desnutrición se considera una enfermedad de tipo social, que se presenta en las poblaciones que viven en las condiciones mas deplorables, con altas tasas de nacimientos y en las que los niños presentan una alta incidencia de enfermedades infecciosas (Vega, 1998).

Se conoce con el nombre de desnutrición calórico-proteica al conjunto de síntomas y signos clínicos y bioquímicos que se observan principalmente en niños lactantes y preescolares como consecuencia de una ingestión deficiente de nutrientes, o por la utilización de dietas de variados contenidos calóricos, con bajos contenidos de proteínas (Jellife, 1981; Cravioto et al., 1990).

La severidad del padecimiento se establece evaluando el peso y la talla, en comparación con los valores de referencia obtenidos en niños de la misma edad y del

mismo género. Tomando en consideración el peso de los niños, se han delimitado tres grados de desnutrición (Gómez et al., 1956), con características particulares que se describen a continuación:

Desnutrición de Primer Grado (Leve) - Desnutrición que ha afectado por poco tiempo al organismo; el individuo que la padece presenta un déficit de peso corporal de entre el 10 y el 24% del correspondiente para su edad cronológica.

Desnutrición de Segundo Grado (Moderada) - Desnutrición más marcada que la anterior. Déficit de peso del 25 al 39% del promedio correspondiente para la edad del paciente, el cual frecuentemente requiere hospitalización.

Desnutrición de Tercer Grado (Severa) - Las reservas nutricionales del organismo están prácticamente agotadas, el déficit de peso es de más del 40% del promedio correspondiente para la edad. Se presentan serios cambios a nivel somático y funcional e inclusive psicológicos. Los pacientes requieren hospitalización y la tasa de mortalidad para estos, es mucho más elevada que para las dos categorías anteriores.

La desnutrición de tercer grado se puede manifestar en varias formas clínicas: el marasmo, el kwashiorkor (llamado por algunos autores Síndrome Pluricarencial de la Infancia) y el kwashiorkor-marasmático (Behar e Icaza, 1972). Estas variantes presentan en común la detención de la tasa de crecimiento corporal, aunque cada una exhibe características propias (Cravioto et al., 1990).

El marasmo se caracteriza por un desgaste muscular muy marcado y por una actividad física disminuida. El kwashiorkor, incluyendo al kwashiorkor-marasmático, se caracteriza por la presencia de edema masivo en manos y pies, músculos débiles y atrofiados con algo de grasa subcutánea, profunda irritabilidad, anorexia, descamación de la piel, decoloración del pelo e hígado graso.

La desnutrición de tipo marasmo se debe fundamentalmente a una dieta baja, tanto en contenido proteico como en calorías y se presenta comúnmente durante el

primer año de vida (marasmo incipiente), aún cuando llega a observarse incluso en adultos (marasmo tardío) a causa del hambre (Jelliffe, 1981). En general el marasmo predomina en las áreas urbanas en tanto que el kwashiorkor prevalece en las áreas rurales, con tendencia a ser desplazado por el marasmo a medida que disminuye la alimentación al seno materno (Cravioto et al., 1990).

El marasmo se ha descrito como una adaptación metabólica ante una ingesta inadecuada de calorías y proteínas, lo que en primera instancia repercute en la detención del crecimiento del niño y se asocia con pérdida de peso corporal. Una vez que ocurre esta pérdida de peso, los requerimientos nutricionales absolutos en estos niños se reducen, teniendo como base la disminución de la masa corporal total. Adicionalmente los tejidos del cuerpo se adaptan a las carencias nutricionales de manera que utilizan menos energía. En los marasmáticos se ha observado una utilización muy eficiente de los alimentos ingeridos y por otro lado una disminución generalizada de la actividad, tanto a nivel de órganos, tejidos, células, organelos y maquinaria enzimática (Golden, 1988).

Dentro de las disminuciones adaptativas mas importantes, que se han observado en los niños con marasmo, se pueden señalar a las siguientes: disminución en la actividad de la bomba de sodio; reducción en la actividad cardiaca, gástrica y renal total; los pacientes no pueden responder a los cambios de temperatura del ambiente; hay una disminución en la respuesta inmunológica; la disminución en la masa corporal se da de manera diferencial, mientras que en algunos niños la grasa subcutánea al igual que la masa muscular prácticamente desaparecen, el sistema nervioso central se mantiene relativamente bien preservado (Golden, 1988).

El kwashiorkor, palabra de origen africano que significa "enfermedad que aparece cuando se reemplaza a un niño por otro en el pecho materno", es producto por una dieta muy baja en proteínas, pero rica en carbohidratos. Usualmente se presenta entre el primer y tercer año de vida del niño (Jelliffe, 1981). El término kwashiorkor continúa actualmente siendo usado por los clínicos para describir casos con edema, hígado graso y lesiones cutáneas, porque es clínicamente diferente del marasmo, que no presenta estos signos.

Con respecto a la formación del edema en los niños con kwashiorkor se han propuesto dos teorías: La teoría clásica explica que una ingesta inadecuada de proteinas en estos niños conduce a una disminución en la síntesis de albúmina. Se considera que esta hipoalbuminemia es la principal causa del edema, aunque al parecer la deficiencia en potasio, que es común en estos niños, también podría estar relacionada. Una evidencia epidemiológica que apoya la posibilidad de que el edema se genere por una dieta baja en proteinas, es el hecho que el kwashiorkor se presenta en poblaciones en que los productos de consumo general son bajos en proteínas o contienen proteínas de pobre calidad, como el maíz. La otra teoría de la presencia del edema en los kwashiorkor, indica que se forma como consecuencia del daño inducido por radicales libres a las paredes de los capilares o a las membranas celulares (Lenhartz et al., 1998).

Como ya se mencionó, asociado con la presencia del edema se ha encontrado en estos niños al hígado graso, el que se forma como resultado de una falla en el transporte de grasas hacia fuera del órgano, lo que se atribuye a una reducción en la síntesis de apolipoproteína paralela a la de albúmina. Por otra parte, se ha propuesto que el hígado graso puede ser producto de daño inducido por radicales libres (Albrecht y Pelissier, 1995).

Se considera al kwashiorkor como una respuesta metabólica inadecuada ante una ingesta inapropiada de calorías y proteínas. Para que el kwashiorkor se presente, además de las deficiencias nutricionales, se considera necesaria la presencia de otros factores como las infecciones y las toxinas contenidas en alimentos contaminados (Golden, 1988). Se propone que algunas de las manifestaciones clínicas observadas en los niños con kwashiorkor pueden deberse a una elevada concentración de radicales libres en asociación con una disminución en las cantidades de los diferentes antioxidantes (Becker et al., 1995; Albrecht y Pelissier, 1995; Lenhartz et al., 1998).

La relación entre desnutrición y mortalidad infantil ha sido ampliamente investigada (Pelletier et al., 1993). Se ha establecido que la primera es la causa que determina la muerte de aproximadamente el 55% de los niños que mueren entre 1 y 4 años de edad, lo que parece estar relacionado con el hecho de que la desnutrición

deprime la respuesta inmune (Chandra, 1980). Esta inmunodeficiencia aumenta la susceptibilidad de los niños a las infecciones, las que potencialmente pueden agravar la severidad de la desnutrición, ya que promueven un mayor consumo de energía metabólica y a su vez este desgaste nutricional puede contribuir al agravamiento de las infecciones, propiciándose así el establecimiento de un círculo en el que la probabilidad de que los niños mueran se incrementa claramente (Pelletier et al., 1993; Schroeder y Brown, 1994; Yoon et al., 1997). De esta manera, la desnutrición al alterar la respuesta inmune contribuye a que las infecciones tengan una mayor prevalencia y gravedad en los niños desnutridos (Chandra, 1980).

Es importante señalar que las infecciones tienen un papel preponderante en el desencadenamiento de los casos de desnutrición de tercer grado, ya que los individuos con desnutrición de segundo grado e infectados pueden pasar rápidamente a ser casos severos con alto riesgo de mortalidad. Los factores que determinan que la infección agrave a la desnutrición incluyen, la reducción en el consumo de nutrientes debido a la anorexia, la pérdida de nutrientes debido a una absorción intestinal inadecuada o a pérdidas a través de la orina y finalmente a la utilización de las reservas de proteínas en los requerimientos inmunológicos (Albrecht y Pelissier, 1995).

Algunos estudios han mostrado que existe un incremento en el riesgo de muerte de los niños desnutridos al presentar asociada alguna infección de tipo respiratoria o diarrea, o por la coincidencia de ambas en determinado momento. El riesgo de muerte calculado fue de 1.7 veces cuando se presentó infección respiratoria y también de 1.7 para la infección gastrointestinal, mientras que para la combinación de ambas fue de 2.0 veces (Yoon et al., 1997). Otro autor muestra que las infecciones respiratorias son las causantes de una mayor tasa de mortalidad en casos de desnutrición severa, comparativamente con la tasa de mortalidad asociada con las infecciones gastrointestinales (Renaudin,1997). Sin duda, las infecciones bacterianas son uno de los factores mas importantes que incrementan la posibilidad de muerte en niños con DCP (Ekanem et al., 1997).

Contrariamente a lo que se podría pensar, la desnutrición leve y moderada están también asociadas con un riesgo alto de mortalidad (Yoon et al., 1997), ésta asociación tiene gran relevancia considerando que una alta proporción de niños caen en estas categorías (Chen et al., 1980; Trowbridge y Sommer, 1981).

En México, la estimación mas reciente indica que 12.6 millones de niños menores de cinco años son desnutridos, lo que corresponde al 30% de los niños de esta edad (Sepúlveda et al., 1990). En las zonas rurales de México, en 1998 se estableció que el 19.3% de la población de niños menores de cinco años, presentaban desnutrición moderada o severa, lo que la ubica como un problema grave a nivel nacional (Avila-Curiel et al., 1998). Tan sólo en el Estado de Tabasco se apreció que el 46% de los niños entre 1 y 4 años de edad presentan algún grado de desnutrición (29.8% bajo, 12.8% moderado y 3.4 % severa) (Hernández-Martínez y Roldán-Fernández, 1995). Por otro lado, se ha establecido que las causas mas frecuentes de muerte en niños mexicanos menores de cinco años son la diarrea y las infecciones respiratorias agudas (INEGI, 1993).

Se debe mencionar que debido a que raramente en los certificados de defunción de los niños se reporta a la desnutrición como la causa de la muerte, el impacto que ésta tiene sobre la tasa de mortalidad infantil está subestimado. Esto ha causado que la desnutrición tenga un menor impacto en las estadísticas de mortalidad infantil (Orozco et al., 1998).

Para evaluar los efectos causados por la desnutrición se han realizado investigaciones a nivel fisiológico, bioquímico, neurológico e inmunológico, por citar sólo algunos aspectos. Otro de los campos de interés ha sido el genético, en el que se han evaluado las alteraciones del material genético inducidas por la desnutrición, utilizando diversas metodologías. En primer lugar el análisis de aberraciones cromosómicas (AC) en linfocitos de sangre periférica mostró una mayor frecuencia de AC en los niños desnutridos que en los controles eutróficos (Armendares et al., 1971; Betancourt et al., 1972). Sin embargo, en otro estudio similar no se encontró diferencia entre ambos grupos (Khouri y McLaren, 1973).

Posteriormente se estudió el daño genético producido por la DCP, por medio de la evaluación de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), en linfocitos de niños desnutridos. Mutchinick et al. (1979) y González-Torres et al. (1983) no encontraron diferencias entre los niños desnutridos y sus testigos bien nutridos. Pero Murthy et al. (1980) y Ortiz et al. (1994) observaron una frecuencia de ICH significativamente mayor en los linfocitos de los niños desnutridos.

En otro estudio, utilizando la técnica de micronúcleos se observó que la frecuencia basal fue mayor en los niños con DCP en comparación con lo observado en los niños bien nutridos y además los linfocitos de los niños desnutridos mostraron tener una mayor susceptibilidad a ser dañados por la Mitomicina C (Ortiz et al., 1997).

Empleando la metodología de electroforesis unicelular para detectar daño al ADN, se observó que la desnutrición probablemente también está asociada con un incremento en la ruptura de cadenas simples de esta molécula, aunque en el daño detectado también parecieron estar relacionadas las infecciones y los medicamentos (Betancourt et al., 1995).

Para el estudio de los efectos causados por la desnutrición se han utilizado también modelos experimentales con animales de laboratorio, los que tienen como ventajas, el que en ellos es fácil controlar factores extranutricionales tales como las infecciones, que son tan comunes en los niños desnutridos y que podrían enmascarar o alterar los efectos causados por la misma desnutrición. Otra ventaja de los modelos animales es que los estudios pueden realizarse *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.

Algunos estudios del daño inducido por la desnutrición realizados en modelos experimentales, han mostrado una mayor frecuencia de AC en células de médula ósea de ratas desnutridas experimentalmente (Sadasivan y Raghuram, 1973; Vijayalaxmi, 1975). En contradicción con esto, Betancourt et al. (1979) reportan que en el mismo tipo celular, no observaron diferencia en la frecuencia de AC entre ratas bien nutridas y ratas severamente desnutridas.

En células de animales desnutridos Murthy y Srikantia (1981) y Betancourt et al. (1986) observaron una mayor frecuencia de ICH. Posteriormente, se observó que este daño pudo ser revertido, ya que en ratas que primeramente fueron desnutridas durante la lactancia y a las que después se les sometió a un periodo de recuperación nutricional durante 21 días mas, se observaron valores semejantes a los que se obtuvieron en las ratas bien nutridas (Betancourt et al., 1989).

En el laboratorio de Biología Celular de la UAM-I también se han realizado estudios para evaluar el efecto causado por la desnutrición a nivel de la proliferación *in vitro* de los linfocitos de niños desnutridos. Primero se observó que los linfocitos de los niños desnutridos tuvieron un índice de duplicación mayor a las 48 horas de cultivo, lo cual podría deberse a una respuesta más rápida al mitógeno o a una duración menor del ciclo celular (González et al., 1990). Otro estudio, permitió determinar que este mayor índice de duplicación, observado en los linfocitos de los niños desnutridos, sólo pudo relacionarse con una respuesta más rápida al mitógeno, ya que la duración del ciclo celular se encontró alterada, observándose un tiempo de generación mayor. Este mismo estudio mostró que la fracción de células que respondieron al mitógeno y que proliferaron activamente fue menor en los cultivos de los niños desnutridos, es decir, solamente una fracción de los linfocitos T presentaron un período de latencia mas corto antes de entrar al ciclo de proliferación (transición G0-G1) (Ortiz et al., 1994). Después de un período de recuperación nutricional, se observó que la fracción de linfocitos que respondieron al mitógeno se incrementó, pero no alcanzó los valores mostrados por los niños sanos, lo que indicó que la recuperación fue solamente parcial. Además se determinó que en los niños en recuperación nutricional persistió el retraso en la duración del ciclo celular (Ortiz et al.,1995).

En lo que se relaciona específicamente a las causas asociadas con el daño al ADN observado en los niños con desnutrición, se señala como muy probable al daño oxidativo, ya que como se sabe los radicales libres, generados por el metabolismo del oxígeno son los agentes principales que provocan daño a muchas estructuras celulares y a componentes funcionales de la misma, entre los que destaca el ADN (Halliwell, 1991; Higami et al., 1994). Se considera que entre las principales fuentes que incrementan la

presión oxidativa en los niños con desnutrición están las infecciones, la proliferación de bacterias intestinales y la ingestión de toxinas, como las aflatoxinas presentes en granos contaminados por hongos (Albretch y Pelissier, 1995).

Las reacciones oxidativas en condiciones normales, son neutralizadas por sistemas antioxidantes endógenos, cuya disponibilidad está directamente relacionada con la dieta. Se ha establecido que relacionado con las carencias nutricionales en los niños con DCP se encuentran alterados algunos sistemas antioxidantes, principalmente por la disminución de la concentración de glutatión (Becker et al., 1995) y de otros compuestos como el retinol, los β-carotenoides (Squali-Houssaini et al., 1997), el α-tocoferol (Squali-Houssaini et al., 1997; Smit et al., 1997), el zinc y el selenio, teniendo este último un papel fundamental en la función de la enzima glutatión peroxidasa (Albrecht y Pelissier, 1995). Las concentraciones de los antioxidantes antes señalados se han encontrado disminuidas en los niños con DCP, particularmente en los niños con kwashiorkor (Becker et al., 1994; Lenhartz et al., 1998). Adicionalmente se ha observado un exceso de hierro libre en la médula ósea de niños con kwashiorkor lo que los predispone aún mas al daño por radicales libres (Sive et al., 1996).

A pesar de las alteraciones antes mencionadas, se debe puntualizar que en la literatura no se tiene información que indique que los niños con DCP, o en proceso de recuperación de esta, manifiesten daños permanentes, como envejecimiento prematuro o transformaciones neoplásicas, que serían lo esperado después de una exposición severa y prolongada a los radicales libres y que en concordancia con esto se ha observado que muchas de las anormalidades observadas en los desnutridos son reversibles, cuando se les somete a rehabilitación nutricional (Albrecht y Pelissier, 1995). Esto sin embargo, debe considerarse como un campo de investigación abierto, que permitirá establecer si es que la desnutrición pudiera estar relacionada con el desarrollo de algún tipo de cáncer.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTORICO

1.2 Infecciones

En nuestro país y en los países pobres en general, las infecciones más comunes y que además constituyen una causa importante de mortalidad en niños menores de 5 años, son las infecciones agudas de vías respiratorias y las infecciones gastrointestinales (García-Ramos et al., 1991; Vergara et al., 1992). Dentro de las primeras, en México se ha reportado que alrededor del 70% corresponde a la bronconeumonía de origen bacteriano y se han identificado como principales agentes causales a *Streptococcus pneumoniae,* a *Haemophilus influenzae,* a *Staphylococcus aureus* y a *Klebsiella pneumoniae* (García-Ramos et al., 1991). En relación a las infecciones gastrointestinales, se ha determinado que en niños de 1 a 5 años de edad con diarrea líquida (Flores-Abuxapqui et al., 1993) y sanguinolienta (Torres et al., 1995) los enteropatógenos más frecuentes son: *Shigella, Escherichia coli citotóxica* y *Campylobacter.* Otros agentes patógenos que se han encontrado presentes en niños de la ciudad de México con diarrea aguda son *Cryptosporidium parvum* y también la bacteria enteropatógena Salmonella, siendo mucho mas frecuente su presencia en niños desnutridos (Enríquez et al., 1997).

Se ha reportado que las infecciones graves están relacionadas con un aumento en las rupturas de hebra simple del ADN, sin embargo, se recomienda realizar estudios con diferentes tipos de infecciones, en donde se determine el agente causal de la misma con lo que se podría establecer el grado de daño inducido al ADN por cada uno de los diferentes agentes patógenos y se podría tratar de establecer si es que existe relación entre la magnitud del daño en esta molécula y la gravedad de la infección (Betancourt et al., 1995). Se ha sugerido que ciertas enzimas bacterianas pueden actuar como DNA-asas y endonucleasas que producen daño al ADN en las células del organismo infectado (Ahuja, 1991). También se ha propuesto que los radicales libres generados por las células fagocíticas del organismo infectado, al tratar de controlar la infección, pueden estar relacionados con un incremento en el daño al ADN (Halliwell, 1991).

Otros estudios han mostrado que las infecciones bacterianas pueden inducir daño genético, así se ha observado una elevación en la frecuencia de AC en pacientes con tuberculosis (Rao et al., 1990) y también un aumento en la frecuencia de AC e ICH en

pacientes con lepra (D'Souza y Das, 1994). Adicionalmente se ha determinado un incremento en las AC en niños con infecciones y este fue mayor cuando se asoció la infección con la desnutrición (Murthy y Rahiman, 1983). En relación a la frecuencia de ICH se ha observado que esta se incrementó en los niños desnutridos, independientemente de la presencia de las infecciones (Ortiz et al., 1994).

Adicionalmente, se ha reconocido que existe una fuerte asociación entre la infección crónica por *Helicobacter pylori* y casos de cáncer gástrico y aunque los mecanismos que determinan esto son aún desconocidos, se propone que la enfermedad puede generarse a partir de un genotóxico liberado por las bacterias que induce daño al ADN (Mannick et al., 1996), provocando mutaciones en oncogenes del huésped (Ernst, 1999) o en los genes supresores de la formación de tumores. Es probable que un mecanismo similar determine que la infección por *Helicobacter hepaticus* desencadene el desarrollo de carcinomas hepáticos (Guindi, 1999).

1.3 Medicamentos

Se ha demostrado que algunos medicamentos, principalmente los antibióticos que son necesarios para el control de las infecciones, pueden tener efectos colaterales no deseados (McDaniel y Schultz, 1993). Un grupo de antibióticos de uso muy generalizado, son los aminoglucósidos (por ejemplo la gentamicina), los que a pesar de que han mostrado efectos colaterales adversos, como alteraciones a nivel de la cóclea, del vestíbulo o del riñón en humanos, siguen siendo considerados como indispensables en el tratamiento de algunas infecciones (Schacht, 1998).

Es probable que algunos de los efectos colaterales debido al uso de antibióticos se relacionen con daños inducidos al ADN. Así por ejemplo, se ha observado un incremento en la frecuencia de ICH por acción de la gentamicina (McDaniel y Schultz, 1993) y el cloranfenicol (Catalán et al., 1993). En relación a la gentamicina, se sabe que actúa inhibiendo la síntesis de proteinas (Wilhelm et al., 1978) y se propuso que este podría ser

el mecanismo mediante el cual incrementa la frecuencia de ICH's. Sin embargo, se ha demostrado que otros inhibidores de la síntesis de proteínas, como la puromicina, no inducen un incremento en la frecuencia de ICH's (Sono y Sakaguchi, 1981). Otros trabajos realizados con gentamicina muestran que ésta facilita la generación de radicales libres y se sugiere que este proceso podría jugar un papel importante en las alteraciones que puede provocar (Conlon y Smith, 1998).

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro y se ha utilizado tanto en humanos como en medicina veterinaria. El riesgo para la salud humana se presenta cuando se usa para el tratamiento de padecimientos infecciosos, sin embargo, otra posibilidad de contacto para los humanos son los residuos presentes en los tejidos de animales tratados y que posteriormente se usan como alimentos. El cloranfenicol se usa frecuentemente en los países no industrializados ya que es barato y efectivo, esto a pesar de su demostrada hemotoxicidad y de su relación con la anemia aplástica. Con respecto a la inducción de daño al ADN por el cloranfenicol, se tienen datos contradictorios, ya que algunos trabajos reportan un incremento (Martelli et al., 1991; Catalán et al., 1993), mientras que otros no coinciden con este hallazgo (Lafarge-Frayssinet et al., 1994), sin embargo, estos últimos reportan una mayor toxicidad relacionada con algunos de sus metabolitos. Además, se ha demostrado que puede inducir apoptosis y que este efecto puede disminuirse al tratar conjuntamente a las células con un agente antioxidante. Este último dato es lo que ha permitido proponer que posiblemente la liberación de radicales libres influye en los efectos tóxicos del cloranfenicol (Holt et al., 1997).

Otros aminoglucósidos como la kanamicina y la estreptomicina inducen daño coclear o vestibular en el oído. Se propone que tanto el hierro como los radicales libres podrían jugar un papel crítico en los efectos tóxicos colaterales de estos dos antibióticos (Song et al., 1998). Una revisión bibliográfica muestra que de 467 medicamentos que se encontraban a la venta en 1999 (Snyder y Green, 2001), 77 mostraron tener actividad carcinogénica.

Adicionalmente, se ha establecido que otros antibióticos pueden disminuir la síntesis de ADN y con esto reducir la proliferación celular (Potts et al., 1983). De manera

indirecta, asociada a esta baja proliferación se ha observado inducción de daño genético (Song et al., 1998; Abou-Eisha et al., 1999). Por lo anterior, es probable que algunas alteraciones en la respuesta a mitógenos y en la proliferación celular observada en los linfocitos de los niños desnutridos, puedan estar relacionadas con la ingesta de medicamentos (Ortiz et al., 1995).

1.4 Ensayo cometa: detección de daño y reparación del ADN

La metodología de electroforesis unicelular en condiciones alcalinas (o ensayo cometa) ha mostrado ser una metodología muy sensible para evaluar el daño al ADN causado por diversos factores (Tice, 1994). Con esta técnica, al someter el material genético a un campo eléctrico, se detectan rompimientos de cadena doble o de cadena sencilla, así como daño en regiones sensibles al álcali y sitios incompletamente reparados por excisión de bases. La imagen que se obtiene es semejante a la de un cometa en el que la cabeza es el nucleoide y el ADN fragmentado es la estela, cuya longitud refleja la cantidad de daño. Esta metodología tiene además diversas ventajas como: se requiere una cantidad pequeña de muestra para realizarse, puede evaluar el daño al ADN en células no proliferantes, el análisis se efectúa en células individuales, se puede realizar en diferentes tipos celulares y en células de organismos de diferentes especies, es además relativamente simple y rápida.

Ya que el análisis puede efectuarse en células individuales, se puede evaluar la distribución intracelular del daño al ADN (McKelvey-Martin et al., 1993; Collins et al., 1997a; Rojas et al., 1999). Además, el hecho de que técnicamente no sea complicada la hace una buena opción para hacer estudios poblacionales. A pesar de sus numerosas ventajas, se debe reconocer que el ensayo cometa presenta ciertas desventajas, entre las que se mencionan las dudas que existen en relación a la importancia biológica de las alteraciones presentes en el ADN que pueden ser evaluadas con esta técnica, ya que la mayoría de las lesiones son reparadas antes de fijarse como mutaciones. Por otro lado, no se ha llegado a acuerdos para elegir un solo parámetro que describa de la mejor manera el daño observado en el ADN. Otras desventajas se perciben en las variantes

metodológicas que se siguen durante el tratamiento alcalino y el corrimiento electroforético y también se ha cuestionado el que la mayoría de los estudios con el ensayo cometa se han realizado en células sanguíneas, por la facilidad que representa su obtención y que tal vez podrían no ser las mas adecuadas en todos los casos (Kassie et al., 2000).

Las células que se utilizan para realizar el ensayo cometa, deben ser aisladas y procesadas, de manera que no se permita la reparación o la formación de rompimientos adicionales (Fairbairn et al., 1995). Posteriormente las células se mezclan con agarosa, se colocan sobre un portaobjetos, se lisan con detergente y con altas concentraciones de sal. Durante esta parte del proceso todas las proteínas nucleares son extraídas, formándose así los nucleoides, que no contienen nucleosomas, sin embargo el ADN retiene el superenrrollamiento contenido en los nucleosomas. Cuando la molécula de ADN se rompe, el superenrrollamiento se relaja y al someterlo a electroforesis alcalina, los fragmentos del ADN se liberan extendiéndose hacia el ánodo formando la estela del cometa. La facilidad del ADN para migrar estará en función del número de rompimientos y del tamaño de los fragmentos, los que pueden quedar pegados a trozos de mayor tamaño y que por lo tanto sólo migraran una distancia corta a partir de la cabeza del cometa. La longitud de la estela inicialmente incrementa con la magnitud del daño inducido, pero alcanza un máximo, que está fuertemente definido por las condiciones de la electroforesis y no por el tamaño de los fragmentos (Fairbairn et al., 1995).

Para efectuar la electroforesis se utilizan soluciones amortiguadoras con pH's altos (>12.3), ya que esto facilita la desnaturalización y el desenrrollamiento del ADN, permitiendo la expresión de los rompimientos de cadena sencilla, así como de los rompimientos que sólo se hacen aparentes, después de la exposición al álcali, también llamados sitios sensibles al álcali (Fairbairn et al., 1995, Rojas et al., 1999). Estos sitios sensibles al álcali, tales como los sitios apurínicos, se transforman en rompimientos de la molécula de ADN (McKelvey-Martin et al., 1993).

Los cometas se revisan en el microscopio de fluorescencia, previa tinción con bromuro de etidio, ioduro de propidio o DAPI. La intensidad relativa de la fluorescencia en

la estela del mismo se puede evaluar visualmente o usando densitometría o el análisis de imágenes computarizado (Rojas et al., 1999). El análisis de imágenes proporciona diversos parámetros de cada cometa, incluyendo la longitud de la estela, la intensidad relativa de la fluorescencia (que corresponde al porcentaje de ADN en la estela)y el "tail moment" (que corresponde al producto de la longitud de la estela y de la fracción de ADN total presente en ella). En este último parámetro se involucran dos aspectos: los fragmentos mas pequeños de ADN detectables (que se reflejan en la longitud de la estela del cometa) y el número de fragmentos de ADN (que se representan por la intensidad del ADN en la estela) (Fairbairn et al., 1995).

El ensayo cometa se ha utilizado como una prueba de genotoxicidad y constituye una herramienta invaluable en la investigación de los aspectos básicos del daño al ADN y de las respuestas celulares ante este daño. Adicionalmente se le está utilizando para monitorear el daño al ADN en poblaciones humanas (Collins et al., 1997b; Kassie et al., 2000). Se considera que con ésta técnica y utilizando un número adecuado de individuos, es posible establecer diferencias entre grupos, a pesar de que se ha observado una variación considerable entre las muestras de un mismo individuo, obtenidas a diferentes tiempos (Collins et al., 1997a).

Los rompimientos de cadena sencilla no son considerados como lesiones letales o mutagénicas ya que son reparados muy rápidamente. Muchos agentes no inducen rompimientos directamente, aunque en ocasiones pueden formar sitios apurínicos, que son sensibles al álcali y son convertidos en rompimientos cuando el ADN se coloca en soluciones con pH alto. Otros rompimientos pueden presentarse de manera transitoria cuando las células reparan el ADN por la vía de la excisión de bases o de nucleótidos y por lo tanto un nivel alto de rompimientos podría indicar daño alto o reparación deficiente (McKelvey-Martin et al., 1993).

Utilizando ésta técnica es posible determinar si todas las células dentro de una población muestran el mismo grado de daño (Fairbairn et al., 1995). El tipo celular que mas se ha utilizado en humanos son los linfocitos, en los que se ha reportado una considerable variabilidad intra-individual, la que se ha atribuido a diferentes factores, entre

los que se incluyen: edad del donador (Singh et al., 1990), actividad física (Hartmann et al., 1994), o algunos hábitos, como el tabaquismo (Betti et al., 1994

Recientemente se ha introducido una modificación al ensayo cometa, la que incrementa enormemente su sensibilidad y especificidad. Esta consiste en que posteriormente a la lisis, el ADN en el gel, es digerido con una endonucleasa de reparación específica, la que introduce rompimientos en sitios específicos de daño. En principio, cualquier lesión para la que exista una endonucleasa de reparación, podría detectarse de esta manera. Para esto se ha utilizado la endonucleasa III, cuyo sustrato son las pirimidinas oxidadas. Otras enzimas que se han utilizado son la formamidopirimidina glicosilasa (que actúa sobre la 8-hidroxi-guanosina), la endonucleasa V (específica para dímeros de timina formados por exposición a UV) y la uvrABC (que reconoce lesiones masivas) (Collins et al., 1997b). Esta modificación a la técnica es particularmente importante cuando se estudian agentes que dañan a las bases púricas o pirimídicas del ADN, sin provocar rompimientos por sí mismos, con estos agentes el rompimiento de las cadenas ocurre como un paso intermedio durante la reparación del daño (Rojas et al, 1999).

El ensayo se ha utilizado en muy diversos tipos de estudios: **Daño oxidativo** - Inducido por el estres oxidativo endógeno, por ejercicio físico exhaustivo o por estrés oxidativo inducido in vitro. **Efectos antioxidantes** - En los que se ha evaluado el efecto antioxidante de micronutrientes como las vitaminas C y E. **Condiciones patológicas** - Aborto, desnutrición, infecciones, diferentes tipos de cáncer, infertilidad, diabetes. **Exposición terapéutica** - Medicamentos, radiación ionizante, anestésicos. **Exposición ocupacional** - Radiólogos, anestesiólogos, campesinos expuestos a pesticidas, obreros de la industria del plástico, empleados de gasolineras, estilistas expuestos a colorantes para cabello. **Hábitos personales** - Fumadores, atletas, alimentación, alcohol. **Exposición ambiental** - Contaminación del aire y agua (Fairbain, 1995; Rojas et al., 1999; Kassie et al., 2000).

Por sus características, la electroforesis unicelular ha sido utilizada también en estudios de reparación del daño en el ADN, en poblaciones celulares normales o

transformadas (Singh et al., 1988, 1990, 1994; Tice et al., 1990; Olive et al., 1990). Se ha apreciado que aproximadamente el 50% del daño se repara en los primeros 15 minutos y la reparación total se efectúa en una o dos horas posteriores al tratamiento (Tice, 1994; Singh et al., 1994).

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en linfocitos de niños, por medio de la técnica de electroforesis unicelular, el daño producido en el ADN por la desnutrición calórico-proteica severa, las infecciones graves y los medicamentos mas comúnmente empleados en el tratamiento de éstas y analizar el efecto de la desnutrición calórico-proteica severa y de las infecciones graves sobre la capacidad de reparación del daño inducido a esta molécula por el peróxido de hidrógeno.

2.1 Objetivos particulares

1) Evaluar el daño al ADN producido por la desnutrición calórico proteica de tercer grado.

2) Analizar el daño al ADN relacionado con las infecciones bacterianas presentes en niños bien nutridos y en niños desnutridos.

3) Estudiar el daño al ADN asociado con los medicamentos mas comúnmente empleados en la clínica para el tratamiento de las infecciones antes mencionadas, en los niños bien nutridos infectados y en los niños desnutridos.

4) Evaluar la sensibilidad de los linfocitos de niños desnutridos a presentar niveles altos de daño en el ADN, después de un periodo de tratamiento con medicamentos.

5) Establecer si la presencia de la desnutrición, de las infecciones y del tratamiento con medicamentos, determina relaciones de tipo sumatorio o sinérgico que incrementen la cantidad de daño al ADN, observado en los diferentes grupos de niños estudiados.

6) Evaluar el daño inducido por el peróxido de hidrógeno en el ADN de los linfocitos de niños desnutridos.

7) Analizar la capacidad de reparación del daño inducido en el ADN de linfocitos de niños bien nutridos, bien nutridos infectados y desnutridos.

3. HIPOTESIS

Diversos estudios muestran que la desnutrición, las infecciones graves y algunos medicamentos utilizados para combatirlas pueden causar daño al ADN. Debido a que en los niños desnutridos estas tres variables se encuentran generalmente asociadas, lo esperado sería que estos niños presentaran los niveles mas altos de daño al ADN. Por otro lado, si los niños con desnutrición e infecciones asociadas presentan los niveles mas altos de daño, es probable que esto pueda estar relacionado con alteraciones en la eficiencia de la reparación del daño inducido al ADN.

4. MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron muestras de sangre de aproximadamente 3 ml, de niños que fueron incluidos en alguno de los siguientes grupos de estudio:

Niños Bien Nutridos (BN) (Grupo Testigo) - Integrado por niños sanos con peso y talla adecuada para su edad cronológica.

Niños Bien Nutridos Infectados (BN-I) - Integrado por niños con infección grave de las vías respiratorias o gastrointestinal grave, y que no se encontraban tomando medicamentos al momento de la toma de la muestra, con peso y talla adecuados para su edad cronológica.

Niños Bien Nutridos Infectados con tratamiento (BN-IT) - Integrado por los mismos niños del grupo anterior, después de un período de hospitalización durante el cual fueron tratados con medicamentos.

Niños Desnutridos Infectados (DES-I) - Integrado por niños con infección grave de las vías respiratorias o gastrointestinal, que no se encontraban tomando medicamentos al momento de la toma de la muestra, y con desnutrición severa asociada

Niños Desnutridos con tratamiento (DES-IT) - Integrado por los mismos niños del grupo anterior después de un período de hospitalización y del tratamiento con medicamentos.

Las muestras se obtuvieron en los Hospitales Infantiles de Xochimilco e Iztapalapa del D.D.F., con los que se realizó un convenio de colaboración. No se estudió un grupo de niños desnutridos no infectados, porque es muy difícil encontrar pacientes con estas características. De cada uno de los niños incluidos en el estudio se solicitó la información contenida en la Ficha de Datos (Anexo 9.1).

El protocolo de investigación fue evaluado y aceptado por el Comité de Etica de la Dirección General de Servicios Médicos del D.D.F.

El trabajo experimental fue dividido en tres partes:

4.1.- Evaluación del daño basal observado en el ADN de los grupos BN, BN-I y DES-I. Para establecer la influencia de las infecciones y de la desnutrición sobre el daño al ADN.

4.2.- Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BN-IT y DES-IT).

4.3.- Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en los niños BN, BN-I y DES-I.

4.1 Evaluación del daño basal presente en el ADN en los tres grupos de estudio: Niños Bien Nutridos (BN), Niños Bien Nutridos Infectados (BN-I) y Niños Desnutridos Infectados (DES-I)

Para establecer el impacto de las infecciones y de la desnutrición sobre el daño al ADN, se tomaron muestras de niños BN, BN-I y DES-I previas al tratamiento con medicamentos.

4.1.1 Características de los niños estudiados

El grupo de niños BN no infectados estuvo formado por 12 niños, cuyas edades fluctuaron entre 13 y 54 meses, y dos de los cuales eran de sexo femenino y 10 de sexo masculino. Los niños BN asistían a los hospitales para análisis preoperatorios y algunos otros para control de niño sano. Estos niños fueron considerados como BN por presentar la relación peso/talla esperada para su edad cronológica (Cuadro 1). Los pesos y las tallas promedio usados como referencia fueron tomados de un estudio realizado por Ramos-Galván (1975) en una población de niños mexicanos.

En el grupo BN-I se incluyeron 16 niños de entre 7 a 54 meses de edad, de los cuales 5 eran de sexo femenino y 11 masculino. Todos presentaban la relación peso/talla esperada para su edad cronológica, y fueron hospitalizados por presentar algún tipo de infección bacteriana grave de tipo respiratoria, gastrointestinal o de vías urinarias, o combinaciones de ellas (Cuadro 2).

Cuadro 1. Características de los niños bien nutridos (BN)

Muestra	*Edad (meses)*	*Sexo*	*Peso (Kg)*	*Talla (cm)*
JJA [a]	13	M	10.0	74.0
CHV [a]	14	F	12.2	81.0
MHD [a]	18	M	10.8	79.0
AGR	24	M	12.6	87.0
BMP [a]	29	M	12.5	88.0
SFV	33	M	15.3	99.0
EGC [a]	36	M	16.0	92.0
MMG	39	M	15.5	97.0
JFG [a]	44	M	16.5	100.5
EJS	48	M	16.5	102.0
TJM	48	F	16.2	101 0
JCM	54	M	20.0	101.0

[a] Estos niños formaron el grupo de niños BN en el estudio de la reparación del daño inducido al ADN.

Cuadro 2. Características de los niños bien nutridos infectados (BN-I)

Muestra	*Edad (meses)*	*Sexo*	*Peso (Kg)*	*Talla (cm)*	*Tipo de infección*
EGE [b, c]	7	M	6.5	70	Gastrointestinal, Respiratoria
CCC [c]	7	M	8.5	70	Gastrointestinal
JBD	7	M	7.0	ND	Gastrointestinal, Respiratoria
RGP	9	M	9.0	71	Respiratoria
SMY	10	F	7.5	71	Respiratoria
JVP	11	F	8.0	72	Respiratoria
LVP	11	F	8.2	70	Respiratoria
JEL [c]	14	M	9.2	80	Gastrointestinal
ECD	14	M	8.8	67	Respiratoria
JPA [b, c]	16	M	10.0	74	Gastrointestinal, Respiratoria
KRD	16	F	10.1	85	Gastrointestinal
JBM [b c]	18	M	9.9	78	Gastrointestinal, Respiratoria, Vías urinarias
JGC [b, c]	22	M	10.0	88	Gastrointestinal, Respiratoria
NCH [b]	34	M	13.0	93	Sepsis
KFG [b]	36	F	14.0	95	Respiratoria
RMM	54	M	16.0	ND	Gastrointestinal, Respiratoria

[b] A estos niños se les tomó una muestra antes y otra después del tratamiento con medicamentos, para la evaluación del daño inducido por los medicamentos.

[c] Estos niños formaron el grupo de BN-I del estudio de la reparación del daño inducido al ADN.

El grupo de niños con desnutrición severa estuvo integrado por 11 niños, con edades de entre 6 y 29 meses. Siete eran de sexo femenino y cuatro de sexo masculino. Nueve presentaban déficits de la relación peso/talla superiores o iguales al 40%, en relación a lo esperado para su edad cronológica, estos niños presentaban desnutrición de tipo marasmo. Dos niños presentaron un déficit menor (3% y 25% respectivamente) debido a la presencia de edema, que es característico de la desnutrición de tipo kwashiorkor. Todos presentaban infección bacteriana de tipo gastrointestinal o respiratoria, y en tres de ellos se diagnosticaron ambos tipos de infecciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de los niños desnutridos infectados (DES)

Muestra	*Edad (meses)*	*Sexo*	*Peso (Kg)*	*Talla (cm)*	*Déficit peso/talla*	*Tipo de infección*
CMR [d]	6	F	2.5	49	54%	Gastrointestinal
IRP [d,e]	6	M	4.1	61	41%	Respiratoria
GGG [d,e]	10	F	4.6	72	48%	Gastrointestinal
NCR [d]	10	M	5.5	67	40%	Gastrointestinal
JGM [d]	12	F	5.0	66	41%	Gastrointestinal
LVP	12	M	6.8	69	25%*	Gastrointestinal, Respiratoria
NBS [d,e]	14	F	3.4	58	55%	Gastrointestinal
FRG [e]	15	F	5.7	74	43%	Gastrointestinal, Respiratoria
BVV	17	F	7.2	79	42%	Gastrointestinal, Respiratoria
GMG [e]	24	M	11.4	81	3%*	Gastrointestinal
LPA [d,e]	29	F	7.2	N.D.	49%**	Respiratoria

* Desnutrición tipo kwashiorkor.** Sólo déficit de peso. N.D. No determinada.

[d] A estos niños se les tomó una muestra antes y otra después del tratamiento con medicamentos, para la evaluación del daño inducido por los medicamentos.

[e] Estos niños formaron el grupo de DES-I del estudio de la reparación del daño inducido al ADN.

Las muestras de sangre de todos los niños, fueron obtenidas en jeringas previamente heparinizadas y llevadas inmediatamente al laboratorio, a partir de ellas se aislaron los linfocitos de la siguiente manera:

4.1.2 Aislamiento de linfocitos

La sangre se mezcló con PBS (proporción 1:1, v/v), y esta suspensión celular se colocó cuidadosamente en tubos de centrífuga sobre Linfograd (Microlab, México). Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 20 min. Posteriormente, los linfocitos se colectaron en la parte superior del Linfograd. Las células se lavaron dos veces con PBS. Finalmente los linfocitos se llevaron a una concentración final de 1 X 10^6 céls/ml.

4.1.3 Electroforesis unicelular

La metodología de electroforesis unicelular que se siguió fue la propuesta por Singh et al. en 1988, modificada por Tice et al. en 1990.

Primeramente se preparó la solución de lisis (solución de trabajo) (Anexo 9.2.1), que se colocó en un vaso Koplin a 4°C, protegida de la luz.

Para la preparación de los geles se colocaron 110 µl de solución de agarosa regular al 0.75% en portaobjetos totalmente esmerilados, sobre ella inmediatamente se colocó un cubreobjetos evitando la formación de burbujas, se dejó solidificar y después se retiró cuidadosamente el cubreobjetos. Por otro lado se mezclaron 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% con 10 µl de la suspensión de linfocitos. Se añadió esta mezcla sobre la primera capa de agarosa, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó solidificar. Se retiró el cubreobjetos, y se agregó una tercera capa de 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión, se colocó encima un cubreobjetos, se dejó solidificar, y finalmente se retiró el cubreobjetos.

Se sacaron las preparaciones de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal, la que se llenó cuidadosamente con la solución

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

amortiguadora con la que se realizó el corrimiento electroforético (Anexo 9.2.2). Se dejaron reposar 20 min., para permitir el desenrrollamiento del ADN, y la expresión de los sitios sensibles al álcali. Concluido este tiempo se realizó la electroforesis a 25 volts y 300 miliamperes, durante 30 minutos. Se retiraron los geles de la cámara y se colocaron en una superficie plana, ahí se les goteó con la solución amortiguadora para neutralización (Anexo 9.2.3), de la que se hicieron tres cambios consecutivos, dejando reposar las preparaciones en cada ocasión durante 5 min.

Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 20 μg/ml (Sigma) (Anexo 9.2.4). Las observaciones se hicieron utilizando un objetivo de 40X en un microscopio de fluorescencia (Olympus) equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Las mediciones se realizaron utilizando un sistema de circuito cerrado de televisión que permite marcar en una pantalla el punto de terminación del núcleo y el punto de terminación de la estela del cometa, y que proporciona la medida en μm. La migración del ADN se evaluó en 50 células seleccionadas al azar (25 células en dos preparaciones).

4.2 Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BN-IT y DES-IT)

Después de un período de estancia en el hospital, durante el cual los niños estuvieron en tratamiento con medicamentos, se tomó una segunda muestra de sangre a algunos de los niños infectados, tanto desnutridos como bien nutridos. De estas muestras se aislaron los linfocitos, se hicieron los geles, se realizó la electroforesis unicelular y se analizaron las preparaciones de la manera descrita en la sección anterior.

4.2.1 Caracteristicas de los niños Bien Nutridos Infectados

Para esta parte del estudio se utilizaron muestras de seis niños BN-I, cuyas edades fluctuaron entre 7 y 36 meses, uno de sexo femenino y cinco de sexo masculino con relaciones peso/talla adecuadas para su edad cronológica. Todos se encontraban

hospitalizados por presentar alguna infección bacteriana grave de tipo gastrointestinal, respiratoria, de vías urinarias o combinaciones de ellas (Cuadro 2).

A estos mismos seis niños después de entre 4 y 7 días de hospitalización, período durante el cual estuvieron recibiendo medicamentos, se les tomó una segunda muestra, para evaluar el efecto de los medicamentos sobre el ADN (Cuadro 4).

Cuadro 4. Días de tratamiento y medicamentos administrados a los niños bien nutridos infectados (BN-I)

Muestra	*Días de tratamiento*	*Medicamentos*
EGE	7	Trimetoprim-sulfametoxazol
JPA	7	Trimetoprim-sulfametoxazol
JBM	7	Salbutamol, Ambroxol
JGC	7	Amikacina
NCH	7	Cefotaxina, Dicloxacilina, Cloranfenicol, Metronidazol
KFG	4	Penicilina, Ambroxol, Acetaminofén

Como se aprecia en el Cuadro 4, a cinco de los niños bien nutridos se les administraron diferentes tipos de antibióticos (Trimetoprim-sulfametoxazol, Amikacina, Cefotaxina, Dicloxacilina, Cloranfenicol, Penicilina), a uno (NCH) se le administró además un amebicida (Metronidazol) y a otro (KFG) se le administró adicionalmente un mucolítico (Ambroxol) y un antipirético (Acetaminofén), al niño JBM no se le administraron antibióticos, sólo un broncodilatador (Salbutamol) y un mucolítico (Ambroxol).

4.2.2 Características de los niños con Desnutrición Severa

En el grupo de niños DES-I se incluyeron a seis niños, con edades de entre 6 y 29 meses, dos de sexo masculino y cuatro femenino. Cinco presentaban desnutrición de tipo marasmo y uno (NBS) desnutrición mixta, todos con un déficit en la relación peso/talla superior al 40%. Estos se encontraban hospitalizados por presentar algún tipo de infección bacteriana respiratoria o gastrointestinal (Cuadro 3).

Después de 4 a 7 días de hospitalización se tomaron las segundas muestras (Cuadro 5).

Cuadro 5. Días de tratamiento y medicamentos administrados a los niños desnutridos infectados (DES-I)

Muestra	*Días de tratamiento*	*Medicamentos*
IRP	4	Ampicilina, Amikacina, Cefalexina
GGG	6	Amikacina, Metronidazol, Nistatina
NCR	6	Ampicilina, Ranitidina, Amikacina, Fenobarbital, Difenilhidantoinato
JGM	7	Ampicilina, Amikacina, Nistatina, Ranitidina
NBS	6	Penicilina, Amikacina, Ranitidina, Salbutamol, Furosemide, Dexametasona
LPA	6	Cefotaxima, Dicloxacilina, Salbutamol, Ambroxol, Metilprednisolona

Al momento de la toma de la muestra a los seis niños se les estaban administrando diferentes tipos de antibióticos, a uno (GGG) adicionalmente se le administraba un amebicida (Metronidazol) y un fungicida (Nistatina), a otros además de los antibióticos se les administraron antiulcerosos (Ranitidina), neurosedantes (Fenobarbital), antiepilépticos (Difenilhidantoinato), broncodilatadores (Salbutamol),

diuréticos (Furosemide), glucocorticoides (Dexametasona, Metil-prednisolona) y mucolíticos (Ambroxol).

Se solicitó en los hospitales que la muestra para evaluar el efecto de los medicamentos se tomara en el momento que las condiciones del niño lo permitieran, y que coincidiera con la necesidad de realizar algún otro análisis de laboratorio. Las muestras se tomaron antes del egreso del hospital para asegurar que los niños estaban recibiendo los medicamentos. La toma de las muestras se realizaba por las mañanas, después de una o dos horas de administrados los medicamentos del turno.

4.3 Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en los niños BN, BN-I y DES-I

Para la evaluación de la eficiencia de la reparación en las diferentes muestras de niños BN, BN-I y DES, se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente inductor de daño al ADN (Tice, 1994). Las preparaciones que contenían los linfocitos se colocaron en una solución de H_2O_2 10 μM durante 20 min a 4°C. Finalizado este tiempo se sacaron y se colocaron a 37°C en Medio McCoy 5a modificado (Microlab), suplementado con 10% de suero fetal de ternera (Microlab), para permitir la reparación del daño inducido. Para evaluar la reparación del ADN se tomaron preparaciones a los siguientes tiempos de incubación: 0, 5, 15, 30 y 60 min. El análisis al tiempo cero minutos permitió apreciar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el ADN de los linfocitos de los niños de los diferentes grupos estudiados, mientras que a 5 y 15 minutos se evaluó el período de reparación rápida, durante el cual se ha observado las células pueden reparar hasta un 50% del daño (Tice y Strauss, 1995). Se siguió el proceso de reparación hasta 60 minutos para evaluar el proceso en tiempos mayores. Las preparaciones se realizaron por triplicado para cada uno de los tiempos analizados. Al término del período de reparación, las preparaciones se colocaron directamente en la solución de lisis, en donde se les dejó por al menos una hora. La electroforesis unicelular y el análisis de las muestras se realizó de la manera antes descrita. Se evaluó la viabilidad celular a 0 y 60 min de incubación utilizando una tinción doble con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína (Anexo 9.3) (Strauss, 1991).

4.3.1 Características de los niños en los que se evaluó la reparación del ADN

El grupo de bien nutridos no infectados estuvo formado por seis niños, con edades de entre 13 a 44 meses. Una de sexo femenino y cinco de sexo masculino, con una relación peso/talla adecuada para su edad cronológica (Cuadro 1).

Los niños BN-I fueron seis, todos de sexo masculino, con relaciones de peso/talla adecuadas para sus respectivas edades cronológicas y algún tipo de infección respiratoria, gastrointestinal, de vías urinarias, o combinaciones de ellas (Cuadro 2).

Los niños DES-I estudiados fueron siete, con edades de entre seis y 29 meses, dos de sexo masculino y cinco de sexo femenino. Seis presentaron desnutrición de tipo marasmo, con déficits en la relación peso/talla superiores al 40%, y sólo uno presentaba desnutrición de tipo kwashiorkor, con un déficit en la relación peso/talla del 3% (Cuadro 3).

4.4 Análisis de datos

En todos los casos se determinó el promedio de la longitud de las estelas, el error estándar y el coeficiente de dispersión (coeficiente H) para cada grupo de estudio. El coeficiente H se usa como una medida de dispersión, que indica para cada niño estudiado, homogeneidad en la variabilidad intercelular cuando H presenta valores bajos, o bien, heterogeneidad cuando presenta valores altos (Tice et al., 1992), este se calculó dividiendo la varianza entre el promedio de cada una de las muestras.

También en todos los casos se evaluó, el número de células dañadas, considerándose como tal a aquellas que presentaron estela. Así mismo, los cometas se clasificaron en tres categorías de acuerdo a la longitud de la estela con respecto al diámetro del núcleo de células no dañadas, observadas en el mismo campo. Las categorías consideradas fueron: ***daño bajo*** (tamaño de la estela equivalente al diámetro de un núcleo o menos), ***daño medio*** (hasta tres núcleos) y ***daño alto*** (más de tres

núcleos) (Mendiola-Cruz y Morales-Ramírez, 1999). Se consideró una cuarta categoría que fueron las células sin daño, las que no presentaban estela.

Para evaluar la cinética de reparación se utilizaron el promedio de la longitud de las estelas y los porcentajes de células dañadas observados en cada uno de los tiempos de incubación, para cada uno de los grupos de estudio. Otro parámetro que se calculó, fue la llamada capacidad reparativa (CR), que se refiere a la disminución relativa del promedio de la longitud de las estelas o del porcentaje de células con daño, con respecto al tiempo de reparación (Plappert et al., 1997).

Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar los datos de la longitud de las estelas, los valores del coeficiente H y los de la capacidad reparativa. Las proporciones de células sin daño, y con daño bajo, medio y alto se compararon con la prueba de X^2 para proporciones. En todas las comparaciones realizadas se consideró diferencia estadística cuando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación del daño basal presente en el ADN de los tres grupos de estudio: Niños Bien Nutridos (BN), Niños Bien Nutridos Infectados (BN-I) y Niños Desnutridos Infectados (DES-I)

5.1.1 Longitud de las estelas y coeficiente de dispersión

La migración del ADN en el grupo BN fluctuó de 1.5 a 3.9 μm con un promedio de 2.4 μm. Los valores del coeficiente de dispersión (H) fluctuaron entre 26.6 y 60.2, con un promedio de 41.9. En los BN-I la migración del ADN fue de 12.0 a 23.9 μm con promedio de 16.5 μm. Los valores del coeficiente de dispersión (H) fluctuaron de 19.4 a 64.6, siendo el promedio 48.0.

La migración del ADN en los DES-I varió de 19.9 a 54.1 μm con promedio de 33.5 μm. El valor mas alto de migración (54.1 μm) correspondió al niño con kwashiorkor que presentaba un 3% de déficit de peso (GMG), aún cuando este valor no estuvo muy alejado de la longitud mas alta observada en los marasmo (NCR) que fue de 51.2 μm. El otro niño con kwashiorkor tuvo una migración intermedia (30.1 μm). Los valores del coeficiente de dispersión (H) en los niños DES-I fluctuaron de 32.4 a 76.5, con promedio de 49.5. El coeficiente H en los niños con kwashiorkor fue similar al de los niños con marasmo. Los valores de la migración del ADN para los tres grupos de estudio se presentan en el Cuadro 6 y los del coeficiente H en el Cuadro 7.

La comparación estadística mostró diferencias entre las longitudes de las estelas de BN y BN-I ($p<0.00001$), y también entre las de los BN-I y DES-I ($p<0.0001$). La comparación estadística mostró que la variabilidad intercelular en relación a la longitud de las estelas, fue similar entre los niños BN, BN-I y DES-I. Evidentemente, la respuesta individual, reflejada en los valores del coeficiente H, son igualmente heterogéneas en los tres grupos de niños estudiados.

Cuadro 6. Longitud de la estela observada en cada uno de los grupos de niños estudiados

Longitud de la estela (μm) *Media ± E.E.*					
Bien Nutridos		***Bien Nutridos Infectados***		***Desnutridos Infectados***	
Muestra		***Muestra***		***Muestra***	
JJA	3.4 ± 1.7	EGE	14.9 ± 4.3	CMR	25.5 ± 4.1
CHV	3.1 ± 1.5	CCC	17.0 ± 4.1	IRP	29.2 ± 6.7
MHD	2.8 ± 1.6	JBD	22.2 ± 4.6	GGG	19.9 ± 5.1
AGR	3.4 ± 1.7	RGP	18.1 ± 4.1	NCR	51 2 ± 7.1
BMP	1.6 ± 1.1	SMY	12.0 ± 2.2	JGM	50.2 ± 6.6
SFV	2.2 ± 1.1	JVP	13.9 ± 3.6	LVP	30.1 ± 4 9
EGC	3.9 ± 2.2	LVP	12.3 ± 3.1	NBS	23.4 ± 4.8
MMG	1.8 ± 7.4	JEL	23.9 ± 5.1	FRG	28.1 ± 4.2
JFG	2.1 ± 1.3	ECD	15.8 ± 4.1	BVV	19.9 ± 4.9
EJS	1.5 ± 1.2	JPA	19.3 ± 4.8	GMG	54.1 ± 7.1
TJM	1.7 ± 1.3	KRD	17.4 ± 4.7	LPA	36.6 ± 5.9
JCM	1.5 ± 1.1	JBM	20.6 ± 4.4		
		JGC	13.9 ± 3.1		
		KFG	14.7 ±3.9		
		NCH	15.8 ± 4.2		
		RMM	12.5 ± 3.4		
Promedios ± E.E	**2.4 ± 0.2**		**16.5 ± 0.2**		**33.5 ± 3.8**

BN vs BN-I p<0.00001 ; BN vs. DES-I p<0.00001; BN-I vs DES-I p<0.0001

Cuadro 7. Coeficientes de dispersión calculados para cada uno de los grupos de niños estudiados

Coeficiente de dispersión (H)					
Bien Nutridos		***Bien Nutridos Infectados***		***Desnutridos Infectados***	
Muestra		***Muestra***		***Muestra***	
JJA	42.9	EGE	62.5	CMR	32.4
CHV	37.7	CCC	49.0	IRP	76.5
MHD	45.3	JBD	47.5	GGG	64.1
AGR	43.5	RGP	45.4	NCR	49.1
BMP	40.6	SMY	19.4	JGM	43.3
SFV	26.6	JVP	44.9	LVP	39.6
EGC	60.2	LVP	37 9	NBS	50.0
MMG	30.2	JEL	54.6	FRG	34.9
JFG	37.6	ECD	51.4	BVV	60.5
EJS	47.1	JPA	59.4	GMG	46.9
TJM	52.1	KRD	64.6	LPA	47.3
JCM	39.2	JBM	46.7		
		JGC	35.1		
		KFG	53.9		
		NCH	56.4		
		RMM	45.6		
Promedios ± E.E	**41.9 ± 2.5**		**48.0 ± 2.8**		**49.5 ± 3.4**

No se observaron diferencias significativas

5.1.2 Porcentaje de células con daño y proporción de células con daño bajo, medio y alto

Con respecto al porcentaje de células con daño (Cuadro 8), en el grupo de niños BN fluctuó de 4 a 8%, mientras que en los BN-I fue de 22 a 40%, y en los DES-I de 28 al 60%. Los promedios de células con daño para cada uno de los grupos fueron 6.2, 28.8 y 48.5% respectivamente. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de BN y BN-I ($p<0.00001$), y entre los BN-I y DES-I ($p<0.0013$). En los niños DES-I, se observó que los niños con kwashiorkor presentaron una cantidad similar de células con daño, en comparación con lo observado en los niños con marasmo.

Con relación al porcentaje de células sin daño se observó que estas se presentaron en mayor número en los niños BN que en los BN-I, y se aprecia que en los DES-I estas representaron tan sólo un poco mas del 50% (Cuadro 9). En cuanto a las células que presentaron daño bajo, medio y alto, se observó que en total en los BN representaron solamente el 6.2%. En los niños BN-I se observó un incremento notable en aquellas con daño bajo y medio, mientras que en los DES-I se observó un incremento particularmente evidente en las células que presentaron daño alto. La comparación estadística mostró diferencia significativa entre los tres grupos de niños estudiados ($p<0.001$).

El análisis del porcentaje de células con daño bajo, medio y alto observadas en cada uno de los niños mostró lo siguiente:

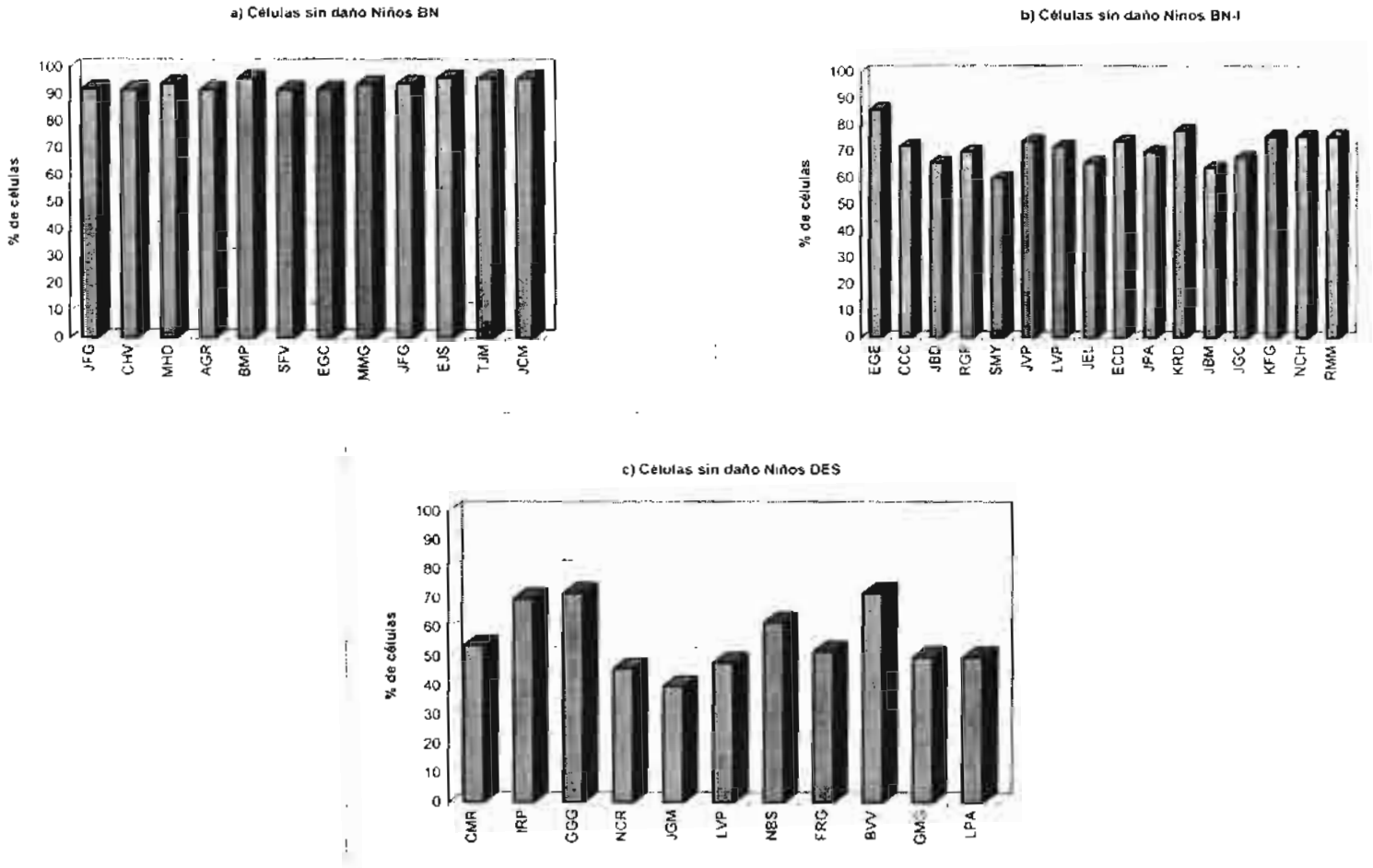
Las células sin daño (Gráfica 1) fueron mas numerosas en todos los niños BN, con porcentajes superiores al 90%, en los BN-I se observó una cantidad menor, mientras que en los niños DES-I se observaron los porcentajes mas bajos de células sin daño.

En los niños BN la frecuencia de células con daño bajo (Gráfica 2) siempre fue menor al 10% (con intervalo de 2 a 8%). En el grupo de niños BN-I se observaron porcentajes de células con daño bajo que fluctuaron entre cero y 40%. En el grupo de niños DES-I la frecuencia de células con daño bajo fluctuó entre cero y 16%.

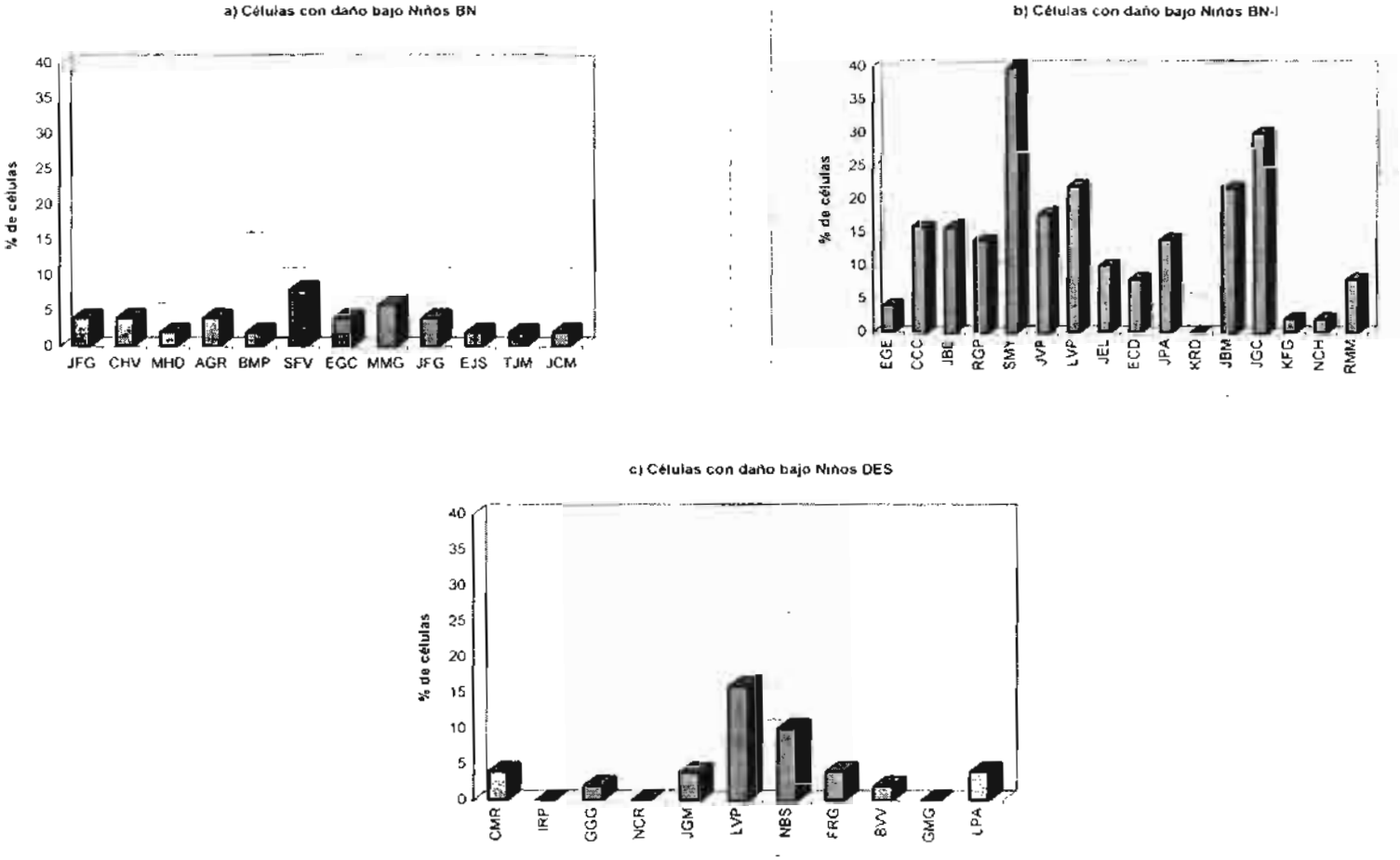
Cuadro 8. Porcentaje de células con daño observadas en cada uno de los grupos de niños estudiados

Porcentaje de células con daño					
Bien Nutridos		*Bien Nutridos Infectados*		*Desnutridos Infectados*	
Muestra		*Muestra*		*Muestra*	
JJA	8	EGE	22	CMR	46
CHV	8	CCC	28	IRP	30
MHD	6	JBD	34	GGG	28
AGR	8	RGP	30	NCR	54
BMP	4	SMY	40	JGM	60
SFV	8	JVP	26	LVP	52
EGC	8	LVP	28	NBS	38
MMG	6	JEL	34	FRG	48
JFG	6	ECD	26	BVV	28
EJS	4	JPA	30	GMG	50
TJM	4	KRD	22	LPA	50
JCM	4	JBM	36		
		JGC	32		
		KFG	24		
		NCH	24		
		RMM	24		
Promedios ± E.E	**6.2 ± 0.5**		**28.8 ± 1.3**		**48.5 ± 6.1**

BN vs BN-I p<0.00001; BN vs DES-I p< 0.0001; BN-I vs DES-I p<0.0013



Gráfica 1 . Frecuencia basal de células sin daño en el grupo de niños Bien Nutridos (BN) (a), Bien Nutridos Infectados (BN-I) (b) y en el grupo de niños Desnutridos (DES) (c)



Gráfica 2 . Frecuencia basal de células con daño bajo en el grupo de niños Bien Nutridos BN (a), Bien Nutridos Infectados (BN-I) (b) y en el grupo de niños Desnutridos (DES) (c)

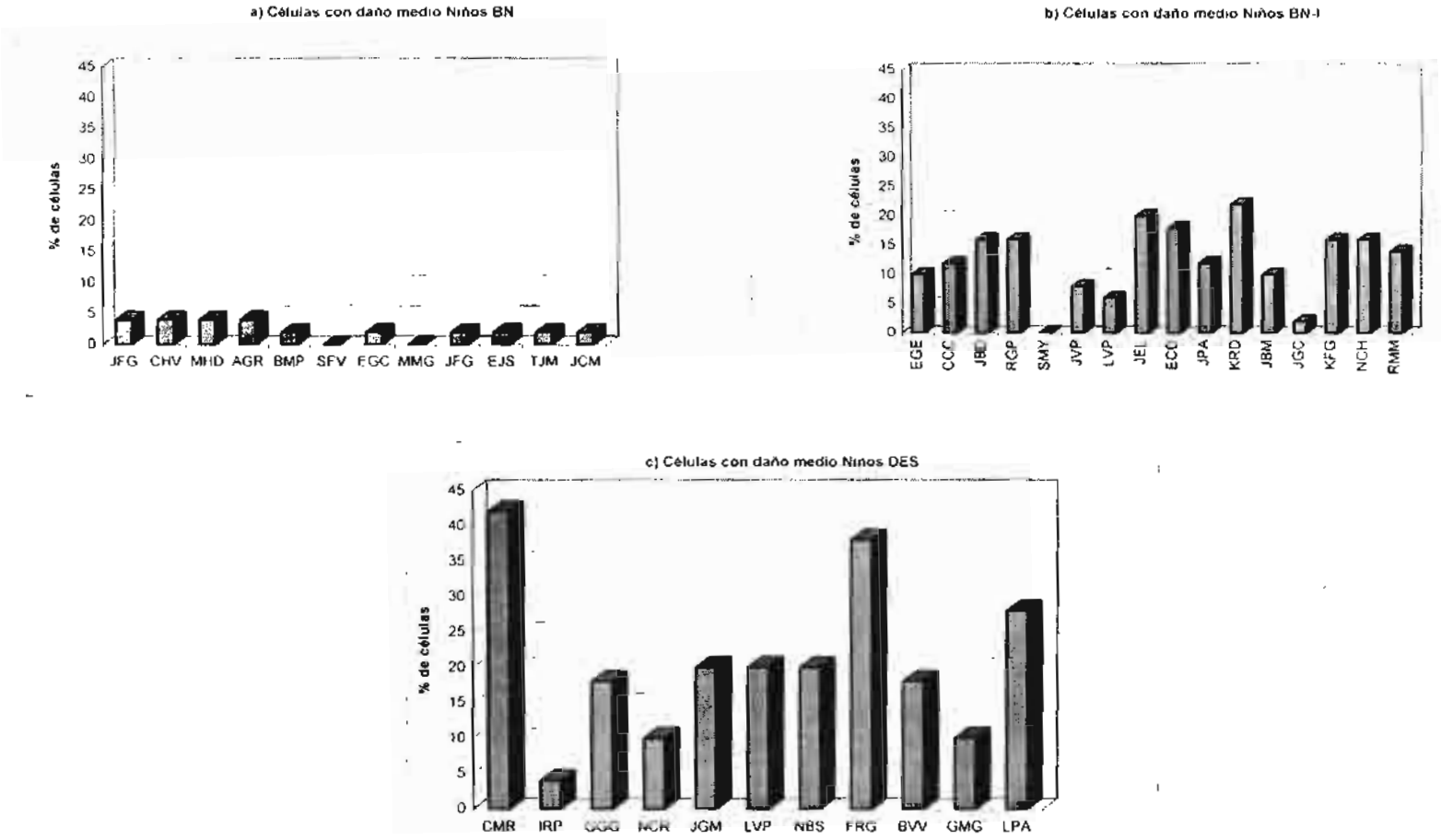
Cuadro 9. Porcentaje de células sin daño, con daño bajo, medio y alto en los tres grupos de niños estudiados

	Porcentaje de células ± E.E.		
	Bien Nutridos	*Bien Nutridos Infectados*	*Desnutridos Infectados*
Categorías			
Sin daño	93.8 ± 0.5	71.8 ± 1.6	51 6 ± 6.1
Daño bajo	3.7 ± 0.5	14.1 ± 2.7	11.5 ± 5 6
Daño medio	2.3 ± 0.4	12.4 ± 1.5	20.2 ± 3.6
Daño alto	0.2 ± 0.2	1.7 ± 0.6	16.7 ± 4 4

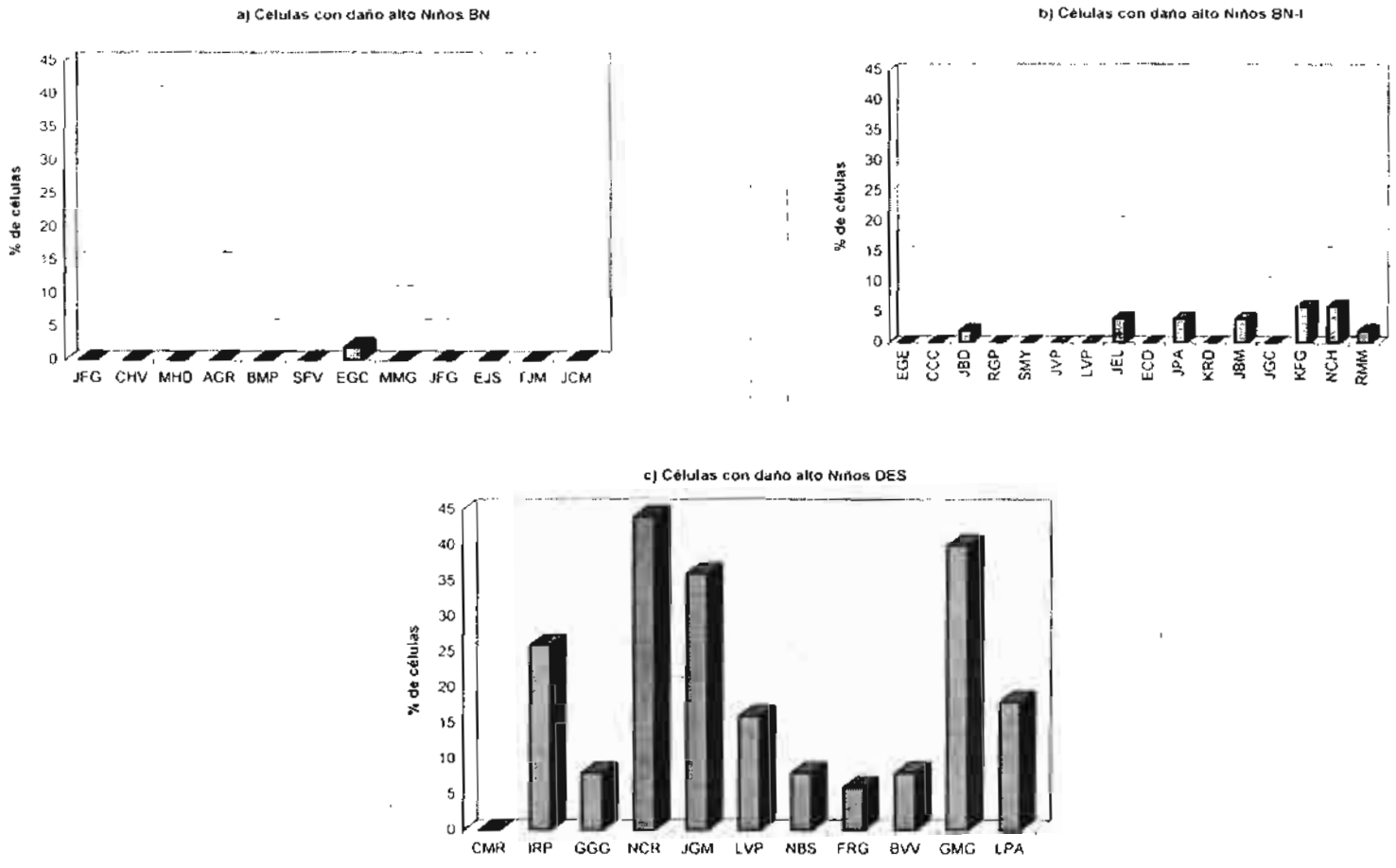
BN vs BN-I $p<0.001$; BN vs DES-I $p<0.001$; BN-I vs DES-I $p<0.001$
El promedio de células sin daño, con daño bajo, medio y alto, y el error estándar se calcularon considerando los promedios individuales de los niños que integraron cada grupo

En los niños BN el porcentaje de células con daño medio (Gráfica 3), en ningún caso fue superior al 5%. En los niños BN-I, se observaron frecuencias menores al 22%. En los niños DES-I se observaron entre 4 y 41% de células con daño medio.

Con relación al porcentaje de células con daño alto (Gráfica 4) sólo un niño BN presentó un 2%. Del total de 16 niños BN-I, siete presentaron células con daño alto, con frecuencias menores al 6%. En el grupo de niños DES-I, 10 de 11 presentaron células con daño alto en porcentajes de 6 a 44%. Con respecto al porcentaje de células sin daño, con daño bajo, medio y alto, los niños con desnutrición de tipo kwashiorkor no fueron particularmente diferentes a los niños con marasmo.



Gráfica 3 Frecuencia basal de células con daño medio en el grupo de niños Bien Nutridos (BN) (a), Bien Nutridos Infectados (BN-I) (b) y en el grupo de niños Desnutridos (DES) (c)



Gráfica 4 . Frecuencia basal de células con daño alto en el grupo de niños Bien Nutridos (BN) (a), Bien Nutridos Infectados (b) y en el grupo de niños Desnutridos (DES) (c)

5.2 Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BN-IT y DES-IT)

5.2.1 Longitud de las estelas, coeficiente de dispersión, porcentaje de células con daño y proporción de células con daño bajo, medio y alto antes del tratamiento con medicamentos

La longitud de las estelas, los valores del coeficiente de dispersión y el porcentaje de células dañadas observados antes del tratamiento en los niños BN-I y en los DES-I se presentan en el Cuadro 10. En este se observa que la longitud de las estelas fluctuó en los niños BN-I entre 13.9 μm y 20.6 μm, con un promedio de 16.5 μm. En los niños DES-I estas fluctuaron de 19.9 a 51.2 μm, con un promedio de 35.1 μm. La prueba estadística estableció diferencia entre ambos grupos ($p<0.006$).

Con respecto al coeficiente de dispersión (Cuadro 10), se observó que en los BN-I fluctuó de 35.1 a 62.5, con un promedio de 52.3. En los DES-I el valor de H fluctuó entre 43.3 y 76.5, con un promedio de 55.1. No se encontró diferencia estadística entre estos valores.

Con relación a la cantidad de células con daño (Cuadro 10) se apreció en los BN-I una variación de 22 a 36%, y en los DES-I de 28 a 60%, los promedios respectivos fueron 28.0 y 43.3%. La comparación estadística mostró diferencia entre la cantidad de células con daño observadas en los niños BN-I, en relación a las observadas en los DES-I ($p<0.04$).

La frecuencia de células sin daño, con daño bajo, daño medio y daño alto antes del tratamiento, se presentan en el Cuadro 11. Se aprecia que la frecuencia de células con daño bajo fue mayor en los niños BN-I, mientras que la proporción de células con daño alto fue casi cuatro veces mayor en los niños DES-I, en comparación con los BN-I. La comparación estadística mostró que hay diferencia ($p<0.001$) entre la proporción de células sin daño, con daño bajo, con daño medio y con daño alto, observadas en los niños BN-I en comparación con los niños DES-I.

Cuadro 10. Longitud de la estela, coeficiente de dispersión y porcentaje de células con daño en el grupo de niños Bien Nutridos Infectados (BN-I) y en el de Desnutridos Infectados (DES-I), antes del tratamiento con medicamentos

Bien Nutridos Infectados				*Desnutridos Infectados*			
Muestra	*Long. de la estela (μm) Promedio ± E.E.*	*Coeficiente de dispersión (H)*	*% de células con daño*	*Muestra*	*Long. de la estela (μm) Promedio ± E.E.*	*Coeficiente de dispersión (H)*	*% de células con daño*
EGE	14.9± 4.3	62.5	22	IRP	29.2 ± 6.7	76.5	30
JPA	19.3 ± 4.8	59.4	30	GGG	19.9 ± 5.1	64.1	28
JBM	20.6 ± 4.3	46.6	36	NCR	51.2 ± 7.1	49.1	54
JGC	13.9 ± 3.1	35.1	32	JGM	50.2 ± 6.6	43.3	60
NCH	15.7 ± 4.2	56.4	24	NBS	23.4 ± 4.8	50.0	38
KFG	14.7 ± 4.1	53.9	24	LPA	36.6 ± 5.9	47.3	50
Promedio ± EE	**16.5 ± 4.1**	**52.3 ± 4.1**	**28.0 ± 2.2**	Promedio ± EE	**35.1 ± 5.4**	**55.1 ± 5.2**	**43.3 ± 5.4**

Longitud de la estela BN-I vs DES-I $p<0.006$
Porcentaje de células con daño BN-I vs DES-I $p<0.04$

Cuadro 11. Porcentaje de células sin daño, con daño bajo, medio y alto en los niños Bien Nutridos Infectados (BN-I) y Desnutridos Infectados (DES-I) antes del tratamiento con medicamentos

	Porcentaje de células ± E.E.	
	Bien Nutridos Infectados	*Desnutridos Infectados*
Categorías		
Sin daño	72.0 ± 2.2	56.7 ± 5.4
Daño bajo	6.3 ± 2.3	3.3 ± 1 5
Daño medio	15.7 ± 1.4	16.7 ± 3.4
Daño alto	6.0 ± 0.9	23.3 ± 6.0

$p<0.001$
El promedio de células sin daño, con daño bajo, medio y alto, y el E.E. se calcularon considerando los promedios individuales de los niños que integraron cada grupo

5.2.2 Longitud de las estelas, coeficiente de dispersión, porcentaje de células con daño y proporción de células con daño bajo, medio y alto después del tratamiento con medicamentos

Después del tratamiento con medicamentos se observó, en ambos grupos un incremento en la longitud de las estelas. En los BN-I los valores fluctuaron de 18.3 a 41.6 μm, con un promedio de 28.8 μm (Cuadro 12). En los niños DES-I la longitud de las estelas fluctuó entre 46.6 y 79.5 μm, siendo el promedio de 62.8 μm. La prueba estadística mostró diferencia significativa entre ambos grupos ($p<0.003$). También se observó diferencia estadística entre las longitudes de las estelas antes y después del tratamiento con medicamentos, en el grupo de niños BN-I ($p<0.01$) y en el grupo de niños DES-I ($p<0.02$).

La longitud promedio de las estelas se incrementó en los niños BN-I de 16.5 (antes del tratamiento) a 28.8 μm (después del tratamiento). De la misma manera en los DES-I la longitud de las estelas incrementó de 35.1 a 62.8 μm. El incremento observado entre antes y después del tratamiento en el grupo de BN-I fue de 12.3 μm y en los DES-I de 27.7 μm, esto es un incremento dos veces mayor en los niños DES-I.

El coeficiente de dispersión (Cuadro 12) fluctuó en los BN-I de 33.9 a 79.9, mientras que en los DES-I fue de 29.9 a 83.5, con promedios de 45.6 y 59.8 respectivamente, aún cuando se observa que el coeficiente H disminuyó en los niños bien nutridos después del tratamiento, en relación al valor obtenido antes del mismo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Esto implica que el tratamiento con medicamentos no afectó la heterogeneidad de la longitud de las estelas observada previamente al tratamiento en los niños estudiados. Esto es, las poblaciones celulares de cada individuo tienen una respuesta similar, tanto antes como después del tratamiento.

El porcentaje de células con daño (Cuadro 12) fluctuó en los BN-I de 26 a 60% con un promedio de 43.3%, y en los DES-I de 40 a 96% con un promedio de 60.7%. La comparación estadística mostró que no hay diferencia entre el porcentaje de células con daño observadas en los grupos de niños BN-I y DES-I.

Cuadro 12. Longitud de la estela, coeficiente de dispersión y porcentaje de células con daño en el grupo de niños bien nutridos infectados (BN-I) y en el de desnutridos infectados (DES-I), después del tratamiento con medicamentos

Bien Nutridos Infectados				*Desnutridos Infectados*			
Muestra	*Long. de la estela (μm) Promedio ± E.E.*	*Coeficiente de dispersión (H)*	*% de células con daño*	*Muestra*	*Long. de la estela (μm) Promedio ± E.E.*	*Coeficiente de dispersión (H)*	*% de células con daño*
EGE	24.1 ± 6.2	79.9	26	IRP	51.8 ± 9.2	82.4	42
JPA	41.6 ± 5.4	35.1	60	GGG	48.9 ± 9.0	83.5	40
JBM	18.3 ± 3.9	40.8	34	NCR	79.5 ± 6.9	29 9	96
JGC	27.5 ± 4.3	33.9	50	JGM	75.0 ± 7.7	39.2	78
NCH	34.3 ± 5.8	49.5	44	NBS	46.6 ± 8.3	74.6	42
KFG	27.1 ± 4.3	34.1	46	LPA	74.9 ± 8.6	49.3	66
Promedio ± EE	**28.8 ± 4.9**	**45.6 ± 7.2**	**43.3 ± 4.9**	**Promedio ± EE**	**62.8 ± 6.2**	**59.8 ± 9.5**	**60.7 ± 9.5**

Longitud de la estela BN-I vs DES-I $p<0.003$

Con relación a la cantidad de células sin daño, con daño bajo, medio y alto, después del tratamiento con medicamentos (Cuadro 13), se observó nuevamente que los niños BN-I presentaron la mayor frecuencia de células sin daño y que el porcentaje de células con daño alto fue casi cuatro veces mayor en los niños DES-I en comparación con los BN-I. Se estableció diferencia estadísticamente significativa ($p<0.001$) entre los porcentajes de células sin daño, con daño bajo, daño medio y daño alto, observadas en ambos grupos de niños estudiados después del tratamiento con medicamentos. También se obtuvo diferencia estadística entre los porcentajes de los diferentes niveles de daño observados antes y después del tratamiento, tanto en el grupo de niños BN-I ($p<0.05$) y en el grupo de niños DES-I ($p<0.001$).

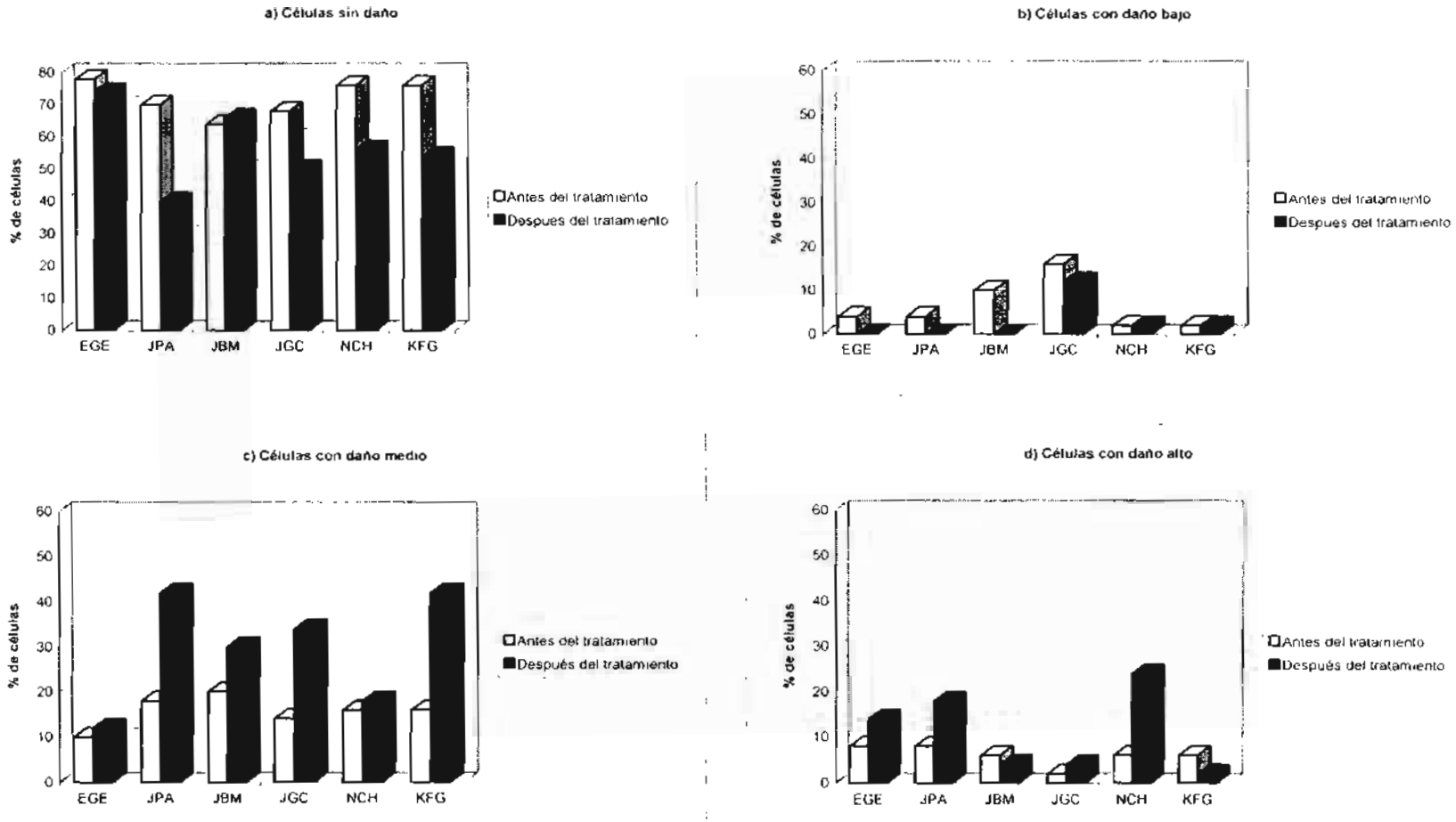
Cuadro 13. Porcentaje de células sin daño, con daño bajo, medio y alto en los niños bien nutridos infectados (BN-I) y desnutridos infectados (DES-I) después del tratamiento con medicamentos

	Porcentaje de células ± E.E.	
	Bien Nutridos Infectados	*Desnutridos Infectados*
Categorías		
Sin daño	56.7 ± 4.9	39.3 ± 9.5
Daño bajo	2.7 ± 1.9	1.0 ± 1.0
Daño medio	29.7 ± 5.1	19.7 ± 9.5
Daño alto	11.0 ± 3.7	40.0 ± 3.9

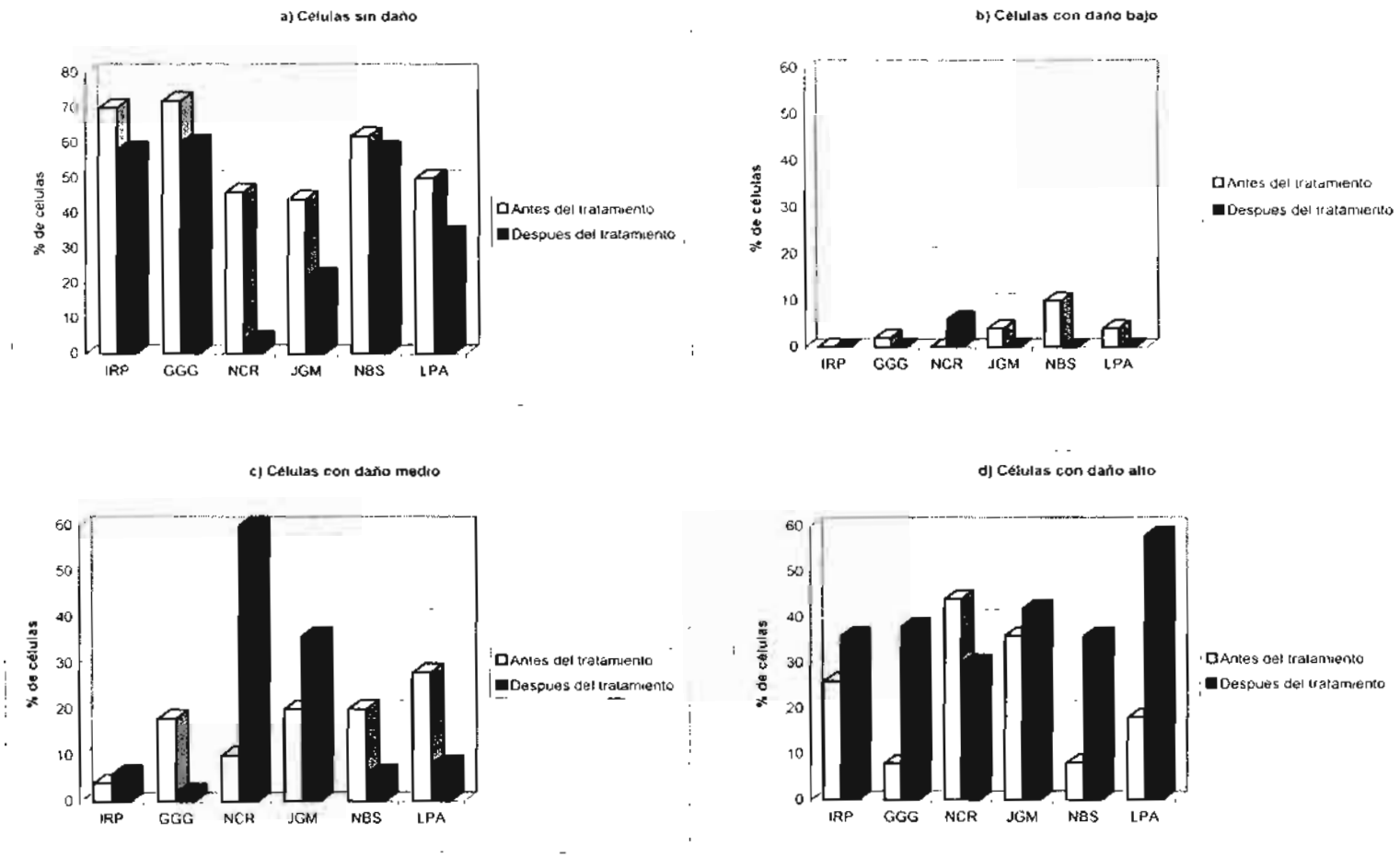
BN-I vs. DES-I $p<0.001$
El promedio de células sin daño, con daño bajo, medio y alto, y el E.E. se calcularon considerando los promedios individuales de los niños que integraron cada grupo

El análisis de la proporción de células sin daño, con daño bajo, medio y alto en cada uno de los niños, mostró que la cantidad de células con daño bajo fue mayor en los niños BN-I (Gráfica 5), tanto antes como después del tratamiento, en comparación con lo que se observó en los DES-I (Gráfica 6). Con relación a las células con daño medio, se incrementaron en todos los niños BN-I después del tratamiento, observándose un comportamiento similar en tres niños DES-I, con un incremento particularmente alto en uno de ellos (NCR), que mostró el mayor porcentaje de células con daño medio. Los otros tres niños DES-I mostraron una considerable disminución de las células con daño medio. Claramente en los niños DES-I se observó, tanto antes como después del tratamiento, el mayor porcentaje de células con daño alto. Después del tratamiento, cinco niños DES-I mostraron un incremento en estas células, el que fue particularmente evidente en tres niños (GGG, NBS y LPA), uno mas (NCR) mostró una disminución en el porcentaje de células con daño alto, asociado con un incremento notorio en las de daño medio. En los niños BN-I las células con daño alto fueron menos numerosas que en los DES-I. Después del tratamiento dos niños BN-I (JBM y KFG) mostraron una disminución, mientras que en cuatro hubo incremento en el porcentaje de células con daño alto. Después del tratamiento sólo un niño BN-I (NCH) mostró un porcentaje de células con daño alto

ARCHIVO HISTORICO



Gráfica 5. Porcentajes de células sin daño(a), con daño bajo (b), con daño medio c) y con daño alto (d), en el grupo de niños Bien Nutridos Infectados antes y después del tratamiento con medicamentos



Gráfica 6. Porcentajes de células sin daño (a), con daño bajo (b), con daño medio c) y con daño alto (d), en el grupo de niños Desnutridos (DES) antes y después del tratamiento con medicamentos

ligeramente mayor al 20%, en los niños DES-I estas células representaron en todos los casos mas del 30%.

5.3 Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en linfocitos de niños bien nutridos (BN), bien nutridos infectados (BN-I) y desnutridos infectados (DES-I)

5.3.1 Niveles de daño antes y después del tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La viabilidad celular evaluada con el método de diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio, fue en todos los casos mayor a 95%.

Después del tratamiento con H_2O_2 en los tres grupos de niños estudiados se observó, un incremento en la longitud de las estelas y en el porcentaje de células con daño. No obstante, es evidente que el tratamiento con H_2O_2 afectó mayormente a las células de los niños BN-I y de los DES-I, y en menor proporción a las de los BN.

Las tendencias observadas durante la cinética de reparación del ADN, en los tres grupos de estudio fueron similares, ya que tanto el promedio de la migración del ADN como la proporción de células con daño, disminuyeron conforme transcurrió el tiempo de incubación. También es claro, que ambos parámetros disminuyeron mas lentamente en el grupo de niños DES-I comparativamente con lo que se observó en los dos grupos de niños BN.

En cuanto al promedio de la longitud de las estelas al tiempo cero (inmediatamente después del tratamiento con H_2O_2), en los niños BN fue de 45.8 μm, mientras que a los 60 minutos de reparación el promedio de 8.5 μm. Para los BN-I los promedios respectivos a cero y 60 minutos fueron 77.7 μm y 12.0 μm. Los niños DES-I mostraron a los cero minutos un promedio de 93.7 μm, y a los 60 minutos de 41.4 μm. Se observaron diferencias estadísticas en todos los tiempos, entre los grupos BN y BN-I, mientras que entre BN-I y DES-I no se observó diferencia entre las longitudes de las estelas inmediatamente después de la exposición al H_2O_2, sin embargo después de 5, 15,

30 y 60 minutos de incubación, la diferencia se hizo estadísticamente significativa. El promedio de cada uno de los tiempos de reparación para cada uno de los grupos estudiados se muestra en el Cuadro 14.

La longitud de las estelas antes del tratamiento con H_2O_2 (nivel basal) tuvo en los BN un promedio de 2.7 μm. En los BN-I el promedio fue de 18.2 μm. Finalmente en el grupo de niños DES-I la migración del ADN fue en promedio de 27.2 μm. Se estableció diferencia significativa entre BN y BN-I, y entre BN-I y DES-I (Cuadro 14).

Cuadro 14. Promedio de la longitud de las estelas (antes y después de la exposición al peróxido de hidrógeno) y capacidad reparativa promedio en los niños Bien Nutridos, Bien Nutridos Infectados y Desnutridos Infectados

	Longitud de las estelas (μm)					
	Bien Nutridos		*Bien Nutridos Infectados*		*Desnutridos Infectados*	
	Promedio[a]	*Capacidad reparativa[b]*	*Promedio[a]*	*Capacidad reparativa[b]*	*Promedio[a]*	*Capacidad reparativa[b]*
Control antes del tratamiento (Basal)	2.7 (2-4)		18.2 (14-24)*		27.2 (20-54)**	
Tiempo de incubación						
0 min	45.8 (32-56)		77.7 (53-94)*		93.7 (64-129)	
5 min	32.0 (24-55)	28.7	54.0 (37-75)*	30.2	75.1 (55-120)**	19.9
15 min	22.7 (14-42)	50.3	36.8 (26-41)*	52.0	61.8 (48-92)**	31.4
30 min	14.5 (7-25)	67.4	25.2 (18-31)*	67.3	54.7 (42-76)**	41.1
60 min	8.5 (5-11)	79.7	12.0 (8-15)*	84.3	41.4 (31-63)**	55.2

[a] Los intervalos se expresan entre paréntesis.
[b] La capacidad reparativa se define como la disminución relativa (%) de la migración del ADN después de 5, 15, 30 y 60 minutos de tratamiento con peróxido de hidrógeno.
* Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con el grupo de niños bien nutridos.
** Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con el grupo de niños bien nutridos infectados.

El porcentaje de células con daño en el grupo de niños BN (Cuadro 15), al tiempo cero de incubación fue en promedio de 66%, mientras que a los 60 minutos de reparación el promedio fue de 16.3%. En los niños BN-I al tiempo cero y a los 60 minutos los promedios correspondientes fueron 88.3% y 29.3%. Finalmente en los niños DES-I, al

tiempo cero el porcentaje de células dañadas fue en promedio de 97.7%, y a los 60 minutos disminuyeron llegando a un promedio de 59.4%. El análisis estadístico mostró una disminución significativa en el porcentaje de células con daño en todos los tiempos de reparación, entre los BN y los BN-I, lo que no ocurrió entre BN-I y DES-I, entre estos dos grupos las diferencias sólo se presentaron a los 30 y 60 minutos de reparación.

Cuadro 15. Promedio del porcentaje de células dañadas (antes y después de la exposición al peróxido de hidrógeno) y capacidad reparativa promedio en los niños Bien Nutridos, Bien Nutridos Infectados y Desnutridos Infectados

	Porcentaje de células con daño					
	Bien Nutridos		*Bien Nutridos Infectados*		*Desnutridos Infectados*	
	Promedio[a]	*Capacidad reparativa*[b]	*Promedio*[a]	*Capacidad reparativa*[b]	*Promedio*[a]	*Capacidad reparativa*[b]
Control antes del tratamiento (Basal)	5.7 (4-8)		30.0 (20-36)*		39.3 (28-50)	
Tiempo de incubación						
0 min	66.0 (58-76)		88.3 (70-96)*		97.7 (90-100)	
5 min	49.7 (46-54)	23.9	80.7 (60-84)*	14.0	86.0 (82-100)	11.7
15 min	39.3 (32-50)	39.8	65.0 (50-78)*	26.5	78.3 (68-100)	17.8
30 min	28.3 (18-34)	56.3	49.7 (38-50)*	43.9	70.3 (62-90)**	25 3
60 min	16.3 (10-20)	74.7	29.3 (20-38)*	66.8	59.4 (50-80)**	36.9

[a] Los intervalos se expresan en paréntesis.
[b] La capacidad reparativa se define como la disminución relativa (%) de la cantidad de células con daño después de 5, 15, 30 y 60 minutos de tratamiento con peróxido de hidrógeno.
* Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con el grupo de niños bien nutridos.
** Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con el grupo de niños bien nutridos infectados

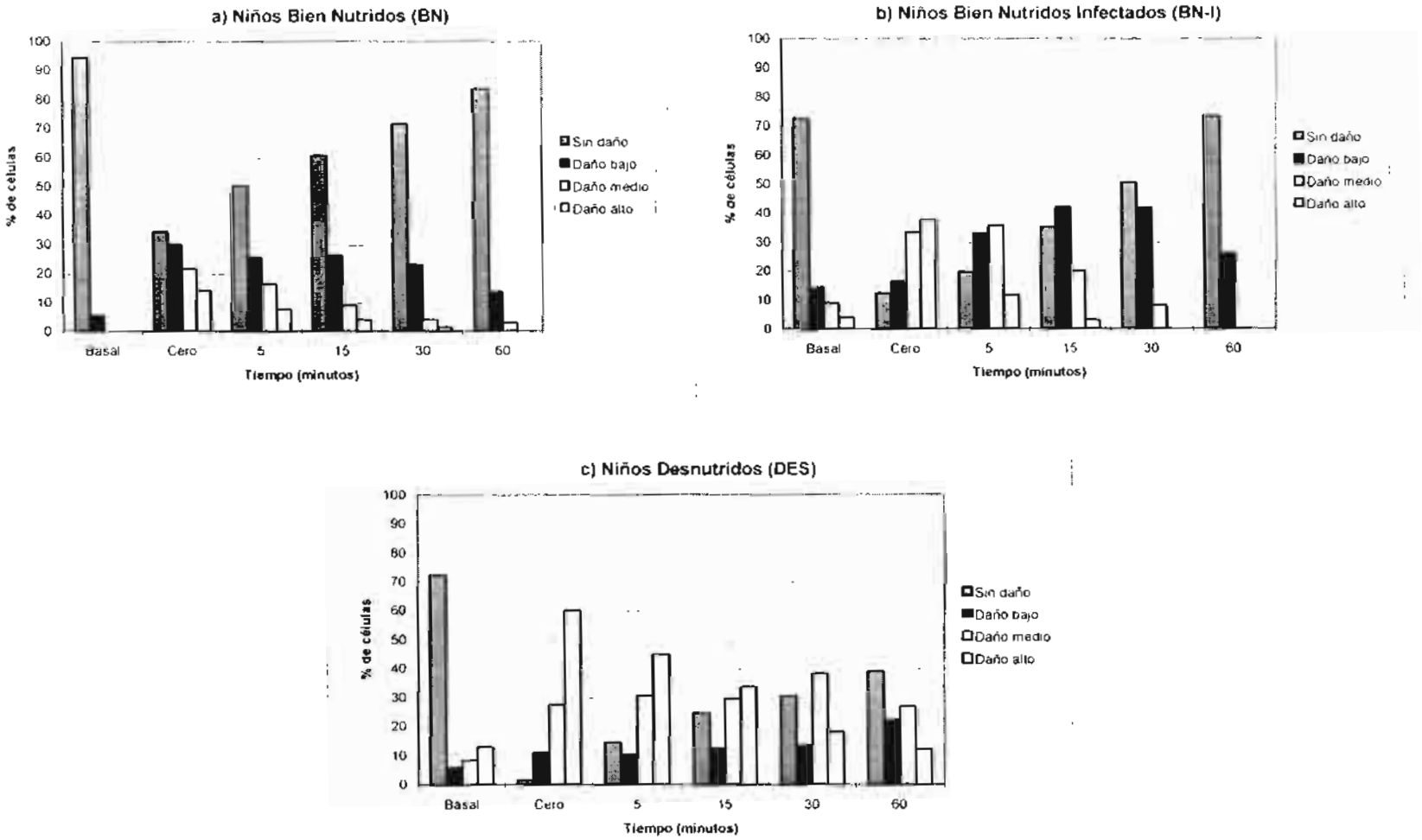
El porcentaje basal (observado antes del tratamiento con H_2O_2) de células dañadas (Cuadro 15) en los niños BN tuvo un promedio de 5.7%. En el grupo BN-I se observó un promedio de 30%. En los niños DES-I la cantidad de células dañadas fue en promedio de 39.3%. En relación al porcentaje de células con daño se observó diferencia significativa entre BN y BN-I, pero no entre BN-I y DES-I.

En la Gráfica 7 se muestran la proporción de células que correspondió a cada una de las categorías que se establecieron de acuerdo a los criterios señalados en la metodología y que se utilizaron para clasificar a los cometas como: sin daño, daño bajo, medio y alto. Se observa una clara tendencia en los DES-I a presentar un mayor número de células en los niveles medio y alto en todos los puntos del estudio e incluso en el nivel basal. En los niños BN los porcentajes de células con daño medio y alto (valores basales) fueron sólo 0.6%. Mientras que en los niños BN-I las células con daño medio incrementaron a 9% y las con daño alto fueron 4% en promedio. Los niños DES-I presentaron un incremento notable en las células con daño alto (13%).

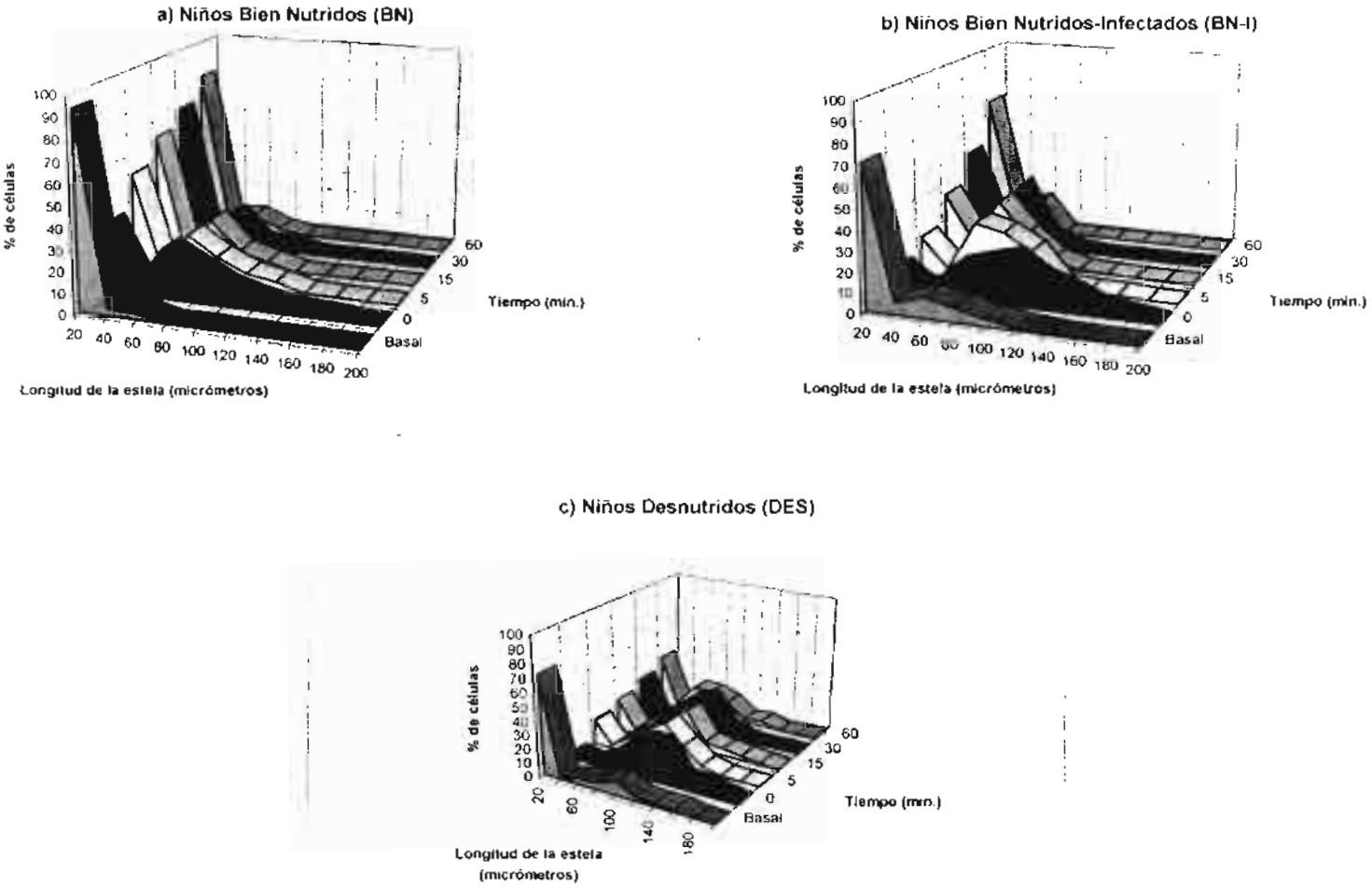
Inmediatamente después de la exposición al H_2O_2 (tiempo cero) en los niños BN se observaron 30.0, 21.6 y 14.0% respectivamente de células con daño bajo, medio y alto. En los BN-I los porcentajes que correspondieron a cada una de las categorías antes señaladas fueron 16.4, 33.6 y 37.8%, en los niños DES-I se observó un 11.0% de células con daño bajo, 27.5 con daño medio y 60.0% con daño alto. En este tiempo sólo se detectó diferencia significativa entre BN y BN-I. No obstante, a 5, 15, 30 y 60 minutos de incubación sí se observaron diferencias entre BN-I y los DES-I. A cinco minutos de reparación en los niños BN se observaron 16.4% de células con daño medio y 7.6% con daño alto, en los niños BN-I estos porcentajes fueron 35.6 y 11.6%, mientras que en los DES-I fueron 30.4 y 44.8%.

Después de 60 minutos de reparación, los niños BN presentaron 13.4% de células con daño bajo, 3% de células con medio y cero por ciento de células con daño alto, mientras que en los niños BN-I los valores fueron 26.4, 0.2 y cero por ciento respectivamente y en los DES-I 22.4, 26.8 y 12.0% de células con daño bajo, medio y alto. Estos datos indican que en los niños DES-I la fracción de células con daño medio fueron 3 y 13 veces mayores que las observadas en los niños BN a 5 y 60 minutos de incubación. Los niños DES-I claramente mostraron el mayor porcentaje de células con daño, y la mayor proporción de células con daño medio y alto, en todos los tiempos estudiados.

Las gráficas de la distribución de las longitudes de migración del ADN de los tres grupos de estudio (Gráfica 8) mostraron la presencia de dos picos, tanto en los diferentes



Gráfica 7. Proporción promedio de células sin daño, con daño bajo, medio y alto, antes y después del tratamiento con peróxido de hidrógeno en los tres grupos de estudio



Gráfica 8. Distribución de las longitudes de las estelas de los cometas antes y después del tratamiento con peróxido de hidrógeno, y en los diferentes tiempos de reparación del daño al ADN en los tres grupos de estudio

tiempos de reparación como en la evaluación basal, que podrían estar representando diferentes poblaciones celulares, una con bajo daño y la otra con mayor migración del ADN, esto podría implicar una diferente sensibilidad de estas poblaciones celulares a ser dañadas. Adicionalmente, como puede observarse en la Gráfica 8, es claro que los niños DES-I presentan una población de células con migraciones de aproximadamente 100 μm, que en el grupo de los BN o de los BN-I no se detectó.

5.3.2 Capacidad reparativa (CR)

En los tres grupos de niños se observó que los valores de la CR incrementaron conforme el tiempo de incubación avanzó, tanto en la migración del ADN (Cuadro 14), como en el porcentaje de células con daño (Cuadro 15). Sin embargo aunque las tendencias fueron similares, es claro que la CR en el grupo de niños DES-I fue siempre inferior a las de los dos grupos de niños bien nutridos. Un dato interesante es que la CR evaluada por la migración del ADN, fue muy similar entre los dos grupos de niños BN, mientras que en el grupo DES-I esta CR se vio francamente disminuida. En cuanto a la CR evaluada por el porcentaje de células con daño, los valores de los dos grupos de niños BN no fueron tan semejantes entre sí, sin embargo, tendieron a ser claramente mas altos que los observados en los niños DES-I.

A cinco minutos de reparación, la CR evaluada a partir de la disminución de la longitud de las estelas, tuvo los siguientes valores: 28.7 en los niños BN, 30.2 en los BN-I y sólo 19.9 en los niños DES-I (Cuadro 14). A los quince minutos la CR incrementó un 20% en ambos grupos de niños bien nutridos (50.3 y 52.0 para los BN y los BN-I respectivamente) mientras que en los niños DES-I este incremento sólo fue del 11.5% (promedio 31.4). A los sesenta minutos de reparación, la CR fue de 79.7 en los niños BN, 84.3 en los BN-I y sólo 55.2 en los niños DES-I. Esto valores indican la proporción en que disminuyó la longitud de las estelas en las células de cada uno de los grupos de estudio, durante los diferentes tiempos de reparación.

Al evaluar la CR calculada a partir del porcentaje de células con daño, a cinco minutos de reparación se observaron los siguientes valores: 23.9, 14.0 y 11.7, para los grupos de niños BN, BN-I y DES-I respectivamente. Estos valores incrementaron

progresivamente conforme el tiempo de reparación aumentó, y a los sesenta minutos, se tuvieron claras diferencias, con un valor de CR en los niños BN de 74.7, mientras que en los BN-I fue de 66.8 y en los DES-I de tan solo 36.9. Esto significa que en los niños DES-I la proporción de células que reparó totalmente el daño que se les indujo con H_2O_2, fue menor a la proporción observada en los niños BN y BN-I.

Para mostrar que las diferencias encontradas en la CR de los diferentes grupos, no estuvo determinada por los daños basales observados, la migración basal del ADN fue restada a la migración promedio observada al tiempo cero, en cada uno de los grupos estudiados. Así, la migración promedio corregida fue de 43.1 μm para los niños BN, 59.5 μm para los BN-I y 66.5 μm para los niños DES-I. Estos valores muestran la sensibilidad de las células de los diferentes grupos al daño inducido por peróxido de hidrógeno, y pueden corresponder a las estimaciones del tiempo cero. Comparando estos valores con los obtenidos a los 60 minutos de reparación, la migración del ADN disminuyó de 43.1 a 8.5 μm en los niños BN, esto implica que la longitud final representó sólo una quinta parte de la longitud inicial. En los BN-I la longitud de las estelas fue de 59.5 μm a 12 μm, al igual que en el caso anterior la longitud final representó la quinta parte de la inicial. En el grupo de niños DES-I la longitud inicial de las estelas fue de 66.5 μm y la final de 41.4 μm, en este grupo no se alcanza ni la mitad de la longitud inicial. Esto indica que los niños bien nutridos, infectados o no infectados, muestran una CR similar, mientras que esta función está claramente disminuida en los niños DES-I.

5.3.3 Coeficiente de dispersión (H)

Los valores del coeficiente H (Cuadro 16) observados antes del tratamiento (basales) fueron más altos en los grupos BN-I (52.2) y DES-I (50.3), que en el BN (44.0), aunque sin diferencia estadística, estos valores indican una mayor heterogeneidad de las longitudes de la migración del ADN en las muestras de los dos grupos de niños que presentaban infecciones.

Después del tratamiento con H_2O_2 (tiempo cero) los valores del coeficiente H disminuyeron en los tres grupos de niños estudiados, indicando que los niveles de daño

se hicieron mas homogéneos, es decir, los valores de migración del ADN en los diferentes niños que formaban un mismo grupo fueron más parecidos entre sí. El tiempo cero, es el único punto en el que los valores de H mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos de estudio, lo que estaría indicando que las células de los niños respondieron de manera diferente al H_2O_2 dependiendo del grupo al que pertenecían.

En el caso de los desnutridos el valor de H disminuyó considerablemente con relación a lo observado antes del tratamiento, lo que implica que un número grande de células tendieron a presentar longitudes de estelas similares, y como puede observarse en la Gráfica 8 estas fueron mayores a las observadas en los dos grupos de niños bien nutridos (BN y BN-I). A este tiempo cero, el coeficiente H fue significativamente menor en los niños DES-I (9.2), en comparación con los niños BN y BN-I (28.0 y 22.0 respectivamente).

El coeficiente H (Cuadro 16) se incrementó gradualmente a los 5, 15, 30 y 60 minutos de reparación y no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. El incremento en los valores de H al aumentar el tiempo de reparación, tal vez implica una respuesta heterogénea de las diferentes subpoblaciones celulares al reparar el ADN. A los cinco minutos de incubación los valores del coeficiente H fueron 34.0, 22.4 y 20.1 para los niños BN, BN-I y DES-I respectivamente. A los 60 minutos estos valores incrementaron a 40.3, 31.6 y 34.1 en los grupos BN, BN-I y DES-I.

Cuadro 16. Promedios del coeficiente de dispersión (H) en los diferentes grupos de estudio. Se presentan los valores basales, y los obtenidos después del tratamiento con peróxido de hidrógeno, en los diferentes tiempos de reparación

	Coeficiente de dispersión (H) ± EE		
	Bien Nutridos	*Bien Nutridos Infectados*	*Desnutridos Infectados*
Control antes del tratamiento (Basal)	44.0 ± 1.1	52.2 ± 1.4	50.3 ± 1.9
Tiempo de incubación			
0 min	28.0 ± 1.6	22.8 ± 1.5*	9.2 ± 1.0**
5 min	34.0 ± 1.8	22.4 ± 2.0	20.1 ±1.4
15 min	34.1 ± 1.4	24.2 ± 0.9	26.2 ± 0.8
30 min	36.0 ± 1.4	27.1 ± 1.1	29.1 ± 0.9
60 min	40.3 ± 1.7	31.6 ± 0.9	34.1 ± 0.9

* Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con el grupo de niños bien nutridos.
** Diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con el grupo de niños bien nutridos infectados

6. DISCUSIÓN

6.1 Evaluación del daño basal presente en el ADN en los tres grupos de estudio: Niños Bien Nutridos (BN), Niños Bien Nutridos Infectados (BN-I) y Niños Desnutridos Infectados (DES-I)

El análisis de los datos de la migración del ADN y del número de células con daño, obtenidos en los niños BN, BN-I y DES-I antes del tratamiento con peróxido de hidrógeno (daño basal), permitió valorar el nivel de daño inducido al ADN por las infecciones y por la desnutrición.

Los datos obtenidos en esta parte del estudio mostraron que las infecciones contribuyeron a incrementar el daño en el ADN, por otro lado, se infiere que el daño adicional observado en los niños DES-I esta asociado a la presencia de la desnutrición, debido a que no se contó con un grupo de niños desnutridos no infectados. En la longitud de las estelas se puede apreciar que la longitud basal promedio observada en los niños BN-I fue casi siete (6.8) veces mayor que la de los niños BN. Este incremento en el daño al ADN estaría directamente relacionado con las infecciones bacterianas, ya que estos niños no se encontraban tomando medicamentos al momento en que se les extrajo la muestra de sangre para realizar el estudio. En los niños DES-I se observó que la longitud de las estelas fue casi catorce (13.9) veces mayor que en los BN, esto es un incremento dos veces mayor al que se observó en los BN-I. Estos resultados parecen indicar que hay un efecto aditivo en el daño al ADN, determinado por la presencia de las infecciones y de la desnutrición. Los resultados aquí obtenidos confirman lo reportado en un estudio previo en el que por medio del ensayo cometa se estableció, que las infecciones graves y la desnutrición son dos factores que están relacionados con un claro incremento del daño al ADN (Betancourt et al., 1995).

El análisis de los porcentajes de las células con daño mostró que estas fueron mas numerosas en los niños que presentaron desnutrición y/o infecciones. Así, se observó que el porcentaje de células con daño fue 4.6 veces mayor en los niños BN-I que en los BN, mientras que esta proporción incrementó en los DES-I 1.6 veces en relación con los niños BN-I.

Los porcentajes de células con daño bajo, medio y alto, particularmente las de las dos últimas categorías fueron claramente mas numerosas en los niños DES-I, lo que implica que estos niños tuvieron la mayor cantidad de células con niveles altos de daño en el ADN. Se buscó la correlación entre la longitud de las estelas y/o la cantidad de células con daño, con respecto al número de infecciones o al tipo de infecciones asociadas en cada niño BN-I, sin embargo, esta no pudo establecerse.

Los valores del coeficiente de dispersión mostraron que existe heterogeneidad en la longitud de las estelas observadas en los tres grupos de estudio, lo que implica que en un mismo niño se tuvieron células con estelas pequeñas y grandes, e incluso se observaron células sin migración, lo que evidentemente contribuyó a incrementar la heterogeneidad, y por esta razón en general los valores de H fueron altos. La falta de diferencia estadística en los valores del coeficiente H entre los tres grupos de niños estudiados indica que ni las infecciones, ni la desnutrición contribuyeron a incrementar la heterogeneidad intercelular de la longitud de las estelas. Aún cuando los valores de H observados en este estudio fueron altos, son similares a los observados en otros estudios realizados en linfocitos de niños (Betancourt et al., 1995). La variabilidad intraindividual observada en la cantidad de daño presente en el ADN de las células de los niños estudiados, abre incógnitas en relación a si los niveles bajos, medios y altos de daño se distribuyen de manera similar entre las células pertenecientes a las diferentes subpoblaciones de linfocitos, o si los niveles altos o bajos de daño se limitan a alguna o algunas en particular. Por otro lado, sería fundamental establecer si los niveles altos de daño se relacionan con alteraciones en la activación de los linfocitos, o en su capacidad para sintetizar interleucinas o anticuerpos, que son moléculas de gran importancia como parte de la respuesta inmune normal. Se propone la realización de estudios adicionales que permitan obtener información al respecto.

Como puede observarse en los Cuadros 6 y 8 la desnutrición y las infecciones, estuvieron claramente relacionadas con un incremento en la dispersión de los valores observados tanto en las longitudes de las estelas, como en el número de células con daño. Esta dispersión en los valores de las longitudes de las estelas y en los porcentajes de células con daño, debe estar relacionada con características intrínsecas de cada uno

de los niños que les permitieron responder de manera diferente ante estímulos negativos como son la desnutrición y las infecciones.

El incremento al daño del material genético, observado en las células de los niños BN-I y DES-I, podría relacionarse con diversas causas que a continuación se comentan:

Las infecciones bacterianas, las parasitarias y las virales, se han reconocido como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer en humanos (Canella et al., 1996). Esto se ha relacionado con el hecho de que se ha encontrado que algunas infecciones de tipo bacteriano inducen lesiones a nivel del material genético (Murthy y Rahiman, 1983; Rao et al., 1990; D'Souza y Das, 1994), las que se ha propuesto se originan porque ciertas enzimas liberadas por las bacterias podrían actuar como DNA-sas o endonucleasas, provocando alteraciones en el ADN de las células del organismo infectado (Ahuja, 1991). Otra posibilidad señala que los radicales libres liberados por las células linfoides del organismo infectado, como parte de la respuesta inmunitaria normal, pudieran también incrementar el daño al ADN (Ernst, 1999). El que estos factores determinen que se desarrolle un tumor dependerá de que la lesión en el ADN afecte a un oncogene o a un gene supresor de tumores (Canella et al., 1986).

Algunos ejemplos de agentes infecciosos que se han relacionado con daño al ADN son *Helicobacter hepaticus, Helicobacter pilory, Escherichia coli y Ureaplasma urealyticum*. La infección por la bacteria *Helicobacter hepaticus* puede desencadenar la formación de tumores cancerosos, y se propone que esto ocurre por efecto de los radicales libres generados durante la respuesta inmune normal, como un mecanismo para eliminar a los agentes patógenos, los que provocan la acumulación de bases oxidadas en el ADN (Canella et al., 1996). Así mismo, *Helicobacter pilory* se ha visto claramente relacionada con niveles elevados de daño oxidativo en el ADN (Hahm et al., 1998).

Otro ejemplo de agente infeccioso relacionado con daño al ADN es *Ureaplasma urealyticum*, que puede ser encontrado en el semen de hombres infértiles, este agente induce desnaturalización del ADN, y aunque no afecta la tasa de fertilización, sí altera el desarrollo de los embriones (Reichart et al., 2000).

Para explicar el incremento del daño en el ADN presente en los linfocitos de los niños infectados, se señala como causa principal a la generación de radicales libres, que se producen como parte de la respuesta inmunológica normal del huésped. Y aún cuando estos pueden ser inactivados por diferentes moléculas, como las vitaminas C y E, y el glutatión, en los niños con desnutrición diversos estudios han mostrado que estas moléculas antioxidativas se encuentran en concentraciones bajas, por lo que esto podria constituir un factor que permita explicar el mayor daño al ADN observado en los niños DES-I. Sin embargo, las evaluaciones de moléculas antioxidantes han mostrado resultados controversiales en los niños con desnutrición tipo marasmo ya que algunos autores señalan una considerable disminución en la concentración de glutatión (Becker et al., 1995), mientras que otros no encontraron diferencias significativas en comparación a los controles bien nutridos (Golden y Ramdath, 1987). En este aspecto los resultados son mas contundentes en los niños con kwashiorkor, ya que las deficiencias en concentración de éstas moléculas son mucho más evidentes (Becker et al., 1995; Lenhartz et al., 1998; Ashour et al., 1999; Tatli et al., 2000). En esta parte del estudio se incluyeron dos niños con kwashiorkor, uno de ellos mostró el promedio de la longitud de las estelas mas alto, pero ninguno de ellos presentó el mayor porcentaje de células con daño. Se propone que un mayor número de niños con esta forma de desnutrición debe ser evaluado, para tratar de determinar con precisión la posible diferencia entre los dos tipos de desnutrición severa.

Otra circunstancia que podría contribuir a explicar los niveles de daño incrementados en el ADN de las células de los niños DES es la deficiencia de cualquiera de los siguientes micronutrientes: Ácido Fólico, Vitamina B12, Vitamina B6, Niacina, Vitamina C, Vitamina E, Hierro o Zinc, ya que se ha observado que pueden ocasionar rompimientos de cadena sencilla o doble, y/o lesiones oxidativas en el ADN (Ames 2001). Por otro lado se ha establecido que algunos micronutrientes son requeridos para mantener en funcionamiento óptimo a las enzimas encargadas de la estabilidad del genoma, y que la deficiencia en estos podría generar efectos similares a los observados en las enfermedades genéticas o durante la exposición a carcinógenos (Fenech y Ferguson, 2001). También se señala a la deficiencia de proteínas que es tan común en ellos, como un factor que podría alterar el proceso de duplicación y/o de reparación del mismo, induciendo de esta manera daño en el ADN.

Además, en ambos grupos de niños infectados, la presencia de linfocitos en proliferación, podrían contribuir a incrementar la migración del ADN, debido a que los sitios de replicación del ADN se transforman en rompimientos de cadena sencilla cuando se somete a las células a tratamiento alcalino (Salagovic et al., 1997), sin embargo, el efecto sería mayor en las muestras de los niños BN-I, ya que estudios previos (Nájera et al., 2001a) muestran que los linfocitos de estos niños son los que tienen una mayor capacidad de activación, y por lo tanto de proliferación, mientras que los linfocitos de los niños DES-I presentan una activación disminuida.

6.2 Evaluación del daño al ADN asociado a los medicamentos en los linfocitos de los niños infectados (BNI-T y DES-IT)

En esta parte del estudio se utilizaron los mismos niños BN-I y DES-I, antes y después de un período de tratamiento para tratar de establecer si alguno o algunos de los medicamentos administrados a los niños se relacionan con la inducción de niveles altos de daño al ADN, y por otro lado, para definir si es que alguno de estos dos grupos pudiera presentar una mayor susceptibilidad a presentar mayor daño en el ADN, en asociación con algún o algunos medicamentos.

La migración del ADN antes del tratamiento con medicamentos, fue dos veces mayor en los niños DES-I (32.6 μm) que en los BN-I (16.5 μm). En cuanto a la proporción de células con daño medio y alto observadas antes del tratamiento esta también fue casi dos veces mayor en los niños DES (40%) que en los BN-I (21.7%). Después del tratamiento con medicamentos el promedio de la longitud de las estelas fue dos veces mayor en los DES-I (58.9 μm) a lo observado en los BN-I (28.8 μm). En relación a la proporción de células con daño medio y alto, estas incrementaron 1.5 veces en los DES-I, además de que mostraron la proporción mas alta (40%) de células con daño alto, en comparación con los BN-I (11%). Esto parece indicar que las infecciones, la desnutrición y los medicamentos establecen una relación de tipo sumatorio, que incrementa el daño al ADN.

Los resultados obtenidos antes del tratamiento con medicamentos señalan a la desnutrición como un factor que contribuyó a incrementar el daño presente en el ADN. Los datos obtenidos después del tratamiento mostraron que los medicamentos usados para combatir las infecciones contribuyeron también a incrementar este daño, tanto en las células de los niños BN-I como en las de los DES-I. En todos los casos los valores del coeficiente de dispersión no mostraron diferencia estadísticamente significativa, lo que parece indicar que la distribución de la migración del ADN fue similar entre los diferentes niños tanto BN-I como DES-I, antes y después del tratamiento.

En ambos grupos después del tratamiento con medicamentos, se observó la presencia de una subpoblación de células sin daño, la que aparentemente fue mas resistente al efecto inducido por los medicamentos sobre el ADN. Adicionalmente, los resultados mostraron que otra subpoblación celular en los niños DES-I pareció ser mas susceptible a alcanzar niveles altos de daño en el ADN (Cuadro 13). Estas respuestas extremas podrían explicarse considerando que a pesar de que se utilizó un tipo específico de células para realizar el estudio, los linfocitos son una población celular heterogénea formada por diversas subpoblaciones, en las que se propone, por ejemplo, podrían presentarse diferentes concentraciones de antioxidantes (Visvardis et al., 1997). Por otro lado, se tienen datos que muestran que algunos linfocitos como las células de memoria (CD45RO+) son in vitro mas radiosensibles que las células nativas (CD45RO-) (Uzawa et al., 1994), esto indica que algunas de las subpoblaciones de linfocitos podrían mostrar diferentes sensibilidades ante agentes que ocasionen daño en el ADN.

La disminución en la proporción de células con daño alto observadas después del tratamiento en dos niños BN-I (JBM y KFG) (Gráfica 5) y en un DES-I (NCR) (Gráfica 6) parece indicar que algunas células repararon muy eficientemente el daño al ADN por lo que este disminuyó. En este sentido Tice y Strauss (1995) señalan que los linfocitos B, T, T cooperadores y T supresores de individuos no infectados mostraron similares cinéticas de reparación de rompimientos de cadena sencilla inducidos por rayos γ.

El incremento en el daño al ADN observado tanto en los niños BN-I como en los DES-I después del tratamiento podría atribuirse a que algunos medicamentos parecen estar relacionados con la producción de radicales libres (Buschfort y Witte, 1994; Evans y

Halliwell, 1999; Kovacic y Becvar, 2000), y en vista de que los sistemas antioxidativos parecen estar fuertemente afectados en los niños con desnutrición proteico-calórica (Becker et al., 1995; Lenhartz et al., 1998; Ashour et al., 1999; Tatli et al., 2000), esto podría haber determinado la mayor longitud de las estelas y el mayor número de células con daño en estos niños.

Medicamentos como el metronidazol, presentan por sí mismos actividad oxidativa, pero adicionalmente este puede dar origen a metabolitos que presentan radicales hidroxilo (Dobias et al., 1994), los que pueden reaccionar rápidamente con el ADN provocando rupturas en la molécula (Menéndez et al., 2001). En este estudio se observó que los dos niños tratados con metronidazol, uno BN-I (NCH) y otro DES-I (GGG), mostraron una frecuencia elevada de células con daño alto. Adicionalmente, se sabe que no solo los antibióticos parecen estar relacionados con inducción de daño al ADN, también se ha reportado que medicamentos antipiréticos como el paracetamol (acetaminofén) inducen la formación de rompimientos de cadena sencilla del ADN (Hongslo et al., 1994).

Es posible que una parte del daño asociado con las infecciones, tanto en los niños BN-I como en los DES-I sea producto de la inducción de apoptosis, ya que se ha establecido que algunos tipos de infecciones están relacionados con un incremento en la tasa de apoptosis (McCloskey et al., 1998; Hotchkiss et al., 1999). Así mismo, al parecer la desnutrición inducida experimentalmente en ratas está relacionada con una proporción significativamente alta de apoptosis espontánea en timocitos (Ortiz et al., 2001).

En el presente estudio se observó una gran variabilidad interindividual, tanto en la longitud de las estelas como en el porcentaje de células con daño, la que fue particularmente evidente en los niños DES-I, lo que concuerda con lo reportado anteriormente (Betancourt et al., 1995). Esto podría tener alguna relación con el hecho de que en general un mayor número de medicamentos fueron administrados a los niños desnutridos. La administración de mayor cantidad de antibióticos en los niños DES-I posiblemente se deba a su ineficiente respuesta inmune, ya que no se tienen evidencias de que estos niños muestren alteraciones a nivel de la absorción o de la eliminación de los medicamentos (Buchanan, 1984).

Aquí surge nuevamente la pregunta en cuanto a si los niveles altos de daño en el ADN, podrían estar relacionados con las alteraciones de la respuesta inmune que presentan los niños DES-I, considerando que tal vez estos niveles altos de daño determinen una función celular deficiente. Es necesario realizar mas estudios que permitan evaluar esta posibilidad.

El incremento en la migración del ADN y en la proporción de células con daño alto, así como la disminución en la proporción de células sin daño (células "resistentes al daño") indican que los niños con desnutrición fueron mas susceptibles al daño inducido por los medicamentos sobre la molécula de ADN. Esto último podría señalar la presencia de una subpoblación celular mas sensible al daño inducido al ADN por los medicamentos en los niños con desnutrición. Sin embargo, esto también podría interpretarse como una subpoblación de células que se encuentra en activa proliferación, y que por lo tanto manifiesta una mayor cantidad de rompimientos de cadena sencilla (Salagovic et al., 1997), lo que se considera poco probable, ya que como se comentó anteriormente, en los niños desnutridos e infectados se ha observado una menor capacidad de activación y por consecuencia de proliferación celular, comparado con la de los niños BN-I. La influencia que podrian tener los días de hospitalización en la mejoría del estado nutricional de los niños desnutridos, no sería suficiente como para determinar diferencias significativas en la proliferación de sus linfocitos, ya que un estudio previo (Ortiz et al., 1995) realizado después de dos a seis meses de recuperación nutricional, mostró que la capacidad proliferativa, aun después de estos períodos no logra recuperarse en los niños DES-I.

6.3 Evaluación de la reparación del daño inducido al ADN por peróxido de hidrógeno en los niños BN, BN-I y DES-I

La electroforesis unicelular ha mostrado ser una herramienta muy sensible en el estudio del daño inducido al ADN por diversos agentes, así como para evaluar la cinética de reparación de esta molécula a nivel de células individuales (Rojas et al., 1999). Por esto se le utilizó para realizar el presente estudio, en el que se consideró relevante

evaluar la capacidad de los linfocitos de niños desnutridos para reparar el daño inducido al ADN, ya que a pesar de la importancia que lleva implícita, no se tienen estudios en relación a este tema.

Para evaluar la capacidad de los linfocitos provenientes de niños BN, BN-I y DES-I, para reparar rompimientos de cadena sencilla presentes en el ADN, se utilizó como agente inductor de daño al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este compuesto es capaz de atravesar fácilmente la membrana celular, y en el citoplasma se transforma en radicales hidroxilo por medio de un proceso no enzimático, que se realiza en presencia de iones metálicos (Fe^{2+} o Cu^{2+}), reacción a la que se denomina de Haber-Weiss o reacción de Fenton. Los radicales hidroxilo pueden inducir rompimientos de cadena sencilla y/o de cadena doble, la formación de sitios sensibles al álcali y diferentes especies de purinas o pirimidinas oxidadas (Jonje, 1989; Sankaranarayanan, 1991). El daño oxidativo provocado en el ADN está sujeto a procesos de reparación celular, particularmente reparación por unión de cadenas rotas y reparación por excisión de bases, los que en condiciones normales se realizan de manera rápida (Collins et al., 1995). La capacidad del H_2O_2 para inducir rompimientos de las cadenas de ADN, ha sido demostrada por medio de las técnicas de elución alcalina y el ensayo cometa (Gabelova et al., 1997). Por esta razón, se ha utilizado al peróxido muy comúnmente, como una herramienta en investigación, para inducir daño al ADN y de esta manera poder comparar la sensibilidad de diferentes tipos celulares (Holtz et al., 1995), la reparación del ADN (Collins et al., 1996; Duthye y Hawdon, 1998), y el estado antioxidativo de las células (Panayiotidis y Collins, 1997).

La longitud promedio de las estelas en los niños BN-I fue mayor a la de los niños BN, en todos los tiempos de reparación estudiados, incluyendo al tiempo cero. Cuando se comparó la longitud promedio de las estelas de los niños BN-I contra la de los DES-I, se estableció que después del tratamiento con H_2O_2 (tiempo cero) no hubo diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, en los tiempos comprendidos entre 5 y 60 minutos, sí se observaron diferencias. Esto implica que aún cuando la longitud de las estelas después del tratamiento con H_2O_2 fue similar en ambos grupos, al aumentar el tiempo de reparación, en los niños DES-I la longitud de las estelas disminuyó mas lentamente en comparación con lo observado en los BN-I, estos datos indican que existen

deficiencias en la capacidad de reparar el daño inducido al ADN en las células de los niños DES-I.

En cuanto al porcentaje de células con daño se observó algo similar a lo que ocurrió con la longitud de las estelas. Entre los BN y los BN-I, se presentaron diferencias estadísticamente significativas, desde el tiempo cero hasta los sesenta minutos de reparación, observándose en todos los tiempos estudiados una mayor cantidad de células con daño en los BN-I. Entre BN-I y DES-I se observó que a los tiempos cero, 5 y 15 no hubieron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo a 30 y 60 minutos el número de células con daño fue mayor en los niños DES-I.

El que las longitudes de las estelas y el porcentaje de células con daño entre los niños BN-I y DES-I no fueran estadísticamente diferentes al tiempo cero, muestra que ambos presentaron la misma sensibilidad al daño inducido por el H_2O_2. Este hallazgo tal vez podría estar indicando que la población de niños DES-I estudiados presentaba concentraciones de antioxidantes similares a las de los niños BN, lo que ya se ha reportado anteriormente (Sive et al., 1993). En este estudio el niño con kwashiorkor fue el que mostró la mayor longitud de las estelas y el mayor número de células con daño, lo que posiblemente este asociado a una capacidad antioxidante disminuida, que como muestran los datos de la bibliografía es particularmente grave en los niños con este tipo de desnutrición, y esto puede favorecer que los radicales libres actúen produciendo los síntomas característicos del kwashiorkor, que son el edema y el hígado graso.

El promedio de células con daño, observado después del tratamiento con H_2O_2 en los niños BN-I fue de 88% y en los DES-I de 98%, esto indica que prácticamente todas las subpoblaciones de linfocitos fueron sensibles al daño oxidativo. También después del tratamiento, los niños BN-I mostraron un promedio de células con daño mayor al observado en los niños BN, esta diferencia podría atribuirse a los cambios en la proporción de las diferentes subpoblaciones de linfocitos que se presentan en los niños BN-I como consecuencia de las infecciones (Nájera et al., 2001a). Un cambio que se ha observado en las subpoblaciones de linfocitos de niños BN-I es el incremento en las células CD4+CD45RO+ (células de memoria) (Nájera et al., 2001b), las que se mencionó

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

anteriormente parecieran ser mas sensibles a presentar daño en el ADN inducido por algunos agentes (Uzawa et al., 1994).

Adicionalmente, el análisis del promedio de células con daño mostró que a 5 y 15 minutos de reparación no se presentaron diferencias entre BN y DES-I, lo que indica que en ambos grupos se presentó una fracción de células que repararon con igual eficiencia, por lo que el porcentaje de células con daño disminuyó en una proporción similar en ambos grupos. A 30 y 60 minutos de reparación se observó una franca diferencia entre el porcentaje de células con daño observadas en los niños BN-I con respecto a las de los niños DES-I, y aún cuando en ambos grupos los porcentajes tendían a disminuir, es evidente que en los niños DES-I se mantuvieron los porcentajes de daño mas altos, esto indica que una fracción de linfocitos repara mas lentamente en los niños con desnutrición.

Para analizar la cinética de reparación del ADN de los tres grupos de niños, se utilizó un parámetro propuesto por Plappert y colaboradores (1997) que se denomina capacidad reparativa (CR), la que se define como la disminución (%) de la migración del ADN o del porcentaje de células con daño, entre los diferentes tiempos de reparación.

La CR calculada utilizando la longitud de migración del ADN, no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de niños bien nutridos (BN y BN-I), lo que estaría indicando que aún cuando parten de niveles basales diferentes, tienen la capacidad de reparar de manera igualmente eficiente el daño, esto significa que la infección no interfirió con la CR de los niños bien nutridos. En contraste en los DES-I, se observó una CR claramente menor en todos los tiempos de reparación analizados.

La CR evaluada por la migración del ADN, o por el porcentaje de células dañadas, mostró valores mayores en los dos grupos de niños BN, en comparación con lo observado en los DES-I, por lo que resulta claro que en estos últimos se tuvo un retraso en la velocidad con que reparan el daño. Los trastornos de la reparación del ADN en los linfocitos de los niños desnutridos, detectados en este estudio, podrían contribuir a explicar porque en diversos trabajos, incluyendo este, se han encontrado mayor cantidad de alteraciones a nivel del material genético en ellos, ya que al reparar mas lentamente, el daño permanecerá durante mayor tiempo en sus células.

Las deficiencias a nivel de la reparación del ADN observadas en los niños desnutridos, podrían explicarse considerando las evidencias que han mostrado su incapacidad de activar mecanismos de protección basados en un incremento en la síntesis de proteínas (Becker et al., 1995). Hasta el momento no está claro que cambios fisiológicos o patofisiológicos están relacionados con los trastornos de la CR de las células, sin embargo, se propone que estas podrían ser el resultado de alteraciones en una o mas de las muchas enzimas involucradas en las vías de reparación del ADN (Plappert et al., 1997).

El coeficiente H mostró que la respuesta de los tres grupos ante el peróxido es diferente, sus valores mostraron mayor heterogeneidad en los BN, ya que como se aprecia en la Gráfica 7, en ellos existe una alta proporción de células con daño bajo y el resto presentan niveles medios o altos, mientras que en los BN-I la proporción de células con daño bajo disminuye ligeramente aumentando aquellas con daño medio y alto, finalmente en los DES-I se tuvo una respuesta muy homogénea, que se reflejó en un valor bajo de H, el que puede correlacionarse directamente con porcentajes elevados de células con daño alto. Las diferentes respuestas observadas podrían atribuirse a la concentración de Fe^{2+} (que como se mencionó anteriormente, se requiere en la reacción de Fenton para la formación de los radicales hidroxilo), de enzimas antioxidativas (como la catalasa o la glutatión peroxidasa) o de atrapadores de radicales libres (por ejemplo el tocoferol), que se propone son diferentes de tipo celular a tipo celular o entre subpoblaciones de linfocitos (Visvardis et al., 1997), y que en este caso es posible que fueran, así mismo, diferentes entre los grupos de estudio.

Previamente se ha propuesto que las células de los niños desnutridos podrían ser mas susceptibles al daño ambiental, sin embargo, las observaciones realizadas aquí no indican que exista una mayor sensibilidad al daño inducido por el H_2O_2 sin embargo se necesitan mas estudios para analizar la posibilidad de que éstas manifiesten mayor sensibilidad a ser dañadas por otros agentes. Los resultados aquí obtenidos muestran que la capacidad de reparación del daño inducido al ADN en linfocitos de niños desnutridos, está disminuida en relación a lo observado en los controles bien nutridos. Esto hace que el daño al ADN se mantenga durante tiempos mas largos en las células de

estos niños, lo que tal vez podría inducir alteraciones en la fisiologia de sus células en general, o bien, incrementar la posibilidad de que ellos pudieran desarrollar padecimientos de tipo canceroso. Por esto sería relevante realizar estudios de seguimiento en las poblaciones de niños que han presentado desnutrición severa, para documentar esta última posibilidad.

7.- CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente estudio son las siguientes:

a) Las infecciones y la desnutrición son dos factores que están relacionados con niveles altos de daño en el ADN.

b) Los medicamentos, aunque necesarios para el tratamiento de las infecciones, pueden inducir efectos colaterales no deseados, tales como aumentar el daño en el ADN.

c) Los linfocitos de los niños DES parecen ser mas susceptibles al daño inducido al ADN por los medicamentos.

d) Los datos parecen indicar que las infecciones, la desnutrición y los medicamentos, tienen entre sí un efecto sumatorio, que incrementa el daño al ADN.

e) El ADN de los linfocitos de los niños DES no presenta una mayor susceptibilidad a ser dañado por el peróxido de hidrógeno.

f) Las infecciones no interfieren con la capacidad de reparación del daño en el ADN de las células de los niños bien nutridos infectados.

g) La capacidad de reparación del daño inducido al ADN en los linfocitos de niños desnutridos está disminuida.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abou-Eisha A., Creus A. y Marcos R. 1999. Genotoxic evaluation of the antimicrobial drug, trimethoprim, in cultured human lymphocytes. Mutation Res. 440: 157-162.
- Ahuja Y.R. 1991. Bacterial infection, restriction endonucleases,genetic damage and cancer. Biol. Zent. Bl. 110: 179-187.
- Albrecht R. y Pelissier M.A. 1995. About the oxidative stress status in children with kwhasiorkor. Fd. Chem. Toxic. 33: 1081-1083.
- Ames B.N. 2001. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a mayor cause of cancer. Mutation Res. 475: 7-20.
- Armendares S., Salamanca F. y Frenk S. 1971. Chromosomal abnormalities in protein calorie malnutrition. Nature 232: 271-273.
- Ashour M.N., Salem S.I., El-Gabdan H.M., Ellwan N.M. y Basu T.K. 1999. Antioxidant status in children with protein-energy malnutrition living in Cairo, Egypt. Eur. J. Clin. Nutr. 53: 669-673.
- Avila-Curiel A., Shamah-Levy T., Galindo-Gómez C., Rodríguez-Hernández G. y Barragán-Heredia L.M. 1998. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano. Salud Pública Méx. 40: 150-160.
- Becker K., Botticher D. y Leichsenring M. 1994. Antioxidant vitamins in malnourished malnourished Nigerian children. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 64: 306-310.
- Becker K., Leichsenring M., Gana L., Bremer H. y Schirmer R.H. 1995. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: Results of a study in Nigeria. Free Radical Biol. & Med. 18: 257-263.
- Behar M. e Icaza S. 1972. Nutrición. Interamericana. México. pp. 130-147.
- Betancourt M., De la Roca J., Saenz M., Díaz R. y Cravioto J. 1972. Aberraciones cromosómicas en desnutrición protéico-calórica avanzada, Bol. Med. Hosp. Inf. (Méx.) 29: 517-524.
- Betancourt M., Hernández G. y Cravioto J. 1979. Rev. Invest. Clin. (Méx.) 31: 46-52.
- Betancourt M. y González C. 1986. Estudio de la proliferación celular en las primeras horas de cultivo de linfocitos de niños desnutridos. IX Congreso Nacional de Genética Humana. Puebla, Pue.

- Betancourt M., Ortiz R., Gómez J.L., Hernández M.E. y Cravioto J. 1989. Effect of renutrition on cellular proliferation and SCE in bone marrow cells from malnourished rats. Nutr. Report Inter. 40: 959-964.
- Betancourt M., Ortiz R., González C., Pérez P., Cortés L., Rodríguez L. y Villaseñor L. 1995. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. Mutation Res. 331: 65-77.
- Betti C., Davini T., Gianessi L., Loprieno N. y Barale R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. Mutation Res. 307: 232-233.
- Buchanan N. Effect of protein-energy malnutrition on drug metabolism in man. Wld. Rev. Nutr. Diet. 43: 129-139.
- Buschfort C. y Witte I. 1994. Induction and mechanism of DNA single and double strand breaks by tetracycline/Cu(II) in the absence of ligth. Carcinogenesis 15: 2927-2930.
- Canella K.A., Diwan B.A., Gorelick P.L., Donovan P.J., Sipowicz M.A., Kasprzak K.S., Weghorst C.M., Snyderwinw E.G., Davis C.D., Keefer L.K., Kryptopoulos S.A., Hecht S.S., Wang M., Anderson L.M. y Rice J.M. 1996. Liver tumorigenesis by *Helicobacter hepaticus*: considerations of mechanism. In vivo 10: 285-292.
- Cantelli-Forti G. y Hrelia P. 1991. Potenziale rischio genotossico di farmaci antimicrobici. G. Ital. Chemioter. 38: 31-34.
- Catalán J., Moreno C. y Arruga M.V. 1993. Sister-chromatid exchange induced by chloramphenicol on bovine lymphocytes. Mutation Res. 319: 11-18.
- Chandra R.K. 1980. Inmunología de los transtornos nutricionales. El Manual Moderno. México. pp. 1-48.
- Chen L.C., Chowdhury A. y Huffman S. 1980. Anthropometric assessment of energy-protein malnutrition and subsequent risk of mortality among preschool aged children. Am. J. Clin. Nutr. 33: 1836-1845.
- Collins A.R., Ai-guo M. y Duthie S.J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mutation Res. 336: 69-77.
- Collins A., Dusinska M., Gedik C. y Stetina R. 1996. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? Environ Health Perspect 104: 465-469.

- Collins A., Dusinska M., Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslova K. y Vaughan N. 1997a. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. Environ. Mol. Mutagen. 30: 139-146.
- Collins A., Dobson V., Dusinska M., Kennedy G. y Stetina R. 1997b. The comet assay: what can it really tell us?. Mutation Res. 375:183-193.
- Conlon B.J. y Smith D.W. 1998. Supplemental iron exacerbates amynoglycoside ototoxicity in vivo. Hear Res. 115: 1-5.
- Cravioto J., Ortega R. y Arrieta R. 1990. Desnutrición en la infancia. En: La Nutrición y la Salud de las madres y niños mexicanos. Compiladores: Pedro Arroyo y Héctor Avila. Fondo de Cultura Económica. México. Capítulo XXV.
- Dobias L., Cerna M., Rossner P. y Sram R. 1994. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. Mutation Res. 317: 177-194.
- D'Souza D. y Das B.C. 1994. Genotoxic effects of Mycobacterium leprae infection in humans. Mutation Res. 305: 211-222.
- De Onís M., Monteiro C., Akré J. y Clugston G. 1993. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on child growth. Bulletin WHO 71: 703-712.
- Duthie S. y Hawdon A. 1998. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. FASEB J. 12: 1491-1497.
- Ekanem E.E., Umotong A.B., Raykundalia C. y Catty D. 1997. Serum C-reactive protein and C3 complement protein levels in severely malnourished Nigerian children with and without bacterial infections. Acta Paediatr. 86: 1317-1320.
-Enríquez J., Avila C.R., Santos I., Tanaka-Kido J., Vallejo O. y Sterling C.R. 1997. Cryptosporidium infections in Mexican children: clinical, nutritional, enteropathogenic and diagnostic evaluations. Am. J. Trop. Med. Hyg. 56: 254-257.
- Ernst E. 1999. The role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. Aliment. Pharmacol. Ther. 13: 13-18.
- Evans P. y Halliwell B. 1999. Free radical and hearing. Ann. NY Acad. Sci. 884: 19-40.
- Fairbain W., Olive P. y O'Neil K. 1995. The comet assay: a comprehensive review , Mutation Res. 339: 37-59.

- Fenech M. y Ferguson L.R. 2001. Vitamins/Minerals and genomic stability in humans. Mutation Res. 475: 1-6.

- Flores-Abuxapqui J.J., Suárez-Hoil G.J., Puc-Franco M.A., Heredia-Navarrete M.R. y Franco-Monsreal J. 1993. Prevalencia de enteropatógenos en niños con diarrea líquida. Rev. Latinoam. Microbiol. 35: 351-356.

- García-Ramos E., Pizarro-Suárez E., Sapiain L.A. y Lugo de la Fuente G. 1991. Estudio epidemiológico y etiológico de las infecciones respiratorias agudas (IRA) en niños menores de cinco años. Rev. Latinoam. Microbiol. 33: 109-119.

- Gabelova A., Slamenova D., Ruzekova L., Farkasova T. y Horvathova E. 1997. Measurement of DNA strand breakage and DNA repair induced with hydrogen peroxide using single cell gel electrophoresis, alkaline DNA unwinding and alkaline elution of DNA. Neoplasma 44: 380-388.

- Golden M. 1988. The effects of malnutrition in the metabolism of children. Trans. Soc. Roy. Trop. Med. Hygiene 82: 3-6.

- Golden M.H. y Ramdath D. 1987. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. Proc. Nutr. Soc 46: 53-68.

- Gómez F., Ramos-Galván R., Frenk S., Cravioto J., Chávez R. y Vázquez J. 1956. Mortality in second and third degree malnutrition. J. Trop. Pediat. London 2:77.

- González-Torres C., Villaseñor L. y Betancourt M. 1983. Proliferación celular de linfocitos e intercambio de cromátidas hermanas en niños desnutridos. Mem. Asoc. Invest. Pediatr. 57: 49-71.

-.González C., Villaseñor L. y Betancourt M. 1990. Cinética de proliferación in vitro de linfocitos de niños desnutridos. Rev. Invest. Clin. 42: 18-22.

- Guindi M. 1999. Role of *Helicobacter pylory* in the pathogenesis of gastric carcinoma and progression of lymphoid nodules to lymphoma. Can. J. Gastroenterol 13: 224-227.

- Hahm K.B., Lee K.J., Kim J.H., Cho S.W. y Chung M.H. 1998. Quantitative and qualitative usefulness of rebamipide in eradication regimen of *Helicobacter pilory*. Dig. Dis. Sci. 43: 192S-197S.

- Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am. J. Med. 91: 14S-22S.

- Hartmann A., Plappert U., Raddatz K., Grünert-Fuchs M. y Speit G. 1994. Does physical activity induce DNA damage? Mutagenesis 9: 269-272.

- Hernández-Martínez E. y Roldán-Fernández S.G. 1995. Prevalence of malnutrition in preschool children in Tabasco, México. Salud Pública Méx. 37: 211-218.
- Holtz D.E., Ryder T.A., Fairbairn A., Hurley R. y Harvey D. 1997. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: I. In vitro effects on cells in culture. Hum. Exp. Toxicol 16: 570-576.
- Holtz O., Jorres R., Kastner A. y Magnussen H. 1995. Differences in basal and induced DNA single-strand breaks between human peripheral monocytes and lymphocytes. Mutation Res. 332: 55-62.
- Hongslo J.K., Smith C.V., Brungborg G., Soderlund E.J. y Holme J.A. 1994. Genotoxicity of paracetamol in mice and rats. Mutagenesis 9: 93-100.
- Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Swanson P.E., Chang K.C., Cobb J.P., Buchman T.G., Korsmeyer S.J. y Karl I.E. 1999. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. PNAS 96: 14541-14546.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) 1993. Información sobre las 10 principales causas de mortalidad en México. Ciudad de México. México.
- Jelliffe D. 1981. Nutrición infantil en países en desarrollo. Limusa. México.
- Joenje H. 1989. Genetic Toxicology of oxygen. Mutation Res. 219: 193-208.
- Kassie F., Parzefall W. y Knasmüller S. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. Mutation Res. 463: 13-31.
- Khouri F.P. y McLaren D.S. 1973. Cytogenetics studies in protein-calorie malnutrition. Am. J. Genet. 25: 465-470.
- Kovacic P. y Becvar L.E. 2000. Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electrotransfer. Curr. Pharm. Des. 6: 143-167.
- Kumar A., Gulati N., Aggrawal C.S., Rasania S.K. y Sahgal K. 1994. A epidemiological profile of gastro-enteritis deaths in Delhi state. J. Commun. Dis. 26: 92-99.
- Lafarge-Frayssinet C., Robbana-Barnat S., Frayssinet C., Toucas L. y Decloître. 1994. Cytotoxicity and DNA damaging potency of chloramphenicol and six metabolites: a new evaluation in human lymphocytes and Raji cells. Mutation Res. 320: 207-215.
- Lenhartz H., Ndasi R., Anninos A., Bötticher D., Mayatepek E., Tetanye E. y Leichsenring M. 1998. The clinical manifestation of the kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. J. Pediatr. 132: 879-881.

- Mannick E., Bravo L., Zarama G., Realpe J., Zhang X., Ruíz B., Fontham E., Mera R., Miller M. y Correa P. 1996. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylory* gastritis: Effect of antibiotics and antioxidants. Cancer Res. 56: 3238-3243.

- Martelli A., Mattioli F., Pastorino G., Robbiano L., Allavena A. y Brambilla G. 1991. Genotoxicity testing of chloramphenicol in rodent and human cells. Mutat. Res. 260: 65-72.

- McDaniel L.D. y Schultz R.A. 1993. Elevation of sister chromatid exchange frequency in transformed human fibroblasts following exposure to widely used aminoglycosides. Environm. Mol. Mutag. 21: 67-72.

- McCloskey T.W., Bakshi S., Than S., Arman P. y Pahwa S. 1998. Immunophenotypic analysis of peripheral blood mononuclear cells undergoing in vitro apoptosis after isolation from human immunodeficiency virus-infected children. Blood 92: 4230-4237.

- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., DeMeo M.P. y Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutation Res. 288: 47-63.

- Mendiola-Cruz M.T. y Morales-Ramírez P. 1999. Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. Mutation Res. 433: 45-52.

- Menéndez D., Rojas E., Herrera L.A., López M.C., Sordo M., Elizondo G. y Ostrosky-Wegman P. 2001. DNA breakage due to metronidazole treatment. Mutation Res. 478: 153-158.

- Murthy P.B., Bhaskaram P. y Skirantia S.G. 1980. Sister chromatid exchanges in protein-energy malnutrition. Hum. Genet. 55: 405-406.

- Murthy P.B. y Srikantia S.G. 1981. SCE frequency in malnourished mice. Metabolism 30: 1-2.

- Murthy P.B. y Rahiman M.A. 1983. Chromosomal abnormalities in severely malnourished Indian children. Hiroshima J. Med. Sci. 32: 291-294.

- Mutchinick O., Lisker R., Ruz L., Salamanca F. y Armendares S. 1979. Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. Ann. Genet. 22: 129-132.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

- Nájera O., González C., Toledo G., López L., Cortés E., Betancourt M. y Ortíz R. 2001a. Early activation of T, B and NK lymphocytes in infected malnourished and infected well-nourished children. J. Nutr. Immunol. 5: 85-97.
- Nájera O., González C., Toledo G., López L., Cortés E., Betancourt M. y Ortíz R. 2001b. CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children. Clin. Exp. Immunol. 126: 461-465.
- Olive P.L., Banath J.P. y Durand R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet "assay. Radiat. Res. 122: 69-72.
- Orozco M., Martínez H., Reyes H. y Guiscafré H. 1998. A scale without anthropometric measurements can be used to identify low weight-for-age in children less than five years old. J. Nutr. 128: 2363-2368.
- Ortiz R., Campos C., Gómez J.L., Espinoza M., Ramos-Motilla M. y Betancourt M. 1994. Sister chromatid exchange and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition. Mutation Res. 213: 33-37.
- Ortiz R., Campos C., Gómez J.L., Espinoza M., Ramos-Motilla M. y Betancourt M. 1995. Effect of renutrition on the proliferation kinetics of PHA stimulated lymphocytes from malnourished children. Mutation Res. 334: 235-241.
- Ortiz R., Cortés L., González C., López L., Pérez P., Cortés E. y Betancourt M. 1997. Analysis of Mitomicyn C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. Environm. Molec. Mutag. 30: 363-370.
- Ortiz R., Cortés L., Gómez J.L., González-Márquez H., González C. y Cortés E. 2001. Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. Br. J. Nutr. 86: 545-548.
- Panayiotidis M. y Collins A.R. 1997. Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. Free Rad. Res. 27: 533-537.
- Pelletier D., Frongillo E. y Habicht J.P. 1993. Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. Am. J. Publ. Hlth. 83: 1130-1133.
- Plappert U.G., Stocker B., Fender H. y Fliender T.M. 1997. Changes in the repair capacity of blood exposure to ionizing radiation. Environ. Mol. Mutag. 30: 153-160.

- Potts R.C., Hassan H.A., Brown R.A., MacConnachie A., Gibbs J.H., Robertson A.J. y Swansonbeck J.S. 1983. In vitro effects of doxycycline and tetracycline on mitogen stimulated lymphocyte growth. Clin. Exp. Immunol. 53: 458-464.

- Ramos-Galván R. 1975. Somatometría pediátrica. Arch. Inv. Med. Suppl 1.

- Rao K.S.J. 1974. Evolution of kwashiorkor and marasmus. Lancet 1: 709-711.

- Rao V.V., Gupta E.V. y Thomas I.M. 1990. Chromosome damage in untreated tuberculosis patients. Tubercle 71: 169-172.

- Reichart M., Kahane I. y Bartoov B. 2000. In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmited *Ureaplasma urealyticum* infection. Biol. Reprod. 63: 1041-1048.

- Renaudin P. 1997. Evaluation of the nutritional status of children less than 5 years of age in Moundou, Chad: correlations with morbidity and hospital mortality. Med. Trop. 57: 49-54.

- Rojas E., López M.C. y Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: metodology and applications. J Chromatogr. B. 722: 225-254.

- Sadasivan G. y Raghuram T. 1973. Chromosomal aberrations in malnutrition. Lancet 2: 574.

- Salagovic J., Maes A., VanGorp U., Verschave L. y Kalina I. 1997. The cell cycle influence DNA migration as measured with the alkaline comet assay in stimulated human lymphocytes. Folia Biol. (Praha) 43: 79-82.

- Sankaranarayanan K. 1991. Nature of spontaneous and radiation-induced mutations in mammalianin vitro systems and mechanisms of induction of mutations by radiation. Mutation Res. 258: 75-97.

- Schacht J. 1998. Aminoglycoside ototoxicity: prevention in sight? Otolaryngol Head Neck Surg. 118: 674-677.

- Sepúlveda A., Lezana M.A., Tapia R., Valdespino J., Madrigal H. y Kumate J. 1990. Estado nutricional de preescolares y mujeres en México. Respuestas de una encuesta probabilística nacional. Gaceta Med. Mex. 126: 207-210.

- Singh N.P., McCoy M.T. y Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res., 175: 184-191.

- Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R., Pearson J.B., Brant L.J. y Schneider E.L. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. Mutation Res. 237: 123-130.

- Singh N.P., Stephens R.E. y Schneider E.L. 1994. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. Int. J. Radiat. Biol. 66: 23-28.

- Sive A.A., Subotzky E.F., Malan H., Dempster W.S. y Heese H.D. 1993. Red blood cell antioxidant enzyme concentrations in kwashiorkor ans marasmus. Ann. Trop. Paediatr. 13: 33-38.

-Sive A.A., Dempster W.S. Rosseau S., Kelly M., Malan H. y Heese H.D. 1996. Bone marrow and chelatable iron in patients with protein energy malnutrition. S. Afr. Med. J. 86: 1410-1413.

- Smit E.N., Dijkstra J.M., Schnater T.A., Seerat E., Muskiet F.A. y Boersma E.R. 1997. Effects of malnutrition on the erythrocyte fatty acid composition and plasma vitamin E levels of Pakistani children. Acta Paediatr. 86: 690-695.

- Snyder R.D. y Green J.W. 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. Mutation Res. 488: 151-169.

- Sono A. y Sakaguchi K. 1981. Inhibition of protein synthesis antagonizes induction of sister chromatid exchanges by exogenous agents. Mutat. Res. 80: 121-131.

- Song B.B., Sha S.H. y Schacht J. 1998. Iron chelators protect from aminoglycoside induced cochleo and vestibulo toxicity. Free Radic. Biol. Med. 25: 189-195.

- Squali-Houssaini F.Z., Arnaud J., Richard M.J., Renversez J.C. y Favier A. 1997. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defences in malnourished Moroccan children. Ann. Nutr. Metab. 41: 149-159.

- Strauss G.H.S. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leucocyte tests (BLT) Y. Toxic and immunotoxic effects. Mutat. Res. 252: 1-15.

- Tatli M.M., Vural H., Koc A., Kosecik M. y Atas A. 2000. Altered anti-oxidant status and increased lipid peroxidation in marasmic children. Pediatr. Int. 42: 289-292.

- Tice R.R. 1994. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. En: D.H. Phillips and S. Vennit (Eds.), Environmental Mutagenesis, Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.

- Tice R.R., Andrews P.W. y Singh N.P. 1990. The single cell gel assay: sensitive technique for evaluating intercellullar diferences in DNA damage and repair. En:Methods for detection of DNA damage in human cells, B. Sutherland y A.Woodhead (Eds.), Plenum Prublishing C., N.Y. 291-301.

- Tice R.R., Strauss G.H.S. y Peters W.P. 1992. High-dose combination alkylating agents autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. Mutation Res. 271: 101-113.

- Tice R.R. y Strauss G.H.S. 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation induced DNA damage in human stem cells 13: 207-214.

- Torres J., González-Arroyo S., Pérez R. y Muñoz O. 1995. Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbiological studies. Arch. Med. Res., 26: 23-29.

- Trowbridge F.I. y Sommer A. 1981. Nutritional antropometry and mortality risk. Am. J. Clin. Nutr. 34: 2592-2594.

- Uzawa A., Suzuki G., Nakata Y., Akashi M., Ohyama H. y Akanuma A. 1994. Radiosensitivity of CD45RO+ memory and CD45RO- naive T cells in culture. Radiat. Res. 137: 25-33.

- Vega L. 1998. Identification of risk factors for malnutrition: Is there some evidence for predisposition? Int. J. Cancer 11: 14-16.

- Vergara M., Quiroga M., Grenon S., Villalba V., Pegels E., Chade M., González C., Binsztein N., Eiguer T. y Depetris A. 1992. Identificación de enteropatógenos en la diarrea de la infancia en un estudio realizado en la ciudad de Posadas, Misiones, República Argentina. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 34: 71-75.

- Visvardis E.E., Tassiou A.M. y Piperakis S.M. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H2O2 and γ-irradiation with the alkaline comet assay. Mutation Res. 383: 71-80.

- Wilhelm J.M., Pettitt S.E. y Jessop J.J. 1978. Amynoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: Structure-function relationships in the stimulation of misreading with a wheat embryo system. Biochemistry 17: 1143-1149.

- Yoon P.W., Black R.E., Moulton L.H. y Becker S. 1997. The effect of malnutrition in the risk of diarrheal and respiratory mortality in children. Am. J. Clin. Nutr. 65: 1070-1077.

9. ANEXOS

9.1 Ficha de datos

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA
Evaluación de daño al ADN y su relación con la respuesta inmune mediada por células en organismos infectados y desnutridos
HOSPITAL PEDIATRICO - IZTAPALAPA

FICHA DE DATOS

Fecha _____

1.- Nombre del paciente

_____

2.- Número de expediente

_____

3.- Domicilio y teléfono

_____

4.- Edad (en meses) _____

5.- Sexo _____

6.- Peso actual _____ Talla actual _____

7.- Peso al nacimiento _____ Talla al nacimiento _____

8.- Fecha de ingreso (en caso de que sea hospitalizado el paciente) _____

9.- Padecimiento(s)

Desnutrición si _____ no _____

Grado 1o. _____ 2o. _____ 3o. _____

Tipo Marasmo _____ Kwashiorkor _____

Infecciones
a) Vías respiratorias _____

b) Vías urinarias _____

c) Gastrointestinal _____

d) Otras _____

Otros padecimientos de tipo no infeccioso

_____

10.- Medicamentos (aquellos que el paciente esté tomando al momento de la toma de la muestra y los que halla tomado durante el mes anterior a la misma)

a)Nombre del medicamento _____

b) Fecha en que se inicia la toma _____

c) Fecha de terminación _____

d) Dosis _____

a)Nombre del medicamento _____

b) Fecha en que se inicia la toma _____

c) Fecha de terminación _____

d) Dosis _____
(Si hicieran falta espacios, favor de anexar los datos al final de este formato)

11.- Exposición a radiación (en caso de que al paciente se le hallan tomado radiografías)

Fecha(s)_____

12.- Resultados de análisis clínicos
Microbiología (organismos patógenos detectados)

a) Bacterias

_____

b) Hongos _____

c) Parásitos

_____

Biometría hemática
Fecha en que se realiza _____

a) Leucocitos _____

b) Linfocitos _____

Quimica sanguinea

a) Hemoglobina _____

b) Hematocrito _____

_____

Nombre de quien toma los datos

OBSERVACIONES:

9.2 Soluciones

9.2.1 Solución de lisis

Solución stock:

NaCl	146.1 gr
EDTA	37.2 gr
Tris	1.2 gr

Aforar a 1000ml con agua destilada.

Solución de trabajo:

Solución de lisis (Stock)	44.5 ml
Triton (Concentrado)	0.5 ml.
DMSO (Concentrado)	5.0 ml.

9.2.2 Solución amortiguadora para el corrimiento electroforetico

Soluciones stock:

a) 10N NaOH (200 gr/500ml de agua destilada)

b) 200mM EDTA (14.89 gr/200 ml de agua destilada)

Para preparar la solución amortiguadora para el corrimiento disolver 30 ml. de la solución 10N de NaOH y 5 ml. de la 200mM de EDTA en 1000 ml de agua destilada.

9.2.3 Solución amortiguadora de neutralización

Tris - 48.5 gr, aforar a 1000 ml con agua destilada. Llevar a pH 7.5 con ácido clorhídrico concentrado.

9.2.4 Solución de Bromuro de Etidio

Solución stock:

10 mg de Bromuro de Etidio en 50 ml de agua destilada.

Solución de trabajo:

Tomar 1ml de la solución stock y diluir con 9 ml de agua destilada.

9.3 Método para evaluar viabilidad

Tinción doble con Bromuro de Etidio y Diacetato de Fluoresceína (Strauss, 1991).

Solución Stock de Bromuro de Etidio:

Pesar 50 mg de Bromuro de Etidio, disolver en un ml de Etanol al 100%. Este volumen disolverlo en 49 ml de solución salina.

Solución de Trabajo de Bromuro de Etidio:

Tomar 50 μl de la solución stock y disolver en 2 ml de solución salina.

Solución Stock de Diacetato de Fluoresceína:

Disolver 3 mg de Diacetato de Fluoresceína en un mililitro de acetona.

Solución de trabajo de Diacetato de Fluoresceína:

Diluir 84 μl de la solución stock en 2 ml de solución salina.

Solución de trabajo para evaluar viabilidad:

Mezclar la solución de trabajo de Bromuro de Etidio y la solución de trabajo de Diacetato de Fluoresceína en proporción 1:1.

La evaluación de la viabilidad celular se realizó directamente en las células que se encontraban en los geles, para esto se hicieron preparaciones adicionales, que fueron extraídas al tiempo cero (inmediatamente después del tratamiento con peróxido de hidrógeno) y después de 60 minutos de reparación. Finalizado el tiempo de exposición al peróxido de hidrógeno, las preparaciones se enjuagaron varias veces con solución salina

que se encontraba a 37°C. Concluido este proceso se les adicionó a cada preparación 50 µl de la solución de trabajo para evaluar la viabilidad, y se metieron a incubar en cámara húmeda a 37°C durante diez minutos. Al finalizar el período de incubación las preparaciones fueron nuevamente enjuagadas varias veces con solución salina, y se revisaron en el microscopio de epifluorescencia. Las células vivas se tiñeron de color verde, ya que permitieron el ingreso del diacetato de fluoresceína, y las muertas de rojo, ya que la pérdida de la integridad física de la membrana plasmática permitió el ingreso del bromuro de etidio.

10. ARTÍCULOS PUBLICADOS (Producto de la Tesis)

Se presentan copias del artículo de revisión:

González C., Betancourt M. y Ortiz R. 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. Bioquimia. 25 (1): 3-9.

Producto del Seminario Temático del Programa del Doctorado en Ciencias Biológicas. UAM.

Así mismo, se anexan copias de dos artículos generados a partir de los datos experimentales obtenidos en la presente tesis:

González C., Nájera O., Cortés E., Toledo G., López L., Betancourt M. y Ortiz R. 2002. Hydrogen peroxide-induced DNA damage and DNA repair in lymphocytes from malnourished children. Environmental and Molecular Mutagenesis 39: 33-42.

González C., Nájera O., Cortés E., Toledo G., López L., Betancourt M. y Ortiz R. 2002. Susceptibility to DNA damage induced by antibiotics in lymphocytes from malnourished children. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 22: 147-158.

Daño Oxidativo y Antioxidantes

María Cristina González Torres, Miguel Betancourt-Rule y Rocío Ortiz Muñiz

Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa México D.F.

RESUMEN

Para los organismos aerobios el oxígeno es un compuesto esencial, sin embargo, su reducción secuencial dentro de las células conduce a la formación de las llamadas especies reactivas de oxígeno, que son en su mayoría radicales libres. Un radical libre es una molécula o un átomo que presenta un electrón no aparcado, razón por la cual son sumamente reactivos. Al formarse pueden interactuar rápidamente con moléculas orgánicas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, e incluso con el ADN, provocando en ellas diversas alteraciones estructurales, que conducen a alteraciones de tipo funcional, y de esta manera la fisiología de las células y por consecuencia la de los organismos, se ve afectada. El estudio de los radicales libres ha permitido relacionarlos directamente con el desarrollo de diversas enfermedades de tipo neurodegenerativo (Alzhaimer, Huntington, Parkinson), con la carcinogénesis, y con el envejecimiento. Paralelamente al estudio de los radicales libres, el estudio de los antioxidantes constituye actualmente un tema de investigación sumamente importante, ya que se ha considerado que el conocimiento de los mecanismos de acción de estas moléculas podría permitir, en algún momento, la utilización de las llamadas terapias antioxidantes, para disminuir los efectos biológicos de los radicales libres.

Palabras clave: radicales libres, antioxidantes, daño oxidativo.

ABSTRACT

Oxygen is an essential molecule for living aerobic organisms, however its chemical reduction inside the cells produces the called reactive oxygen species, most of them are free radicals. These are atoms, or molecules, with an unpaired electron. The presence of unpaired electron causes they to be highly reactive. After its formation, they interact with organic molecules as proteins, lipids, carbohydrates, and DNA, producing in them several structural and functional modifications and alterations. As a result of this damage the physiology of cells and organisms is also altered. This kind of damage has been associated with several diseases as Alzhaimer, Huntington, Parkinson, as well as to carcinogenic and aging processes. Simultaneously, the studies on antioxidant agents has become a very important research field, since through the knowledge of their mechanisms of action it might be possible to counteract the effects of free radicals, in order to diminish the biological effect of oxidative damage.

Key words: free radicals, antioxidants, oxidative damage.

INTRODUCCION

El oxígeno es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aerobios, ya que participa en diversas reacciones de oxidación, incluyendo la respiración. Durante estos procesos el oxígeno molecular se reduce, dando origen a las llamadas especies reactivas de oxígeno, las que en su mayoría son radicales libres.

Un radical libre es una especie química (molécula o átomo) que presenta al menos un electrón no aparcado. La mayoría de los radicales libres son en extremo reactivos y tienden a asociarse "aparcando" el electrón libre [1]. Los radicales derivados del oxígeno son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, mecanismo a través del cual provocan daño a nivel celular y tisular, con la consiguiente alteración de su función [2]. Recientemente se les ha implicado en diversos padecimientos como la carcinogénesis [3], el envejecimiento [4] y con desórdenes de tipo neurológico como la epilepsia, la enfermedad de Huntington [5] y el mal de Parkinson [6].

Los radicales libres se pueden formar en el interior de las células como producto de sus actividades fisiológicas normales [7] o a partir de procesos como la hipoxia, en la que se observa un aumento en la formación de radicales libres, que pueden inducir lipoperoxidación en la membrana de las células del cerebro y con esto alteraciones en la función del mismo [8]. En el Cuadro I se mencionan los sitios de la célula en donde pueden generarse radicales libres a partir de los procesos fisiológicos normales.

Los radicales libres pueden generarse también a partir de fuentes exógenas, como las radiaciones ionizante, ultravioleta, la visible o térmica, drogas antitumorales, algunos productos químicos carcinogénicos, agentes contaminantes, pesticidas y humo del cigarro [10,11,12]; también diversos medicamentos pueden inducir la liberación de radicales libres, como el acetaminofen [13,14], la neomicina, la polimixina B, la kanamicina, la gentamicina [15,16] y el cloramfenicol [17].

Profesores Titulares del Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa.

Correspondencia: María Cristina González Torres, Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa. Av. Michoacán y la Purísima. Col. Vicentina. Delegación Iztapalapa. C.P. 09340. México D.F. E-mail: mcgon@xanum.uam.mx

Las especies reactivas de oxígeno se forman por la reducción secuencial del oxígeno (O_2), que primero produce el radical superóxido (O_2^-), y el radical perhidroxilo (HO_2^-), posteriormente genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y finalmente el radical hidroxilo (^-OH) [12]. Otro radical libre que se forma de la reacción del radical superóxido con el óxido nítrico es el peroxinitrito ($ONOO^-$). Algunas de estas reacciones son dependientes de la presencia de metales de transición, en particular de fierro y cobre [12,13].

Las especies reactivas de oxígeno mas importantes y sus características fundamentales se presentan en el Cuadro 2. Aunque en general se considera que los radicales libres tienen una alta reactividad, esta puede ser variable, siendo posiblemente los radicales menos reactivos los mas dañinos en ciertas circunstancias, debido a la posibilidad que tienen de interactuar con estructuras biológicas alejadas de su sitio de origen [1], esto es igualmente valido para los productos generados de la interacción primaria entre un radical libre y una molécula biológica.

Las consecuencias de las reacciones de los radicales libres con diferentes materiales celulares pueden ser muy variadas. Los objetivos celulares frecuentemente atacados son, el ADN, los lípidos membranales, así como proteínas y carbohidratos. A nivel de organelos, se ha observado que las mitocondrias son sumamente sensibles a la presión oxidativa, lo que se refleja en cantidades elevadas de oxidación en lípidos y proteínas, y en mutaciones del ADN mitocondrial [22].

DAÑO AL ADN

El daño provocado a nivel del ADN por los radicales libres puede generar mutaciones somáticas, que llevarían a la síntesis de proteínas defectuosas, y posiblemente a la generación de transformaciones malignas.

Uno de los componentes de la molécula de ADN que es susceptible a ser dañado por radicales libres es la desoxirribosa [23], la que al oxidarse puede inducir el rompimiento del enlace entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se forman rompimientos de cadena sencilla, los que son reparados por medio de las enzimas correspondientes. Cuando gran cantidad de radicales hidroxilo atacan una parte restringida de la molécula de ADN, se forman numerosos rompimientos de cadena sencilla, que por su cercanía podrían conducir a la formación de rompimientos de cadena doble, los que provocan daño permanente al material genético [24]. La reactividad del radical hidroxilo hacia los diferentes átomos de hidrógeno de la desoxirribosa varía considerablemente, siendo los carbonos 4 y 5 los sitios primarios de ataque, ya que en la molécula de ADN son los que quedan mas expuestos [25].

Los radicales hidroxilo tienen la capacidad de reaccionar también con las bases nitrogenadas del ADN. El tipo predominante de alteración que puede observarse a este nivel son las substituciones, aunque también es frecuente observar deleciones y con menor frecuencia inserciones. Se ha visto que las substituciones frecuentemente involucran al par guanina-citocina, con el que los radicales hidroxilo y el oxígeno simple reaccionan directamente. Las mutaciones se concentran en regiones específicas del ADN, que se denominan "puntos calientes", lo que indica que están relacionadas con las secuencias de bases púricas y pirimídicas [1].

Es probable que el oxígeno simple reaccione con la guanina eliminándola del ADN, lo que provoca la formación de rompimientos de cadena sencilla, o bien, que pueda generar un gran número de productos de reacción derivados de ella (de los que se han identificado hasta doce diferentes) los que constituirán los llamados sitios sensibles al álcali, que se convertirán en rompimientos después de tratamiento alcalino [1]. Uno de los productos formados es la 8-hidroxiguanosina, la que puede formarse por los radicales libres directamente sobre la molécula de ADN; o sobre los precursores de la misma, esta molecula puede identificarse en la orina humana, cuando el daño al ADN fue reparado [1].

Las mutaciones se establecen cuando una cadena de ADN dañada es copiada durante la duplicación [26]. Otra posibilidad, es que la duplicación quede bloqueada cuando la ADN polimerasa encuentra una lesión, o bien, en estos puntos de lesión la enzima puede leer erróneamente el mensaje de la cadena dañada y generar una cadena complementaria defectuosa [27].

DAÑO A LIPIDOS MEMBRANALES

La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la de los organelos celulares. Con respecto a la permeabilidad se afecta tanto el transporte pasivo como el activo al alterarse las interrelaciones de fluidez de los lípidos que forman las membranas biológicas [27].

Los ácidos grasos poli-insaturados, que predominantemente se ubican en las membranas celulares, son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres. Cuando los radicales hidroxilo se forman cerca de la membrana son capaces de extraer átomos de hidrógeno de los fosfolípidos que la componen, después de esta reacción aunque el hidroxilo original se ha inactivado, se forma un radical lipídico, el que después de un rearreglo molecular (dieno conjugado), puede reaccionar con el oxígeno para originar el radical peroxilo ($R\text{-}OO^-$), este puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando más radicales lipídicos, mientras él mismo se transforma en hidroperóxido (R-OOH), el que en presencia de varios complejos metálicos puede descomponerse en mas radicales, incluyendo entre ellos al radical hidroxilo, lo que provoca un fenómeno de expansión del daño, en el que se considera que la peroxidación se ha propagado (Cuadro 3).

En ausencia de iones metálicos los hidroperóxidos pueden acumularse en la membrana y con esto alterar su función, pueden transformarse en aldehídos, dentro de los que el mas estudiado es el malondialdehído y que puede provocar daño a otras moléculas como el ADN [28]. Alternativamente el radical peroxilo puede dar origen a peróxidos cíclicos, los que pueden descomponerse para formar radicales lipídicos [18]. A este fenómeno globalmente se le denomina lipoperoxidación y en ausencia de algún proceso que la inhiba puede provocar la rápida destrucción de la fase lipídica de las membranas [29].

Durante el proceso de lipoperoxidación se forman otros compuestos (no radicales libres) que afectan otras estructuras celulares, estos son principalmente hidroxialquenales, siendo el 4-OH-2,3-transnonenal uno de los mas toxicos. Los alquenales son compuestos que reaccionan con el ADN, inhiben la síntesis de proteínas y ARN, así como la reparación del ADN y se unen al glutation disminuyendose su capacidad protectora dentro de la celula [10,11].

Dentro del proceso mismo de la lipoperoxidacion, los radicales que se forman pueden causar tambien daños a las proteinas membranales, inactivando receptores o enzimas unidas a las membranas [12].

La lipoperoxidación no sólo daña a las membranas, ya que también tiene efectos sobre lipoproteinas plasmaticas (p.ej. las lipoproteinas de baja densidad del plasma sanguineo) [13].

Un incremento en la lipoperoxidación ha sido tambien asociado con el envejecimiento [14].

DAÑO A PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS

En proteínas y carbohidratos, los radicales libres pueden inducir fragmentación con la perdida de la funcion de estas moléculas.

Los aminoácidos aromáticos, la cisteina, los enlaces disulfuro y los enlaces peptidicos son fragmentados por los radicales libres alterándose su estructura y su función.

El radical hidroxilo es muy reacuvo con las proteinas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos, pero en particular ataca a la tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, metionina y cisteina [12], forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce la fragmentación de la cadena polipeptidica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteoliticas. Las proteinas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteoliticas debido a la formación de grupos carbonilo, a la creacion de nuevos grupos N-terminales, o a cambios conformacionales de la molécula [35]. Datos experimentales muestran que el radical peroxinitrito (ONOO-) oxida a las proteinas membranales y citoplásmicas, afectando su naturaleza fisica y química [21].

Diversas reacciones de oxidación pueden convertir algunos residuos de aminoácidos, como la prolina, la arginina y la lisina, a derivados de tipo carbonilo [36]. La presencia de este grupo químico se ha utilizado como un parámetro para evaluar el daño oxidativo en las proteinas [37,38]. De esta manera, se ha estimado que 2 nmol de grupos carbonilo por miligramo de proteina, cantidad observada en personas jovenes, representan un daño del 10% del total de las proteinas celulares, mientras que en los ancianos este porcentaje se incrementa a 20 y 30% del total de las proteinas celulares [39].

En pacientes con envejecimiento prematuro, como la progeria, la cantidad de grupos carbonilo en sus celulas es significativamente mayor que las de individuos normales de la misma edad [36]. Este incremento de proteinas dañadas podria relacionarse con deficiencias en su eliminación, o con un incremento en la tasa de oxidación de proteínas durante el envejecimiento [40,41].

Los radicales libres pueden inducir cambios especificos en la estructura de algunos aminoácidos, como los atribuidos al radical hidroxilo, que convierte la fenilalanina a tirosina [20], y al oxido nitrico que transforma la tirosina en nitrotirosina [42]. Estos dos aminoacidos no están presentes normalmente en las proteinas, por lo que representan marcadores utiles para evaluar daño oxidativo [40].

En otro proceso el peroxinitrito puede hidroxilar la fenilalanina y nitrar la tirosina [42]. Con respecto a esto se desconocen las consecuencias biológicas de la nitracion de las proteinas *in vivo* [43], sin embargo se ha observado una abundante nitración de las proteinas en pacientes con aterosclerosis [44], lo que tal vez podria tener alguna relacion con el padecimiento.

Las alteraciones conformacionales provocadas en las proteinas por los radicales libres se relacionan con la pérdida de la actividad catalitica de enzimas tales como la lisosima y la ribonucleasa [5]. La inactivación de enzimas por la oxidación inducida por medio de radicales libres y la acumulación intracelular de proteinas oxidadas, podrian jugar un papel critico en la alteracion de las funciones celulares y en la muerte celular [26].

La disminución substancial en la concentración de las enzimas en la fisiologia de la célula y la acumulación de cantidades masivas de proteínas dañadas compromete seriamente la integridad celular [44]. A nivel de la membrana plasmatica, las alteraciones inducidas sobre sus proteinas afectan a los transportadores, los canales proteicos, los receptores o proteinas reguladoras y a los inmunorreguladores [45]. La combinación de todas estas alteraciones pueden tener consecuencias letales para las celulas.

Los efectos de los radicales libres sobre los carbohidratos, son poca conocidos, pero se ha establecido que el acido hialuronico, la condroitina y el dermatán sulfato, todos ellos polisacáridos del grupo de los glucosaminoglucanos, son susceptibles a su degradación en presencia de las especies reactivas de oxigeno, particularmente a los radicales superoxido e hidroxilo, lo que probablemente altera la función de los proteoglicanos de los que forman parte y esto se ha relacionado con la patogenia del proceso inflamatorio [45].

ANTIOXIDANTES

Las células presentan mecanismos de protección, de manera que los radicales libres derivados de la activacion del oxigeno pueden ser transformados a productos menos tóxicos o no toxicos. La protección de las celulas contra los radicales libres derivados del oxigeno comprende no solo la captura de estos intermediarios agresivos, sino también la prevención de su formacion, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones.

La primera linea de defensa del organismo contra los radicales libres es la prevención, esto implica la acción de procedimientos que bloquean su formación, como sería la presencia de proteinas que se unen a metales (en particular hierro y cobre) lo que controla

eficientemente la lipoperoxidación y la fragmentación del ADN, ya que de esta manera se evita la participación de estos metales en las reacciones donde se producen las diferentes especies reactivas de oxígeno [1,2].

Dentro de las proteínas que se ligan a metales se pueden mencionar la ferritina, transferrina, ceruloplasmina, la albumina y las metalotioneinas. En el plasma sanguíneo la mayor acción protectora es efectuada por la transferrina y la ceruloplasmina. La ferritina es una proteína intracelular que evita la acumulación de fierro libre, mientras que la ceruloplasmina es la encargada de captar aproximadamente el 90% del cobre extracelular. Su actividad más importante reside en inactivar el radical superóxido [46].

La albúmina, que es la proteína mas abundante del plasma presenta propiedades antioxidativas. Se le considera la responsable de captar entre el 10 y el 50% del total de radicales peroxilo que se generan en el plasma humano, además de que tiene la capacidad de unirse al cobre, y de esta manera inhibe la formación del radical hidroxilo que se forma a partir del peróxido de hidrógeno [47].

En un segundo nivel de protección está la acción de los antioxidantes, que eliminan a los radicales para suprimir su actividad nociva en la célula. Estos agentes pueden dividirse en dos categorías: no enzimáticos y enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos se unen a los radicales libres, y los transfieren de sitios donde pueden provocar graves daños (p. ej. las membranas) a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos (p. ej. el citoplasma), o bien, los transforman en radicales menos agresivos. Ejemplos de este tipo de antioxidantes son: α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, ascorbato (vitamina C), glutatión, urato, bilirrubina y flavonoides entre otros. La vitamina E, el β-caroteno y la vitamina C son los únicos nutrientes esenciales que atrapan directamente radicales libres. La vitamina C es soluble en agua y se ubica en el citoplasma celular, mientras que la vitamina E y el β-caroteno son solubles en lípidos [28,48,49].

El α-tocoferol está presente en las membranas celulares y en las lipoproteínas plasmáticas, y se caracteriza por presentar en su estructura un grupo -OH, del que el átomo de hidrógeno puede removerse fácilmente. Los radicales peroxilo formados durante la lipoperoxidación tienen una mayor afinidad por el α-tocoferol, que por las cadenas de los ácidos grasos adyacentes, la reacción convierte α-tocoferol en un radical, que es poco activo e incapaz de reaccionar con otros ácidos grasos, y de esta manera detiene la cadena de reacciones de la lipoperoxidación [1,28]. En este punto la vitamina C juega un papel importante ya que regenera la forma antioxidante de la vitamina E, además de que tiene la capacidad de reaccionar por sí misma con los radicales superóxido, hidroxilo y perhidroxilo [50].

Se considera que la vitamina C esta en la fase acuosa, y es la defensa más importante contra los radicales libres [29], eliminándolos de los compartimentos hidrofílicos de la célula, de la matriz extracelular y del sistema circulatorio, que es donde se le puede encontrar, además, participa en la protección de las moléculas hidrofóbicas como las lipoproteínas del plasma sanguíneo y de los lípidos membranales. Las evidencias experimentales muestran que la interacción entre la vitamina C y la vitamina E permite la regeneración no enzimática del α-tocoferol (TCOH) a partir del radical α-tocoperoxil ($TCO^{\cdot}$), que se forma cuando el α-tocoferol reacciona con los radicales peroxilo ($ROO^{\cdot}$), esto por medio del ascorbato (AH^-) (Cuadro 4). Finalmente el ascorbato es regenerado a través de una vía enzimática [51].

El β-caroteno tiene dos funciones: en primer lugar actua directamente como atrapador del oxígeno simple y de lipoperóxidos, y en segundo lugar puede ser transformado a vitamina A en el intestino humano [1]. Tanto el β-caroteno como la vitamina A son antioxidantes solubles en lípidos y tienen la posibilidad de unirse a las diferentes especies reactivas de oxígeno, aunque la manera en que lo hacen no se conoce completamente [51]. Se asume que el β-caroteno se ubica en el interior de las membranas, o en las lipoproteínas del plasma [52].

El glutatión juega un papel importante en la protección celular contra el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Presenta una interacción sinergica con otros agentes antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E y las superóxido-dismutasas [53,54]. Actúa como atrapador de radicales hidroxilo y del oxígeno simple, además de tener la capacidad de reactivar enzimas que son inhibidas al ser expuestas a altas concentraciones de oxígeno. En los humanos la incapacidad para sintetizar glutatión puede provocar anemia hemolítica y alteraciones neurológicas [55]. Así mismo, el glutatión protege contra el daño oxidativo reduciendo la concentración de peróxido, lo que es valioso ya que éste, como ocurre en la lipoperoxidación, amplifica el proceso de daño [53].

Otros ejemplos de antioxidantes no enzimáticos son la poliamina espermina, la coenzima Q y los flavonoides, la primera se encuentra normalmente en concentraciones milimolares en el núcleo y participa directamente como atrapador de radicales libres, actuando como el mayor compuesto natural ubicado intracelularmente y que es capaz de proteger al ADN del ataque de los radicales libres [56]. La coenzima Q funciona como un antioxidante altamente eficiente en las membranas celulares en que se encuentra [50]. Los flavonoides por su parte actúan como inhibidores de la lipoperoxidación, además de poder interactuar directamente con las especies reactivas de oxígeno y como agentes quelantes para iones divalentes [10].

Con respecto a los antioxidantes enzimáticos se puede señalar que en las células se presentan tres sistemas principales de enzimas antioxidativas: las superóxido dismutasas, la catalasa y las glutation peroxidasas [10].

Las superóxido dismutasa (SOD) catalizan el cambio del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. La dismutación es una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes, en este caso una molécula de superóxido se oxida y la otra se reduce:

$$2O_2^{\cdot} + 2H^+ \xrightarrow[SOD]{} H_2O_2 + O_2$$

Estas son una familia de metaloenzimas, que contienen cobre y zinc. De ellas se conocen al menos tres formas diferentes, que se ubican en el citoplasma de la célula, en las mitocondrias y en los fluidos extracelulares respectivamente [57,58].

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION

La catalasa es una enzima de amplia distribución, que consiste de cuatro subunidades proteicas, cada una con un grupo hemo unido a su sitio activo. Se caracteriza además por presentar una tasa de renovación extraordinariamente elevada (>40 000 moléculas por segundo). Su actividad se localiza básicamente en los peroxisomas, en donde cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno, en agua y oxígeno molecular en muchos tejidos [1].

$$2H_2O_2 \xrightarrow[\text{Catalasa}]{} 2H_2O + O_2$$

La glutatión-peroxidasa (GP) es una enzima que utiliza como cofactor al selenio, y que se ha encontrado en el citoplasma y las mitocondrias de los tejidos animales. Cataliza la reacción a través de la cual el glutatión reducido (GSH) reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante el proceso el glutatión es oxidado (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original, por la enzima glutatión reductasa [9].

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow[\text{GP}]{} GSSG + 2\,H_2O$$

Si después de la acción de los antioxidantes el daño persiste, el último nivel de protección de la célula consiste en la reparación de las lesiones, lo que reside básicamente en la actividad de enzimas que repararan el daño inducido por los radicales libres al ADN, y de otras que destruirán las proteínas dañadas por los radicales libres ó las que removerán los ácidos grasos oxidados de las membranas [4].

La importancia de la interacción de las diferentes especies reactivas de oxígeno con moléculas biológicas como el ADN, los lípidos, las proteínas y los carbohidratos, se traduce en alteraciones de la estructura, o en la fragmentación de las biomoléculas, lo que está relacionado con las modificaciones de la fisiología celular, y por consecuencia, de los organismos de que forman parte. Por lo anterior se está analizando el papel de las especies reactivas de oxígeno en el desarrollo de diversos padecimientos, y la actividad de los agentes antioxidantes, como medios potenciales para controlar los efectos de los radicales libres, sobre todo ante la posibilidad de implementar las "terapias antioxidantes".

Lugar	Reacción
Retículo endoplásmico	Transporte de electrones dependiente del Citocromo P-450 Transporte de electrones dependiente del Citocromo b5
Mitocondria	Transporte de electrones (cadena respiratoria: principales sitios, complejo NADH-CoQ reductasa y formas reducidas de la coenzima Q: $O2 + e \rightarrow O_2^{\cdot}$) Lipoperoxidación
Lisosomas	Sistema de la mieloperoxidasa
Membranas	Lipoperoxidación Lipo-oxigenasa Prostaglandina sintetasa NADPH-oxidasa*
Peroxisomas	Oxidasas Flavoproteínas
Citoplasma	Auto-oxidación de la oxihemoglobina ($Hemo\text{-}Fe^{2+}\text{-}O_2 \rightarrow Hemo\text{-}Fe^{1+}\ O_2^{\cdot}$ Auto-oxidación de moléculas pequeñas: adrenalina, tioles, flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), glucosa Procesos de transferencia de electrones mediados por metales de transición como el hierro y el cobre, o por enzimas

Fuentes: 1, 7, 8, 9

* Oxida el $NADP^+$, con la resultante reducción del oxígeno para formar el radical superóxido, este mecanismo es utilizado por los neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos para eliminar bacterias, proceso durante el cual los tejidos circundantes pueden verse también afectados [10].

Cuadro 1. Sitios de la célula y reacciones químicas a partir de las que se generan radicales libres

Radical	Nombre	Características
O_2^-	Superóxido	Es muy reactivo en medio hidrofóbico, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas puede transformarse en peróxido de hidrógeno [19]
OH	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente en ADN, proteínas y lípidos
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	No es un radical, pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos, como el Fierro y el Cobre [20, 26]
ONOO	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado directamente con la patología de varios desórdenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer [21]
$^1O_2$	Oxígeno simple	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido, y durante la lipoperoxidación [11]. Juega un papel importante en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desórdenes degenerativos

Cuadro 2. Especies reactivas de oxígeno y sus principales características

$$RH + \text{Radicales libres} \rightarrow R^{\cdot}$$

$$R^{\cdot} \text{ (rearreglo molecular, formación de un dieno conjugado)} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$$

$$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$$

$$ROOH + Fe^{2+} \rightarrow ROO^{\cdot} + {}^{\cdot}OH$$

RH - Acido graso poli-insaturado. $R^{\cdot}$ - Radical lipídico. $ROO^{\cdot}$ - Radical peroxilo.
ROOH - Radical hidroperóxido. ${}^{\cdot}OH$ - Radical hidroxilo.

Cuadro 3. Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación

$$ROO^{\cdot} + TCOH \rightarrow ROOH + TCO^{\cdot}$$

$$TCO^{\cdot} + AH \rightarrow TCOH + A^{\cdot}$$

$ROO^{\cdot}$ - Radical peroxilo. TCOH - Vitamina E. $TCO^{\cdot}$ - Radical α-tocoperoxil. $AH^{\cdot}$ - Vitamina C.

Cuadro 4. Regeneración de la vitamina E a partir de su interacción con la vitamina C

BIBLIOGRAFIA

1. Bunker AW. Free radicals, antioxidants and ageing. Med Lab Sci 1992; 49: 299-312.
2. Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. Acta Neurol Scand 1998; 98: 145-53.
3. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. Histol Histopathol 1997; 12: 525-35.
4. Kong Q, Lillehei KO. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. Med Hypotheses 1998; 51: 405-9.
5. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. Mov Disord 1998; 13 Suppl 1: 24-34.
6. Malik D, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Direct measurement of oxygen free radicals during in utero hypoxia in the fetal guinea pig brain. Brain Res 1998; 798: 166-72.
7. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Biochem J 1988; 256: 205-12.
8. Darget R. Lipid peroxidation – a common pathogenetic mechanism? Exp Toxic Pathol 1992; 44: 169-84.
9. Sies H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 1993; 215: 213-19.
10. Halliwell B. Antioxidants and human disease. Nutr Rev 1997; 55: S44-S52.
11. Retel J, Hoebee B, Braun J, Lutgerink J, Van den Akker E, Wanamarta H, et al. Mutational specificity of oxidative DNA damage. Mutat Res 1993; 299: 163-82.
12. Vilar-Rojas C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. Arch Med Res 1996; 27: 1-6.
13. Wendel A, Feurstein S, Konz KH. Acute paracetamol intoxication of starved mice leads to lipid peroxidation in vivo. Biochem Pharmacol 1979; 28: 2051-55.
14. McLean AEM, Nuttal L. An in vitro model of liver injury using paracetamol treatment of liver slices and prevention of injury by some antioxidants. Biochem Pharmacol 1978; 27: 425-30.
15. Hester TO, Jones RO, Clerici WJ. Protection against aminoglycoside otic drop-induced ototoxicity by a spin trap. Otolaryngol Head Neck Surg 1998; 119: 581-7.
16. Song BB, Sha SH, Schacht J. Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo and vestibulo-toxicity. Free Radic Biol Med 1998; 25: 189-95.
17. Holt DE, Ryder TA, Fairbairn A, Hurley R, Harvey D. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies. Hum Exp Toxicol 1997; 16: 570-6.
18. Cadenas E. Biochemistry of oxygen-toxicity. Annu Rev Biochem 1989; 58: 79-110.
19. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 1988; 240: 1302-7.
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 1984; 219: 1-33.
21. Koppal T, Drake J, Yatin S, Jordan B, Varadarajan S, Bettenhausen L, et al. Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer disease. J Neurochem 1999; 72: 310-17.
22. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. Biochim Biophys Acta 1998; 1366: 53-67.
23. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. Free Rad Biol & Med 1995; 18: 1033-77.
24. Ward JF. Biochemistry of DNA lesions. Radiat Res 1985; 104: S103-11.
25. Balasubramanian B, Pogozelski WR, Tullius TD. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9738-43.
26. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. FEBS Lett 1991; 281: 9-19.
27. Sarin M, Bors W. Radical reactions in vivo. An overview. Radiat Environ Biophys 1990; 29: 249-62.
28. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am J Med 1991; 91: 14S-22S.
29. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato F. Membrane damage due to lipid oxidation. Am J Clin Nutr 1991; 53: 201S-5S.
30. Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. Biochim Biophys Acta 1980; 620: 281-96.
31. Poli G, Chiarpotto E, Biasi F. Role of aldehydes in the propagation of lipid peroxidation induced liver toxicity. Adv Biosci 1989; 76: 73-81.
32. Dean RT, Thomas SM, Garner A. Free radical mediated degradation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Role of lipid radicals. Biochem J 1986; 240: 489-94.
33. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res 1998; 39: 1529-42.
34. Knight JA, Smith SE, Kinder VE, Anstall HB. Reference ranges for plasma lipoperoxides: Age, Sex and specimen related variations. Clin Chem 1987; 42: 2289-91.
35. Primose C, Dubilchitsky LMAR, VanSteveninck J. Protein damage induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. Biochim Biophys Acta 1990; 1038: 152-7.
36. Stadtman ER. Oxidation of proteins by mixed function oxidation systems. FEBS 1986; 11: 1-2.
37. Oliver CN, Starke Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and of glutamine synthetase activity and production of free radicals during ischemia/reperfusion induced injury to gerbil brain. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5144-47.
38. Sundari PN, Wilfred G, Ramakrishna B. Does oxidative protein damage play a role in the pathogenesis of carbon tetrachloride induced liver injury in the rat? Biochim Biophys Acta 1997; 1362: 169-76.
39. Starke Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. Arch Biochem Biophys 1989; 275: 559-67.
40. Leeuwenburg Ch, Hansen P, Shaish A, Holloszy J, Heinecke JW. Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. Am J Physiol 1998; 274: R453-61.
41. Kaur H, Halliwell B. Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation. Methods Enzymol 1994; 233: 67-82.
42. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. Chem Res Toxicol 1992; 5: 834-42.
43. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. Biol Chem Hoppe Seyler 1994; 375: 81-5.
44. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science 1992; 257: 1220-4.
45. Moseley R, Waddington RJ, Embers G. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Biochim Biophys Acta 1997; 1362: 221-31.
46. Solomons NW. On the assessment of zinc and copper nutriture in man. Am J Clin Nutr 1979; 32: 856-71.
47. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate, and proteins to the total peroxyl radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. Biochim Biophys Acta 1987; 924: 408-19.
48. Lawrence JM, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. FASEB J 1987; 1: 441-5.
49. Krinsky NI. Antioxidant functions of carotenoids. Free Radic Biol Med 1989; 6: 617-37.
50. Beyer RE. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. J Bioenerg Biomembr 1994; 26: 349-58.
51. Odin AP. Vitamins and antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. 1997; 386: 39-67.
52. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh H. Interaction among vitamin C, vitamin E and beta-carotene. Am J Clin Nutr 1995; 62: 1322S-26S.
53. Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. Pharmacol Ther 1990; 47: 61-71.
54. Gerard Monnier D, Chaudiere J. Metabolism and antioxidant function of glutathione. Pathol Biol (Paris) 1996; 44: 77-85.
55. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. Science 1983; 220: 472-6.
56. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. Proc Natl Acad Sci 1998; 95: 11140-5.
57. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. J Biol Chem 1973; 248: 4793-6.
58. Marklund SL. Human copper containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 7634-8.
59. Neve J, Vertongen F, Molle L. Selenium deficiency. Clin Endocrinol Metab 1985; 14: 629-56.
60. Anderson D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. Mutat Res 1996; 350: 103-8.

Environmental and Molecular Mutagenesis 39:33–42 (2002)
DOI 10.1002/em.10038

Hydrogen Peroxide–Induced DNA Damage and DNA Repair in Lymphocytes From Malnourished Children

C. González,[1*] O. Nájera,[2] E. Cortés,[1] G. Toledo,[3] L. López,[4] M. Betancourt,[1] and R. Ortiz[1]

[1]*Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México Distrito Federal, Mexico*
[2]*Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México Distrito Federal, Mexico*
[3]*Hospital Infantil Xochimilco, Departamento Distrito Federal, México Distrito Federal, Mexico*
[4]*Hospital Infantil Iztapalapa, Departamento Distrito Federal, México Distrito Federal, Mexico*

The aim of this study was to assess DNA repair capacity in lymphocytes of children with protein calorie malnutrition using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. Repair capacity was assessed by estimating the relative decrease of DNA migration length 5, 15, 30, and 60 min after hydrogen peroxide treatment, in three groups of children: well-nourished (WN), well-nourished infected (WN-I), and malnourished infected (MN-I). In addition, the DNA migration length was evaluated in all groups before and after peroxide treatment. Comparison of mean migration lengths observed in WN and WN-I children showed significant differences at all times tested; between WN-I and MN-I differences were also observed, except after hydrogen peroxide exposure. This implies that lymphocytes of WN-I and MN-I children were equally sensitive to hydrogen peroxide. Nevertheless, the MN-I group clearly shows the greatest overall percentage of damaged cells at all times tested. In relation to repair capacity, at 5 min it was approximately 30% in both groups of well-nourished children, but only 20% in MN-I; 15 min after exposure, repair capacity increased to 51% in well-nourished children but only to 31% in MN-I, and at 60 min this capacity increased to 82% in well-nourished but only to 55% in MN-I. These data indicate that lymphocytes of malnourished children show a decreased capacity to repair hydrogen peroxide–induced DNA damage compared to that of well-nourished controls. This reflects that only malnutrition is associated with decreased DNA repair capacity. Additionally, the data confirm that severe infection and malnutrition are two factors clearly associated with increased DNA damage. Environ. Mol. Mutagen. 39:33–42, 2002 © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: malnutrition; DNA repair; lymphocytes; comet assay

INTRODUCTION

Approximately one-third of the child population suffers from protein calorie malnutrition (PCM) worldwide, affecting mainly developing countries in Africa, Asia, Latin America, and Oceania [De Onis et al., 1993]. Furthermore, PCM is the determining cause of death in approximately 55% of the children who die between 1 and 4 years of age [Pelletier et al., 1993].

The cytogenetic effects of PCM have been assessed in malnourished children by several methods. Sister-chromatid exchange analyses (SCE) have provided controversial data: whereas Mutchinick et al. [1979] found that SCE frequencies were similar in well-nourished and malnourished children, Murthy and Rahiman [1983] and Ortiz et al. [1994] observed significantly higher SCE frequencies in children with malnutrition. The basal frequency of micronuclei was greater in PCM children than in well-nourished controls, and lymphocytes of malnourished children showed greater susceptibility to mitomycin C–induced damage [Ortiz et al., 1997]. Furthermore, increased DNA damage in malnutrition has been detected by the single-cell gel electrophoresis technique (SCGE or comet assay), although the damage was also associated with the presence of infection and drug treatments [Betancourt et al., 1995].

The alkaline SCGE technique provides a very sensitive method for detecting DNA damage induced by several factors [Tice, 1995]. This method detects single-strand breaks and alkali-labile regions in individual cells by submitting DNA to an electric field. SCGE has several advantages: it requires a minimum amount of sample, the analysis

*Correspondence to: Cristina González, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apdo. Postal 55-535, C.P. 09340 México D.F., Mexico. E-mail: mcgt@xanum.uam.mx

Received 7 April 2001; provisionally accepted 23 July 2001 and in final form 16 October 2001

Published online 23 January 2002

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

is carried out on individual cells and can be performed on various cell types from different species, and is relatively simple and fast [McKelvey-Martin et al., 1993]. Because of its sensitivity, SCGE has also been used to assess DNA repair in normal and transformed cell populations [Singh et al., 1988; Olive et al., 1990; Singh et al., 1990, 1994; Tice et al., 1990; Collins et al., 1995; Lankinen et al., 1996; Lankinen and Vilpo, 1997; Plappert et al., 1997].

Increased DNA damage found in cells of malnourished children may be caused by various factors, such as the following:

1. The immune response triggered by both bacterial and parasite infections frequently associated with malnutrition increases free-radical concentrations, which induce DNA damage [Canella et al., 1996].
2. Toxins liberated by several pathogens may induce DNA damage in the host cell [Ahuja, 1991].
3. Malnourished children show free-radical–scavenging molecule deficiency (vitamins C and E and glutathione) [Becker et al., 1995; Lenhartz et al., 1998].
4. Protein deficiency (very common among malnourished children) may alter the DNA duplication process.
5. Protein deficiency may alter the DNA repair process.

The DNA repair process has not been studied in malnourished children. Therefore, the aim of this study was to assess DNA repair capacity in hydrogen peroxide–exposed lymphocytes of children with PCM using the SCGE technique.

MATERIALS AND METHODS

This study was assessed and approved by the Ethics Committee of the General Direction of Medical Services, Federal District Department (Mexico). The samples were provided by the Xochimilco and Iztapalapa Children's Hospitals, Mexico.

Subjects

Three groups of children were studied:

Group I: Well-Nourished, Noninfected Children (WN)

This group included six well-nourished children with no evidence of infection, five boys and one girl, whose ages ranged from 13 to 44 months. All had adequate height and weight according to age (deficit < 20%).

Group II: Well-Nourished, Infected Children (WN-I)

This group included six well-nourished boys hospitalized because of respiratory, gastrointestinal, or urinary bacterial infections. Their ages ranged from 7 to 22 months, and all had adequate weight/height ratios according to age.

Group III: Malnourished, Infected Children (MN-I)

This group included five girls and two boys, whose ages ranged from 6 to 29 months. All had severe malnutrition: six were marasmus (weight/height ratio deficit > 40%) and one kwashiorkor (weight/height ratio deficit was 3%). They had been admitted because of gastrointestinal, respiratory, or renal bacterial infections. Weight/height deficit was determined according to tables for Mexican children in all cases [Ramos-Galvan, 1976].

Blood Sampling and Isolation of Cells

Samples of peripheral blood (~2 ml) were drawn from each child (prior to initiation of drug treatment) and mixed with phosphate-buffered saline (PBS, 1:1, v/v). The sample was carefully placed on Emlograd (Microlab, Mexico), and centrifuged at 300g for 30 min. Lymphocytes were collected and washed twice with PBS before electrophoresis.

Hydrogen Peroxide Exposure, DNA Repair, and Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis Assay (SCGE)

Lymphocytes were resuspended in low melting point agarose (approximately 10^4 cells in 75 μl agarose) and pipetted onto a frosted slide, precoated with a layer of regular agarose, adding a final layer of low melting point agarose. The slides were immersed in a 10 μM hydrogen peroxide (H_2O_2) solution for 20 min at 4°C, and then in McCoy's 5a modified medium supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C. To assess DNA repair, the slides were analyzed 0, 5, 15, 30, and 60 min after H_2O_2 exposure. All slides were prepared in triplicate. Cell viability was assessed immediately and 60 min after exposure using ethidium bromide and fluorescein diacetate double staining [Strauss, 1991]. Unexposed lymphocytes were assessed to determine basal damage levels in the three study groups.

The comet assay was performed as described by Singh et al. [1988] with modifications described by Tice et al. [1990]. After incubation, slides were immersed in lysis solution [2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 10 mM Tris–NaOH to pH 10.0, and Triton X-100 with 10% fresh DMSO (v/v)] for at least 1 hr. Afterward, they were immersed in alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA) for 20 min to allow the expression of alkali-labile sites and DNA unwinding. The slides were electrophoresed (electrophoresis buffer 300 mM NaOH and 1 mM EDTA) at 25 V and 300 mA for 20 min, washed three times for 5 min with neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) and then stained with ethidium bromide (20 μg/ml in distilled water).

Slides were observed at 400× with an Olympus (Miami, FL) microscope fluorescence equipped with a 515- to 560-nm excitation filter and a 590-nm barrier filter. Fifteen cells per sample were analyzed (25 cells per slide). DNA migration (tail length) was measured from the trailing edge of the nucleus to the leading edge of the tail, using a video imaging system (Syn-Optics, Sunnyvale, CA), a high-resolution CCD camera, and VIDS IV software (Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK). This system allowed measuring the tail length directly from the computer monitor. All slides were coded and scored blindly.

Data Analysis

Mean tail lengths were estimated at different incubation times in all groups. The H dispersion coefficient was estimated, to establish DNA migration length intercellular distribution, where H is the ratio of the sample variance to the sample mean [Tice et al., 1992].

Repair capacity (RC) was estimated as described by Plappert et al. [1997] to assess DNA repair kinetics. This parameter is defined as the relative decrease (%) of the DNA migration length after 5, 15, 30, and 60 min of H_2O_2 treatment.

The severity of DNA damage was measured comparing comet tail lengths with the diameter of the nucleus of undamaged cells observed in the same field [Mendiola-Cruz and Morales-Ramírez, 1999]. Three damage categories were considered: (1) low migration (tail length equivalent to or smaller than the diameter of undamaged nuclei), (2) medium migration

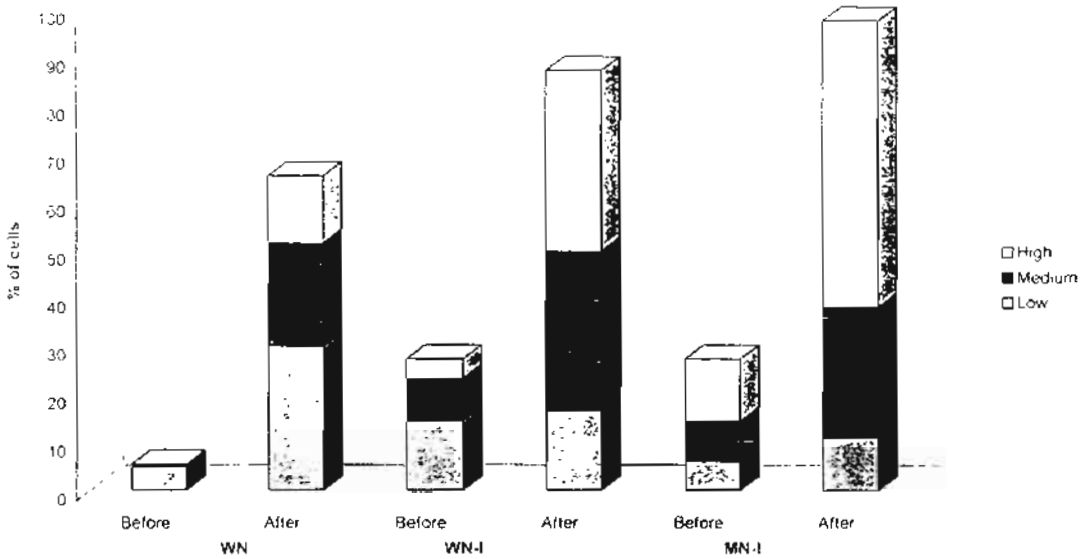


Fig. 1. Percentage of cells with low, medium, and high damage in well-nourished (WN), well-nourished infected (WN-I), and malnourished infected (MN-I) children before and after hydrogen peroxide treatment.

(tail measured up to three times the diameter of undamaged nuclei); and (3) high migration (tail was threefold longer than the diameter of undamaged nuclei).

All the statistical analysis was performed with JMP software v.3.1.2 (North Carolina, USA). The Wilcoxon's matched-pairs rank test was used to compare migration length data and the chi-square test to compare the proportion of cells with low, medium, and high migration. The Tukey–Kramer test was used to determine whether different type of infection, sex, age, weight deficit, weight, or height correlated with basal DNA damage and/or repair capacity among children of each group. Statistically significant change required $P < 0.05$.

RESULTS

Basal DNA Damage

Cell viability, as assessed by the fluorescein diacetate/ethidium bromide method, was greater than 95% in all cases.

Basal DNA damage was estimated as the mean DNA migration length observed prior to H_2O_2 exposure. Individual mean basal DNA migration ranged from 2 to 4 μm in the WN group, from 14 to 24 μm in the WN-I group, and from 20 to 54 μm in the MN-I group (mean ± SE: 2.7 ± 0.6, 18.2 ± 0.9, and 27.2 ± 1.2 μm, respectively). Statistical analyses revealed significant differences not only between the WN and WN-I groups but also between the WN-I and MN-I groups.

In the WN children, the percentages of medium and highly damaged cells were very low (0.6%). In WN-I children, the fractions of medium (9%) and highly (4%) damaged cells were increased. In MN-I children a further increase in the proportion of cells with a high level of DNA damage was detected (13%) (Fig. 1). Differences among the three study groups were statistically significant. The differences show that infection and malnutrition are associated with an increase in the number of cells with high damage.

Statistical analysis revealed no association between sex, age, weight deficit, weight, height, and type of malnutrition with basal DNA damage among the children.

Repair of Induced DNA Damage and DNA Damage Levels

In the three study groups, mean DNA migration lengths clearly increased after hydrogen peroxide exposure (Fig. 1) and DNA repair kinetics tendencies were similar, given that both the mean DNA migration length and the percentage of damaged cells decreased proportionally to the incubation (repair) period. However, decreased damage was much less evident in MN-I children.

In the WN group, DNA migration ranged from 32 to 56 μm (mean ± SE: 45.8 ± 2.7 μm) at time 0 and from 5 to 11 μm after 60 min of incubation (mean ± SE: 8.5 ± 0.7 μm). In WN-I children, migration length ranged from 53 to 94 μm at time 0 and from 8 to 15 μm after 60 min of incubation (mean ± SE: 77.7 ± 1.7 and 12.0 ± 0.7 μm, respectively). In contrast, migration in MN-I children ranged from 64 to 129 μm (mean ± SE: 93.7 ± 2.5 μm) immediately after H_2O_2 exposure and from 31 to 63 μm after 60 min of incubation (mean ± SE: 41.4 ± 2.0 μm) (Table I and Fig. 2). Mean migration lengths observed in

TABLE 1. Mean DNA Migration Length (Before and After Hydrogen Peroxide Exposure) and Mean Repair Capacity in WN, WN-I, and MN-I Children

	DNA migration length (μm)					
	Well-nourished (WN)		Well-nourished infected (WN-I)		Malnourished infected (MN-I)	
	Mean[a]	Repair capacity[b]	Mean[a]	Repair capacity[b]	Mean[a]	Repair capacity[b]
Control before treatment	2.7 (2–4)		18.2 (14–24)*		27.2 (20–54)*	
Incubation time						
0 min	45.8 (32–56)		77.7 (53–94)*		93.7 (64–129)	
5 min	32.0 (24–55)	28.7	54.0 (37–75)*	30.2	75.1 (55–120)	19.9
15 min	22.7 (14–42)	50.3	36.8 (26–41)*	52.0	61.8 (48–92)**	31.4
30 min	14.5 (7–25)	67.4	25.2 (18–31)*	67.3	54.7 (42–76)*	41.3
60 min	8.5 (5–11)	79.7	12.0 (8–15)*	84.3	41.4 (31–63)**	55.2

[a]Ranges are expressed in parentheses.
[b]Repair capacity is defined as the relative decrease (%) of the DNA migration length 5, 15, 30, and 60 min after hydrogen peroxide treatment.
*Significant difference ($P < 0.05$) compared to WN group.
**Significant difference ($P < 0.05$) compared to WN-I group.

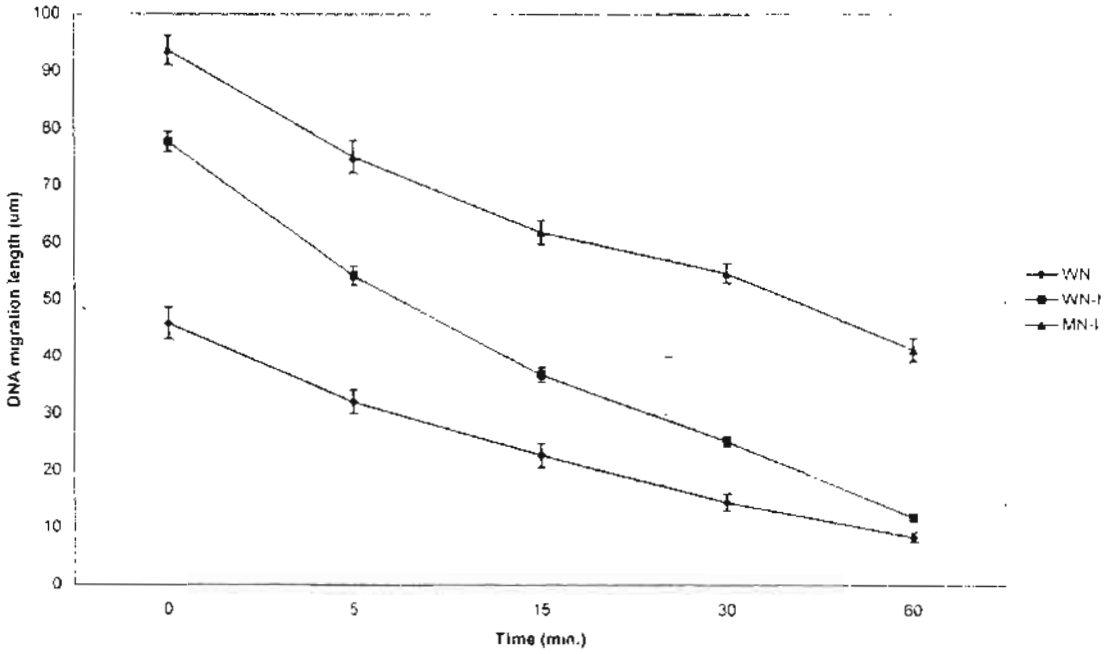


Fig. 2. DNA migration length after 0, 5, 15, 30, and 60 min of DNA repair in well-nourished (WN), well-nourished infected (WN-I), and malnourished infected (MN-I) children.

WN and WN-I children were significantly different at all incubation times tested. Although immediately after H_2O_2 exposure mean migration lengths were not significantly different in WN-I and MN-I children, differences became significant after 5, 15, 30, and 60 min of incubation.

Figures 3, 4, and 5 show the proportion of cells with low, medium, and high migration, respectively. Immediately after H_2O_2 exposure (time 0) 30, 21.6, and 14% of cells of WN children showed low, medium, and high migration, respectively. In WN-I children 16.4, 33.6, and 37.8% of cells showed low, medium, and high damage, respectively, whereas 11, 27.5, and 60% cells of MN-I children showed low, medium, and high damage, respectively. At this time, significant differences were observed only between the WN and WN-I groups.

However, at 5, 15, 30, and 60 min after exposure, differences between WN-I and MN-I became significant. After 60 min of recovery, WN children showed 13.4% cells with low, 3% cells with medium, and 0% cells with high migration, whereas these values were 26.4, 0.2, and 0.0%, respectively, in WN-I children and 22.4, 26.8, and 12%, respectively, in the MN-I group. These data indicate that in MN-I

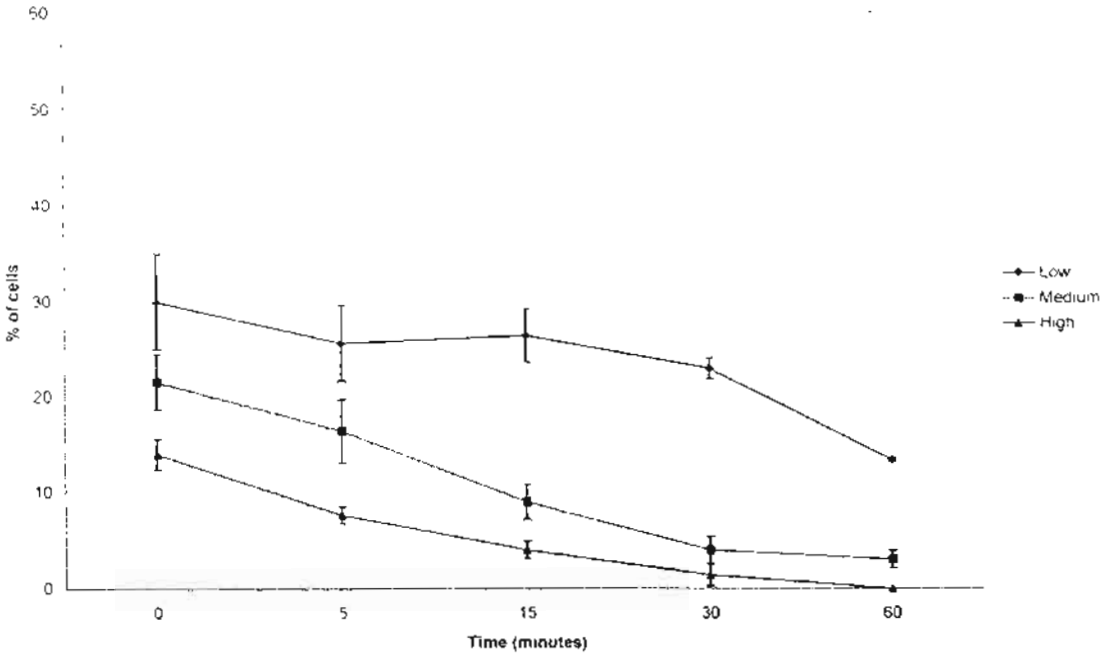


Fig. 3. Percentage of cells with low, medium, and high damage in well-nourished (WN) children after 0, 5, 15, 30 and 60 min of DNA repair.

children the fraction of medium to highly damaged cells was threefold and 13-fold greater than that in well-nourished children 5 and 60 min after exposure, respectively. The MN-I group clearly shows the greatest overall percentage of damaged cells, and the highest increased proportion of medium to highly damaged cells at all times (Fig. 5).

Repair Capacity (RC)

RC increased proportionally to incubation time in all groups (Table I). RC was very similar in both groups of well-nourished children, but clearly decreased in the MN-I group. At 5 min repair, RC was 28.7% for the WN group, 30.2% for the WN-I group, and only 19.9% for malnourished children, whereas 15 min after exposure RC increase approximately 20% in well-nourished groups (50.3 and 52.0% for WN and WN-I, respectively) and 11.5% in MN-I children (mean 31.4). Sixty minutes after exposure, RC reached 79.7% in WN and to 84.3% in WN-I children, but only 55.2% in malnourished children.

To show that the differences in repair capacity among groups were not determined by the different basal damage values observed, the mean basal DNA migration was subtracted from the mean migration at time 0 in each group. Thus, the corrected mean migration was 43.1 μm for WN children, 59.5 μm for WN-I children, and 66.5 μm for MN-I children. These values show the sensitivity of cells from different groups to hydrogen peroxide–induced damage, and would correspond to estimates at time 0. Comparing these values with those obtained 60 min after exposure, migration length decreased from 43.1 to 8.5 μm in the WN group (that is a fivefold decrease), from 59.5 to 12 μm in the WN-I group (also a fivefold decrease), and from 66.5 to 41.4 μm in the MN-I group (only a 1.6-fold decrease). These indicate that well-nourished children, infected or noninfected, showed similar repair capacity, and that this function is clearly impaired in malnourished children.

The Mann–Whitney test was used to determine the influence of including or excluding the only kwashiorkor patient studied, results of which showed no difference.

Statistical analysis revealed no association between sex, age, weight deficit, weight, height, and type of malnutrition with DNA repair capacity among the children.

H Dispersion Coefficient

The pretreatment (basal) H coefficients were higher in WN-I (mean ± SE: 52.2 ± 1.4) and MN-I children (50.3 ± 1.9) than in WN children (44.1 ± 1.1). Although these values were not significantly different, infected children showed greater DNA migration length heterogeneity.

H coefficient decreased after H_2O_2 exposure, indicating that damage levels differed less among individual cells. Only immediately after exposure H coefficients were significantly different among the three groups, revealing differences in the response of each group to H_2O_2-induced

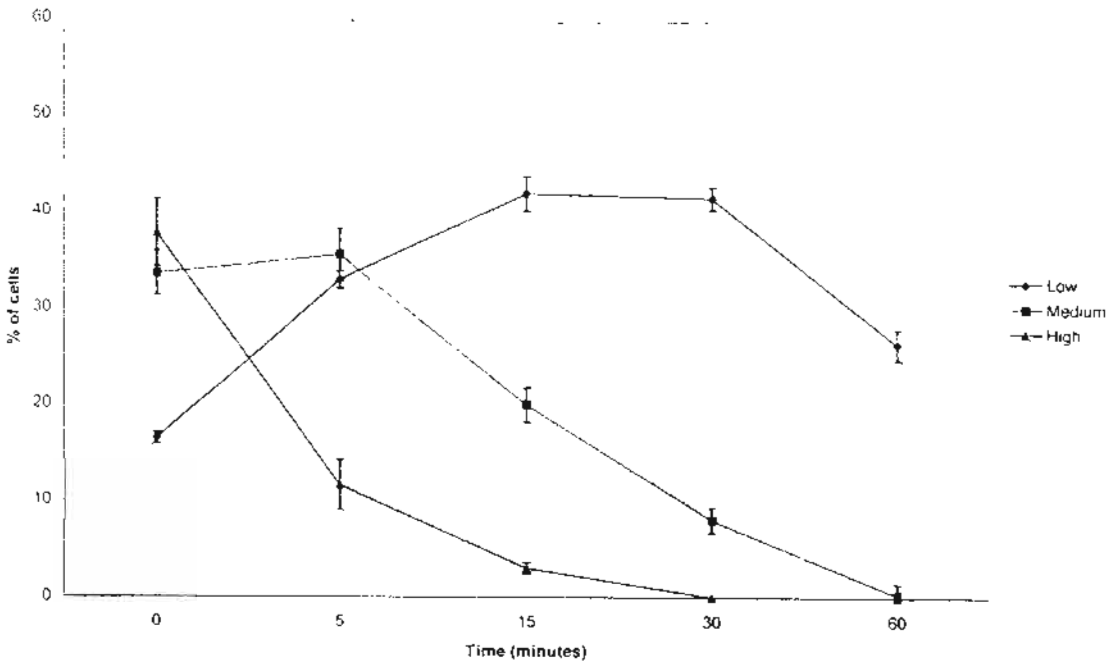


Fig. 4. Percentage of cells with low, medium, and high damage in well-nourished infected (WN-I) children after 0, 5, 15, 30, and 60 min of DNA repair.

damage. At this time (time 0), the H coefficient was significantly lower in malnourished children (9.2 ± 1.0), because a greater proportion of cells showed similar damage levels, which tended to be higher than those observed in both groups of well-nourished children. In WN and WN-I, the H values were 28.0 ± 1.6 and 22.8 ± 1.5, respectively.

The H coefficient increased gradually 5, 15, 30, and 60 min after exposure, and no significant differences were observed among the three study groups. Increased H coefficient values suggest a heterogeneous response of cells in repairing DNA damage. Five minutes after exposure the H coefficient was 34.0 ± 1.8, 22.4 ± 2.0, and 20.1 in WN, WN-I, and MN children, respectively, whereas 60 min after exposure H coefficient estimates were 40.3 ±1.7, 31.6 ± 0.9, and 34.1 ± 0.9, respectively, for WN, WN-I, and MN groups.

DISCUSSION

The basal damage level in both WN and MN children clearly increased with infection. Previous reports demonstrated that certain types of bacterial infections are associated with DNA damage [Rao et al., 1990; D'Souza and Das, 1994], and that these infections are considered as a risk factor for the development of several types of cancer in humans [Canella et al., 1996]. Certain bacterial enzymes can act as DNAases or endonucleases, inducing DNA damage in the cells of infected organisms [Ahuja, 1991]; also free radicals liberated by the lymphoid cells of the infected host, as part of the normal immune response, may increase DNA damage [Halliwell, 1997].

Moreover, basal DNA migration length analysis shows a clear relationship between malnutrition and increased DNA damage. Our results confirm those of previous studies in which the comet assay was used to establish that severe infections and malnutrition are clearly associated with increased DNA damage [Betancourt et al., 1995]. Furthermore, in this study, DNA damage severity was assessed by classifying cells with low, medium, and high damage levels, thus facilitating cell observation and analysis [Schober et al., 1994; Tice, 1995]. This analysis showed that malnourished infected children had higher proportions of highly damaged cells compared to that in WN and WN-I children.

In addition to injury induced by infections in malnourished children, increased DNA damage may be related to decreased concentrations of antioxidant molecules. However, reports on the concentration of certain antioxidant molecules such as glutathione in marasmus children are controversial: although some authors report significantly decreased concentrations [Becker et al., 1995], others found no significant differences compared to well-nourished controls [Golden and Ramdath, 1987]. It has been suggested that local factors such as the proportion of certain amino acids such as cysteine or methionine can modulate the amount of antioxidant molecules in children with marasmus. However, antioxidant concentrations are clearly de-

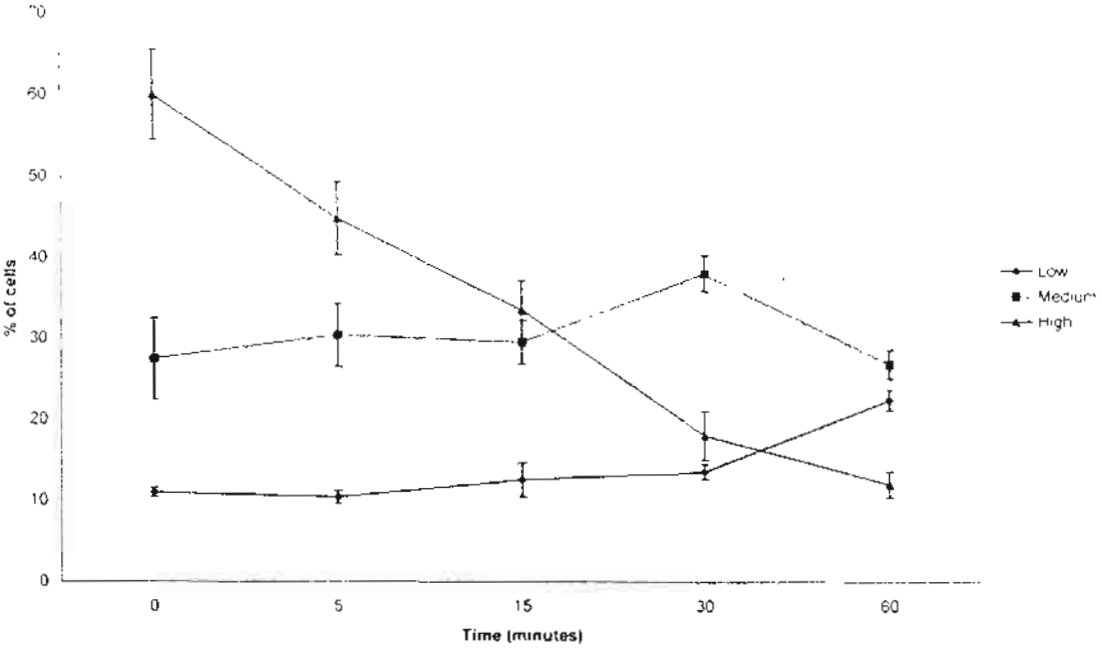


Fig. 5. Percentage of cells with low, medium, and high damage in malnourished infected (MN-I) children after 0, 5, 15, 30, and 60 min of DNA repair.

creased in kwashiorkor children [Becker et al., 1995; Lenhartz et al., 1998] and this effect may help to explain why the only kwashiorkor patient included in this study showed the most severe DNA damage.

Single-cell electrophoresis has proved to be a very sensitive method to assess DNA damage induced by several agents, and to assess individual cell repair kinetics [Rojas et al., 1999]. The analysis of DNA repair kinetics in malnutrition is most relevant, particularly because there are no previous reports

To assess the DNA repair capacity of cells from the different study groups, DNA damage was induced with H_2O_2, a molecule that easily goes through the cell membrane and is transformed in hydroxyl radicals by a nonenzymatic process in the presence of metal ions (Fe^{2+} or Cu^{2+}) occurring in the cytoplasm, known as the Haber–Weiss or Fenton reaction. Hydroxyl radicals can induce single-strand breaks, double-strand breaks, alkali-labile sites, and various species of oxidized purines and pyrimidines [Joenje, 1989; Sankaranarayanan, 1991]. Oxidative-induced DNA damage is subject to cellular repair processes, particularly strand break rejoining and base excision repair, which under normal conditions are performed rapidly [Collins et al., 1995]. The capacity of H_2O_2 to induce DNA strand breaks has been demonstrated by techniques such as alkaline elution, alkaline DNA unwinding, and single-cell gel electrophoresis [Gabelova et al., 1997].

Hydrogen peroxide is generated in vivo as a product of the enzyme superoxide dismutase. The enzyme catalyzes the transformation of superoxide radical: this radical is a product of physiological sources like mitochondrial electron transport chain, or is produced during the oxidation of many molecules in endoplasmic reticulum. In peroxysomes oxidation reactions can directly produce H_2O_2 [Bunker, 1992].

Hydrogen peroxide has been widely used as an investigative tool for induction of DNA damage and to compare the response of different cellular types [Holz et al., 1995], for the study of intra-individual variations with time [Collins et al., 1997], for DNA repair evaluations [Collins et al., 1996; Duthie and Hawdon, 1998], and for the evaluation of antioxidant status [Panayiotidis and Collins, 1997]. In studies performed with human lymphocytes, the hydrogen peroxide concentrations most frequently used to induce DNA damage range from 10 μM [Holz et al., 1995] to 280 μM [Noroozi et al., 1998]. In the present study we used a 10 μM H_2O_2 solution, which induced a high DNA damage level without a higher cell mortality associated.

Previous reports show that DNA repair can be evaluated for long periods (i.e., 10 days), in cultures with folate deficiency, an event that is conducive to increased DNA breakage and repair prevention [Duthie and Hawdon, 1998]. Nevertheless, damage induced by hydrogen peroxide is repaired very rapidly [Gabelova et al., 1997]

In this study, the H coefficient showed that the three study groups responded differently to hydrogen peroxide. Whereas the WN group showed the most heterogeneity

(Fig. 1), exhibiting a high percentage of cells with low damage, in the WN-I group, the percentage of cells with low damage decreased and the percentage of cells with medium and high damage increased slightly. The cells from MN-I children showed a very homogeneous response (low H coefficient) with very high percentages of highly damaged cells. These different responses may be associated with variations in Fe^{2+} concentrations required to form hydroxyl radicals (Fenton's reaction), antioxidative enzymes (such as catalase or glutathione peroxidase), or free-radical scavengers (such as tocopherol), which are found at different levels in several cell types and among lymphocyte subsets [Visvardis et al., 1997].

It has been suggested that cells of malnourished children are more susceptible to environmental damage [Ortiz et al., 1997]. Although statistical analysis carried out in this study does not support an overall greater susceptibility in malnourished lymphocytes to DNA damage induced by peroxide, clearly these children showed the highest proportion of highly damaged cells after H_2O_2 treatment (Fig. 1). This result may imply that a cell fraction may be more susceptible to reach higher levels of DNA damage. Further studies are needed to analyze whether they show greater susceptibility to damage induced by other agents.

Results obtained after the DNA repair periods tested showed that RC was similar in both groups of well-nourished children (Table I). This implies that infection did not interfere with RC in well-nourished children. Moreover, an unexpectedly more effective repair capacity was observed in the WN-I group. This more efficient DNA repair, which was more apparent in WN-I children than in WN uninfected children, may be associated with a normal response to acute infection. In this process, the protein cleavage rate increases so that the infected individual can synthesize proteins necessary for the immune response [Reeds et al., 1994; Manary et al., 1998]. The presence of the pathogen may have increased the availability of amino acids, allowing the cells of well-nourished children to synthesize proteins involved in the DNA repair process. This issue requires further study.

In contrast, RC was clearly decreased in MN-I children, who showed delayed damage repair. Several authors have reported greater DNA damage in malnourished children. Delayed repair could be related to this finding, because damage might remain in the cell for longer periods before it can be completely repaired; this may induce cell physiology alterations probably related to the altered immune response observed in malnourished children. The high damage levels and impaired RC, in addition to other well-known immune system alterations in malnourished children [Chandra, 1991], may lead to increased susceptibility to malignant transformation. It seems that there is a close relationship between nutritional status, immune system function, and the development of different types of cancer [Newberne and Rogers, 1986]. Follow-up studies of children that have suffered from severe malnutrition would be relevant to document this latter possibility.

In WN-I and MN-I children the increased DNA damage observed may be associated with a higher apoptosis rate. Previous reports indicate that some types of infections are related with an increase in the apoptotic cell fraction [McCloskey et al. 1998; Hotchkiss et al., 1999]. Moreover, malnutrition induced experimentally in rats has been related to a higher proportion of spontaneous apoptotic thymocytes [Ortiz et al., 2001]. Apoptosis may contribute to the increased DNA damage observed before hydrogen peroxide treatment, since one of the best-described characteristics of this process is the selective degradation in the internucleosomal DNA linker regions [Sgnoc and Gruber, 1998]. Nevertheless, apoptosis cannot be associated with the damage observed after hydrogen peroxide treatment and/or with DNA repair capacity, considering that the evaluation was done after 60 min, and DNA fragmentation related with apoptosis induction requires longer times to be detected [Wyllie, 1980; Hampton and Orrenius, 1997]. The identification of apoptotic lymphocytes in MN-I and WN-I children is an important finding that requires further work.

In summary, results presented here support the conclusion that severe infections and malnutrition are two factors associated with increased DNA damage. Moreover, lymphocytes from malnourished children seem not to be more susceptible to DNA damage induced by hydrogen peroxide. Additionally, it was observed that severe infections are not related with a decrease in the DNA repair capacity in well-nourished infected children. Finally, malnutrition is clearly associated with a decreased DNA repair capacity of DNA damage induced by hydrogen peroxide in peripheral blood lymphocytes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Patricia Birot, from Gustavo Baz Hospital (Netzahualcoyotl, Estado de México), for her help in collecting blood samples.

REFERENCES

Ahuja YR. 1991. Bacterial infection, restriction endonucleases, genetic damage and cancer. Biol Zentralbl 110:179–187.

Becker K, Leichsenring M, Gana L, Bremer H, Schirmer RH. 1995. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition, results of a study in Nigeria. Free Radic Biol Med 18:257–263.

Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L. 1995. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. Mutat Res 331:65–77.

Bunker VW. 1992. Free radicals, antioxidants and ageing. Med Lab Sci 49:299–312.

Canella KA, Diwan BA, Gorelick PL, Donovan PJ, Sipowicz MA, Kasprzak KS, Weghorst CM, Snyderwine EG, Davis CD, Keefer LK, Kryptopoulos SA, Hecht SS, Wang M, Anderson LM, Rice JM.

1996. Liver tumorigenesis by *Helicobacter hepaticus*: considerations of mechanism. In Vivo 10:285–292.

Chandra RK. 1991. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. Am J Clin Nutr 53:1087–1101.

Collins A, Dusinska M, Gedik C, Stetina R. 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? Environ Health Perspect 104:465–469.

Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. Environ Mol Mutagen 30:139–146.

Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mutat Res 336:69–77.

De Onís M, Monteiro C, Akré J, Clugston G. 1993. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on child growth. Bull World Health Organ 71:703–712.

D Souza D, Das BC. 1994. Genotoxic effects of *Mycobacterium leprae* infection in humans. Mutat Res 305:211–222.

Duthie S, Hawdon A. 1998. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. FASEB J 12:1491–1497.

Gabelova A, Slamenova D, Ruzekova L, Farkasova T, Horvathova E. 1997. Measurement of DNA strand breakage and DNA repair induced with hydrogen peroxide using single cell gel electrophoresis, alkaline DNA unwinding and alkaline elution of DNA. Neoplasma 44:380–388.

Golden MH, Ramdath D. 1987. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. Proc Nutr Soc 46:53–68.

Halliwell B. 1997. Antioxidants and human disease. Nutr Rev 55:S44–S52.

Hampton MB, Orrenius S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett 414:552–556.

Holz O, Jorres R, Kastner A, Magnussen H. 1995. Differences in basal and induced DNA single-strand breaks between human peripheral monocytes and lymphocytes. Mutat Res 332:55–62.

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. 1999. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. Proc Natl Acad Sci USA 96:14541–14546.

Joenje H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. Mutat Res 219:193–208.

Lankinen MH, Vilpo JA. 1997. Repair of γ-irradiation-induced DNA single-strand breaks in human bone marrow cells: analysis of unfractionated and CD34+ cells using single-cell gel electrophoresis. Mutat Res 377:177–185.

Lankinen MH, Vilpo LM, Vilpo JA. 1996. UV- and γ-irradiation-induced DNA single strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. Mutat Res 352:31–38.

Lenhartz H, Ndasi R, Anninos A, Bottcher D, Mayatepek E, Tetanye E, Leichsenring M. 1998. The clinical manifestation of the kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. J Pediatr 132:879–881.

Manary MJ, Broadhead RL, Yarasheski KE. 1998. Whole body protein kinetics in marasmus and kwashiorkor during acute infection. Am J Clin Nutr 67:1205–1209.

McCloskey TW, Bakshi S, Than S, Arman P, Pahwa S. 1998. Immunophenotypic analysis of peripheral blood mononuclear cells undergoing in vitro apoptosis after isolation from human immunodeficiency virus-infected children. Blood 92:4230–4237.

McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, DeMeo MP, Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutat Res 288:47–63.

Mendiola-Cruz MT, Morales-Ramírez P. 1999. Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. Mutat Res 433:45–52.

Murthy PB, Rahiman MA. 1983. Chromosomal abnormalities in severely malnourished Indian children. Hiroshima J Med Sci 32:291–294.

Mutchinick O, Lisker R, Ruiz L, Salamanca F, Armendares S. 1979. Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. Ann Genet 22:129–132.

Newberne PM, Rogers AE. 1986. Nutrition, immunocompetence and neoplasia. In: Scarpelli DG, Migaki G, editors. Nutritional diseases: research directions in comparative pathobiology. New York: A R Liss. p 131–160.

Noroozi M, Angerson WJ, Lean MEJ. 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. Am J Clin Nutr 67:1210–1218.

Olive PL, Banath JP, Durand RE. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay. Radiat Res 122:69–72.

Ortiz R, Campos C, Gomez JL, Espinoza M, Ramos-Morilla M, Betancourt M. 1994. Sister chromatid exchange and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition. Mutat Res 213:33–37.

Ortiz R, Cortés L, Gonzalez C, López L, Pérez P, Cortes E, Betancourt M. 1997. Analysis of mitomicyn C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. Environ Mol Mutagen 30:363–370.

Ortiz R, Cortés L, Gómez JL, González-Márquez H, González C, Cortes E. 2001. Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. Br J Nutr 86:545–548.

Panayiotidis M, Collins AR. 1997. Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. Free Radic Res 27:533–537.

Pelletier D, Frongillo E, Habicht JP. 1993. Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. Am J Public Health 83:1130–1133.

Plappert UG, Stocker B, Fender H, Fliender TM. 1997. Changes in the repair capacity of blood exposure to ionizing radiation. Environ Mol Mutagen 30:153–160.

Ramos-Galván R. 1976. Somatometría pediatrica. Arch Invest Med Mex 6:1–2.

Rao VV, Gupta EV, Thomas IM. 1990. Chromosome damage in untreated tuberculosis patients. Tubercle 71:169–172.

Reeds PJ, Fjeld CR, Jahoor F. 1994. Do the differences between the aminoacid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic stress? J Nutr 124:906–910.

Rojas E, López MC, Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromatogr B Biomed Appl 722:225–254.

Sankaranarayanan K. 1991. Nature of spontaneous and radiation-induced mutations in mammalian in vitro systems and mechanisms of induction of mutations by radiation. Mutat Res 258:75–97.

Schöber C, Gibbs JY, Yin MB, Scolum HK, Rustum YM. 1994. Cellular heterogeneity in DNA damage and growth inhibition induced by ICI D 1694, thymidylate synthase inhibitor, using single cell assays. Biochem Pharmacol 48:997–1002.

Sgonc R, Gruber J. 1998. Apoptosis detection: an overview. Exp Gerontol 33:525–533.

Singh NP, McCoy MT, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184–191.

Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JB, Brant LJ, Schneider EL. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. Mutat Res 237:123–130.

Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. 1994. Modifications of alkaline

microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. Int J Radiat Biol 66:23–28.

Strauss GH. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects. Mutat Res 252:1–15.

Tice RR. 1995. The single cell gel/comet assay, a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt S, editors. Environmental mutagenesis. Oxford: Bios Scientific. p 312–339.

Tice RR, Andrews PW, Singh NP. 1990. The single cell gel assay: sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: Sutherland B, Woodhead A, editors. Methods for detection of DNA damage in human cells. New York: Plenum. p 291–301.

Tice RR, Strauss GHS, Peters WP. 1992. High-dose combination alkylating agents autologous bone marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res 271:101–113.

Visvardis EE, Tassiou AM, Piperakis SM. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H_2O_2 and γ irradiation with the alkaline comet assay. Mutat Res 383:71–80.

Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284:555–556.

Accepted by—
D. Sedwick

Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 22:147–158 (2002)

Susceptibility to DNA Damage Induced by Antibiotics in Lymphocytes From Malnourished Children

C. González,[1*] O. Nájera,[2] E. Cortés,[1] G. Toledo,[3] L. López,[4] M. Betancourt,[1] and R. Ortiz[1]

[1]*Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México*
[2]*Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F., México*
[3]*Hospital Infantil Xochimilco D.D.F., México D.F., México*
[4]*Hospital Infantil Iztapalapa D.D.F. México D.F., México*

Infectious disease and malnutrition in children are public health problems in developing countries. Malnutrition is associated with higher levels of DNA damage, and this increased damage could be due to different factors, including the possibility that cells from malnourished children could be more susceptible to environmental damage. The aim of the present study was to evaluate the susceptibility of lymphocytes from malnourished children to DNA damage induced by antibiotics by using the comet assay. The same group of malnourished infected children were studied before and after a treatment period, and compared to a group of well-nourished infected children. Results showed that before and after drug treatment, tail length migration was two times greater in malnourished than in well-nourished children. The proportion of cells with high damage was also increased in malnourished children. Additionally in well-nourished and malnourished children, a cell subpopulation (non-damaged cells) more resistant to DNA damage induced by antibiotics was observed; this was more prevalent in the well-nourished children. Meanwhile, in malnourished children, a cell population seems to be more susceptible and reaches higher levels of DNA damage. This might help explain the impaired immune response observed in malnourished children. The increased DNA migration and the increased proportion of cells with higher levels of damage seem to indicate that malnourished children are more susceptible to DNA damage induced by drugs. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen. 22:147–158, 2002.* © 2002 Wiley-Liss, Inc

Key words; malnutrition; single cell gel electrophoresis; drug treatment; human lymphocytes

*Correspondence to: Cristina González. Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apdo. Postal 55-535, CP 09340, México D.F., México.
E-mail: mcgt@xanum.uam.mx

© 2002 Wiley-Liss, Inc.
DOI 10.1002/tcm.10007

INTRODUCTION

Infectious disease and malnutrition in children are public health problems in developing countries. Protein-caloric malnutrition is clearly related to a higher mortality of hospitalised children, with death being due mainly to overwhelming infection despite the fact that many of these children receive appropriate antimicrobial therapy (i.e., ampicillin, penicillin, kanamycin, etc.) [1,2].

Studies conducted to assess the possible consequences of severe protein-caloric malnutrition have demonstrated an increase in the frequency of sister chromatid exchanges [3,4], a greater frequency of micronuclei [5], and higher levels of DNA damage evaluated by the comet assay [6] in peripheral blood lymphocytes from malnourished children.

This increased DNA damage observed in cells from malnourished children could be related to the following factors: free radical increase associated with the immune response triggered by both bacterial and parasite infections (frequently associated with malnutrition) [7], toxins liberated by pathogens [8], deficiency of free radical-scavenging molecules [9,10], and/or protein deficiency that may alter DNA duplication or DNA repair process (protein deficiency is a very common event among malnourished children). In addition, it is known that a variety of agents, used for antimicrobial therapy, affect the DNA integrity either in vivo or in vitro and may cause DNA damage [11]. Moreover, it has been proposed that cells from malnourished children would be more susceptible to environmental damage [5] including injury induced by antimicrobial agents.

The comet assay or single cell gel electrophoresis is in widespread use in genotoxicity testing. It detects DNA damage derived from DNA double and single strand breaks, DNA interstrand cross-linking, alkali labile sites, and incompletely repaired excision sites. The comet assay is sensitive and simple, requires a small number of cells, can evaluate DNA damage in non-proliferating cells, and since the DNA migration data are obtained on a cell by cell basis, it be able to measure the intracellular distribution of DNA damage [12].

The aim of the present study was to use this technique to evaluate the susceptibility of lymphocytes from malnourished children to DNA damage after a period of drug treatment.

MATERIAL AND METHODS

Heparinised peripheral blood samples were obtained in the "Hospital Infantil Iztapalapa" and "Hospital Infantil Xochimilco." The study was approved by the Medical Ethics Committee of the General Direction of Medical Services (D.D.F. Mexico).

Subjects

Group 1 (WN): Well-nourished severely infected children, without treatment. This group consisted of six well-nourished severely infected children. Their ages ranged from 7 to 36 months. Five were boys and one was a girl. All had adequate height and weight according to age (deficit < 20%) (Table I).

Group 2 (WN-T): Well-nourished severely infected children, after a period with drug treatment. After a period with drug treatment, a blood sample was obtained from the same children of Group 1. Hospitalisation days at sampling time and drugs administered to each child are shown in Table II.

TABLE I. Characteristics of Well-Nourished Infected Children (WN)

Sample	Age (months)	Sex	Weight (kgs)	Height (cms)	Infection
EGE	7	M	6.5	70	Gastrointestinal respiratory
JPA	16	M	10.0	74	Gastrointestinal respiratory
JBM	18	M	9.9	78	Gastrointestinal, respiratory and urinary
JGC	22	M	10.0	88	Gastrointestinal respiratory
NCH	34	M	13.0	93	Sepsis
KFG	36	F	14.0	95	Respiratory

Group 3 (MN): Malnourished severely infected children, without drug treatment. Included in this group were four girls and two boys. Their ages ranged from 6 to 29 months. All had severe malnutrition: five were marasmus children and one was with mixed malnutrition. All children showed a very high weight/height deficit (more than 40%) (Table III).

Group 4 (MN-T): Malnourished severely infected children, after a period with drug treatment. This group consisted of the same children as Group 3. Hospitalisation days at sampling time and drugs administered to each child are shown in Table IV.

In the four groups, the weight/height deficit was determined according to tables for Mexican children [13]. Children of Groups 1 and 2 had normal weight and height for their age. All children were hospitalised for some type of gastrointestinal, respiratory, or urinary bacterial infections (Tables I and III). Group 1 and Group 3 blood samples were obtained at hospital admission prior to treatment. Group 2 and Group 4 blood samples were obtained after a period of antimicrobial therapy.

Blood sampling and isolation of cells

Prior and after drug treatment, approximately 2 ml of peripheral blood were drawn from each child. Blood was mixed with PBS (1:1, v/v). The sample was carefully placed on Linfograd (Microlab, Mexico), and centrifuged at 300*g* for 30 min. Lymphocytes were collected and washed twice with PBS before electrophoresis.

Alkaline single-cell gel electrophoresis assay

The comet assay was performed as described by Singh et al. [14] with modifications described by Tice et al. [15]. Low melting point agarose and regular agarose (Biorad, Richmond, CA) were prepared at 5% in calcium and magnesium-free phosphate-buffered saline solution (PBS); 110 µl of regular agarose was added to a fully frosted microscope slide. After the agarose layer solidified, 75 µl of low melting

TABLE II. Hospitalization Days at Sampling Time and Drugs Administered in Well-Nourished Infected Children (WN-T)

Sample	Hospitalization days at sampling time	Drugs administered
EGE	7	Sulfa-trimetroprim
JPA	7	Sulfa-trimetroprim
JBM	7	Salbutamol, ambroxol
JGC	7	Amikacin
NCH	7	Cefotaxime, dicloxacillin, metronidazole
KFG	4	Penicillin

TABLE III. Characteristics of Malnourished Infected Children (MN)

Sample	Age (months)	Sex	Weight (kgs)	Height (cms)	W/H deficit (%)	Type of malnutrition	Infection type
IRP	6	M	4.1	61	41	Marasmus	Respiratory
GGG	10	F	4.6	72	48	Marasmus	Gastrointestinal
NCR	10	M	5.5	67	40	Marasmus	Gastrointestinal
JGM	12	F	5.0	66	41	Marasmus	Gastrointestinal
NBS	14	F	3.4	58	55	Mix	Gastrointestinal
LPA	29	F	7.2	ND	40[a]	Marasmus	Respiratory

*W/H, weight/height; ND, not determined.
[a]Only weight deficit.

point agarose containing approximately 10^5 cells were added. Finally, a top layer of low melting agarose (75 μl) was added and the agarose allowed to solidify. Slides were immersed in lysis solution [2.5 M NaCl, 10 mM EDTA and 10 mM Tris, NaOH to pH 10.0, and Triton X-100 with 10% fresh DMSO (v/v)] for at least 1 h. Afterwards, they were immersed in alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA) for 20 min to allow the expression of alkali-labile sites and DNA unwinding. The slides were electrophoresed at 25V and 300 mA for 20 min, washed three times for 5 min with neutralising buffer, and then stained with ethidium bromide (20 μg/ml in distilled water).

Slides were observed at ×400 with an Olympus (Miami, FL) fluorescence microscope equipped with a 515–560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. Fifty cells per sample were analysed (25 cells per slide). DNA migration (tail length) was measured from the trailing edge of the nucleus to the leading edge of the tail, using a video imaging system (Syn-Optics, Sunnyvale, CA), a high-resolution CCD camera and VIDS IV software (Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK). This system allowed measurement of the tail length directly from the computer monitor. All slides were coded and scored blindly. Mean tail lengths were estimated before and after drug treatment in severely infected WN and MN children. The H dispersion coefficient was estimated in order to establish DNA migration length intercellular distribution, where H is the ratio of the sample variance to the sample mean [16].

The severity of DNA damage was measured comparing comet tail lengths with the diameter of the nucleus of undamaged cells observed in the same field [17]. Three damage categories were considered: Low migration: tail length equivalent to or smaller than the diameter of undamaged nuclei; Medium migration: tail measured up to three times the diameter of undamaged nuclei; and High migration: tail was three times longer than the diameter of undamaged nuclei.

TABLE IV. Hospitalization Days at Sampling Time and Drugs Administered in Malnourished Infected Children (MN-T)

Sample	Hospitalization days at sampling time	Drugs administered
IRP	4	Ampicillin, amikacin, cefalexin
GGG	6	Amikacin, metronidazole
NCR	6	Ampicillin, amikacin
JGM	7	Ampicillin, amikacin
NBS	6	Penicillin, amikacin
LPA	6	Cefotaxima, dicloxacillin

Statistical analysis

To evaluate the possible increased susceptibility to DNA damage in lymphocytes from malnourished children, and the effect of malnutrition and drug treatment on the extent of DNA damage, the mean tail length of DNA migration was compared using the non-parametric Wilcoxon's matched pairs rank test. Also, the Wilcoxon test was used to determine whether sex, age, weight, or height showed a correlation with DNA damage observed before and after drug treatment. To determine the effect of malnutrition and drug treatment on the intercellular distribution of migration tail lengths, a similar analysis was conducted using the dispersion coefficient H. The chi-square test was used to compare the proportion of cells with low, medium and high migration. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

RESULTS

DNA damage before drug treatment

In WN children, the average migration length before drug treatment was 16.5 μm, while the average dispersion coefficient was 52.3 (Table V). In MN children, the average length of DNA migration was 35.1 μm and the average dispersion coefficient was 55.1 (Table V). The average migration length showed statistical differences between WN and MN children. The comparison between WN and MN dispersion coefficient values did not show statistical differences.

In WN children before treatment, the proportion of cells without DNA damage was 72%. The proportion of cells with low damage was 6.3%, medium was 15.7%, and high was 6% (Fig. 1). In MN children, before treatment, the proportion of cells lacking damage was 56.6%. Cells with low, medium, and high damage represented 3.3, 16.7, and 23.3% respectively (Fig. 1). Statistical differences were observed between proportions in WN and MN children.

DNA damage after drug treatment

Well-nourished severely infected children and malnourished severely infected children showed an increase in average migration length over that for untreated children.

The average length of DNA migration was 28.8 μm in WN-T after a drug treatment (Table VI). In MN-T, this DNA migration was 62.8 μm (Table VI). DNA mi-

TABLE V. Mean DNA Migration and Dispersion Coefficient in Well-Nourished Infected Children and Malnourished Infected Children at Hospitalization (Before Drug Treatment)*

	Well-nourished children			Malnourished children	
Sample	Mean tail length (μm) ± SE	Dispersion coefficient (H)	Sample	Mean tail length (μm) ± SE	Dispersion coefficient (H)
EGE	14.9 ± 4.3	62.5	IRP	29.2 ± 6.7	76.5
JPA	19.3 ± 4.8	59.4	GGG	19.9 ± 5.1	64.1
JBM	20.6 ± 4.3	46.6	NCR	51.2 ± 7.1	49.1
JGC	13.9 ± 3.1	35.1	JGM	50.2 ± 6.6	43.3
NCH	15.7 ± 4.2	56.4	NBS	23.4 ± 4.8	50.0
KFG	4.7 ± 3.9	53.9	LPA	36.6 ± 5.9	47.3
Mean ± SE	16.5 ± 4.1	52.3 ± 4.1		35.1 ± 5.4	55.1 ± 5.2

*Mean tail length: $P < 0.006$; Dispersion coefficient: $P > 0.05$.

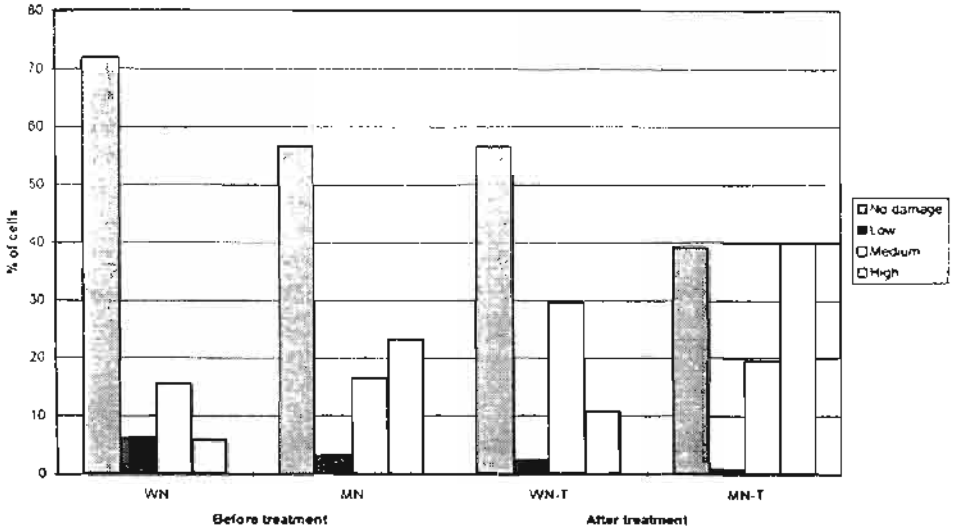


Fig. 1. Frequency of cells with low, medium, and high DNA migration in well-nourished (WN) infected and malnourished (MN) infected children before and after a drug treatment period.

gration length observed in MN-T children was statistically higher than that observed in WN-T children.

The intercellular distribution of DNA damage was 45.6 for WN-T and 59.8 for MN-T (Table VI). Differences between H coefficient values were not statistically significant. In addition, the comparison between coefficient H values observed in WN children before and after treatment, and in MN children before and after treatment, did not show statistically significant differences.

The average length of DNA migration increased in both groups, so tail length in MN-T children increased from 35.1 μm (before treatment) to 62.8 μm (after treatment). In the same way, in WN-T children the tail length increased from 16.5 μm to 28.8 μm. The DNA migration length average increase in MN-T children was 27.7

TABLE VI. Mean DNA Migration and Dispersion Coefficient in Well-Nourished Infected Children and Malnourished Infected Children After a Drug Treatment Period*

	Well-nourished children			Malnourished children	
Sample	Mean tail length (μm) ± SE	Dispersion coefficient (H)	Sample	Mean tail length (μm) ± SE	Dispersion coefficient (H)
EGE	24.1 ± 6.2	79.9	IRP	51.8 ± 9.2	82.4
JPA	41.6 ± 5.4	35.1	GGG	48.9 ± 9.0	83.5
JBM	18.3 ± 3.9	40.8	NCR	79.5 ± 6.9	29.9
JGC	27.5 ± 4.3	33.9	JGM	75.0 ± 7.7	39.2
NCH	34.3 ± 5.8	49.5	NBS	46.6 ± 8.3	74.6
KFG	27.1 ± 4.3	34.1	LPA	74.9 ± 8.6	49.3
Mean ± SE	28.8 ± 4.9	45.6 ± 7.2		62.8 ± 6.2	59.8 ± 9.5

*Mean tail length: $P < 0.003$; Dispersion coefficient: $P > 0.05$; Mean tail length: WN before treatment vs WN after treatment $P < 0.01$; Dispersion coefficient: WN before treatment vs WN after treatment $P > 0.05$; Mean tail length: MN before treatment vs MN after treatment $P < 0.02$; Dispersion coefficient: MN before treatment vs MN after treatment $P > 0.05$.

μm, while in WN-T children this increment was only 12.3 μm and the increment in tail length was two times greater in MN-T children.

After drug treatment, in WN-T group the proportion of cells without damage was 56.7% (Fig. 1). The proportion of cells with low, medium and high migration were 2.7, 29.7, and 11% respectively. In WN children a statistical difference ($P<0.05$) was observed between the proportions of different levels of damaged cells observed before and after drug treatment.

In MN-T children, after drug treatment, cells without damage were 39.3%, and cells with low, medium and high damage were 1, 19.7, and 40% respectively (Fig. 1). Statistical difference ($P<0.001$) was observed between the proportions observed before and after treatment in MN-T children. As well, statistical differences were observed between WN and MN children, before ($P<0.001$) and after ($P<0.001$) drug treatment.

The percentage of damaged cells in WN children before treatment was 28% and after treatment, it was 43.3%. In MN children, the percentage of damaged cells before treatment was 43.4% and after drug treatment, the percentage increased to 60.7%.

In both groups, no correlation was observed between drugs administered, sex, age, weight, or height of children studied, and DNA migration or with the proportion of cells with no damage, and with low, medium, and high damage.

An individual analysis of cells with low, medium, and high damage showed that cells with low damage were higher in WN children, both before and after drug treatment (data not shown). In relation to medium damaged cells, they increased in all WN children after drug treatment (Fig. 2), the same effect was observed in three MN children (Fig. 3); this is specially evident in one child (NCR) that showed a higher increment of cells with medium damage. The other three malnourished children showed after treatment a considerable decrease in medium damaged cells.

Clearly, a higher proportion of cells with high damage was observed in MN children (Fig. 4), in both cases, before and after drug treatment. After treatment, five

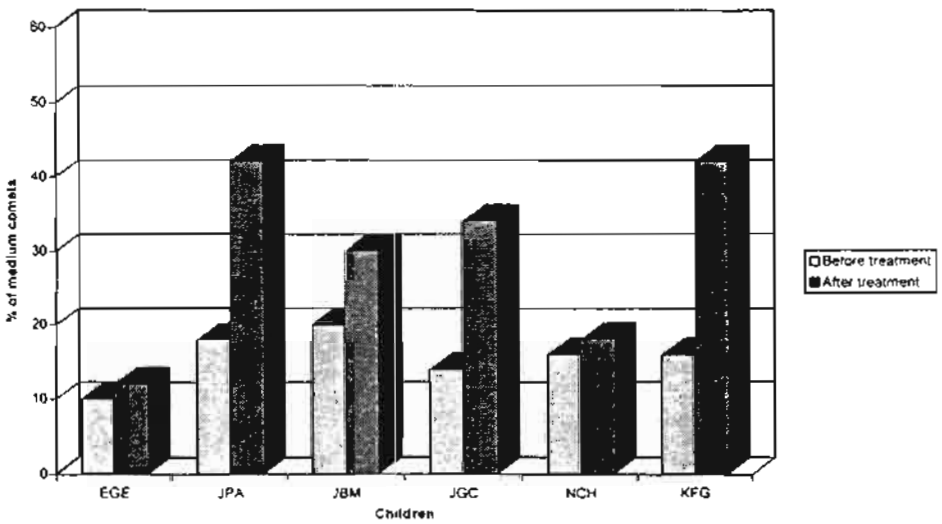


Fig. 2. Percentage of cells with medium DNA migration in a group of well-nourished children before and after a period with drug treatment.

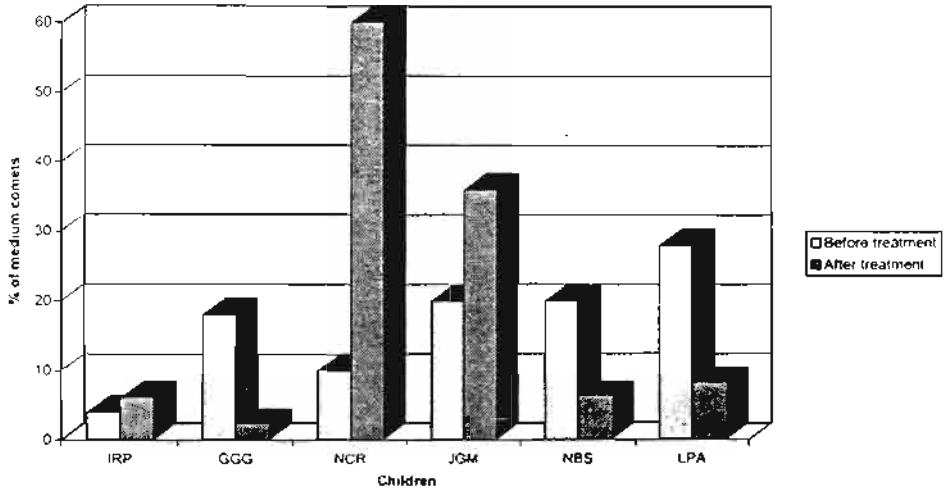


Fig. 3. Percentage of cells with medium DNA migration in malnourished children before and after a period of drug treatment.

MN children showed an increment in these cells, it was particularly evident in three children (GGG, NBS, and LPA). One MN child (NCR) showed a decreased number of cells with high damage (associated with the higher proportion of cells with medium damage). In WN children (Fig. 5), cells with high damage were less evident than that observed in MN children (Figs. 4 and 5); after drug treatment two WN children (JBM and KFG) showed a decrease, while four showed an increase in the proportion of cells highly damaged. After treatment only one WN child (NCH) showed a proportion of high damaged cells greater than 20%, but in MN children, these cells represented in all cases more than 30%.

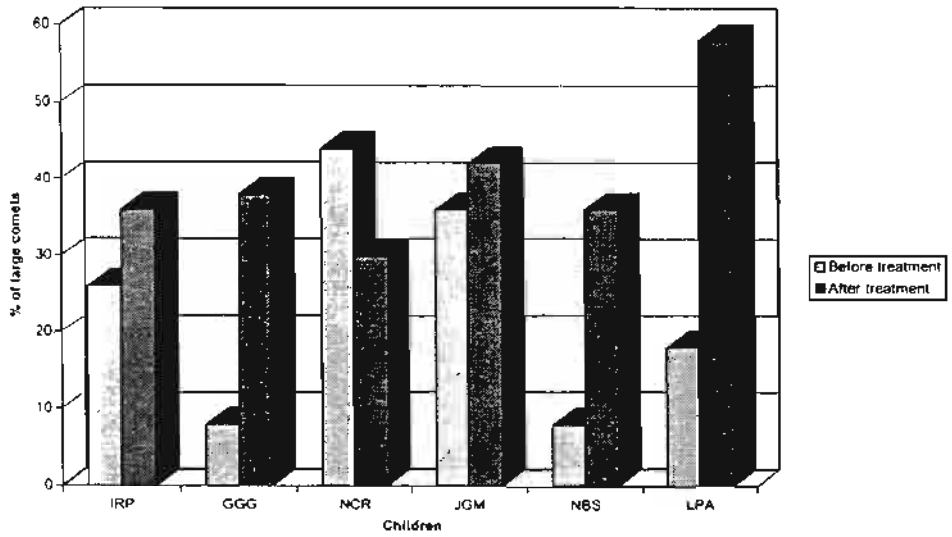


Fig. 4. Percentage of cells with high DNA migration in malnourished children before and after drug treatment.

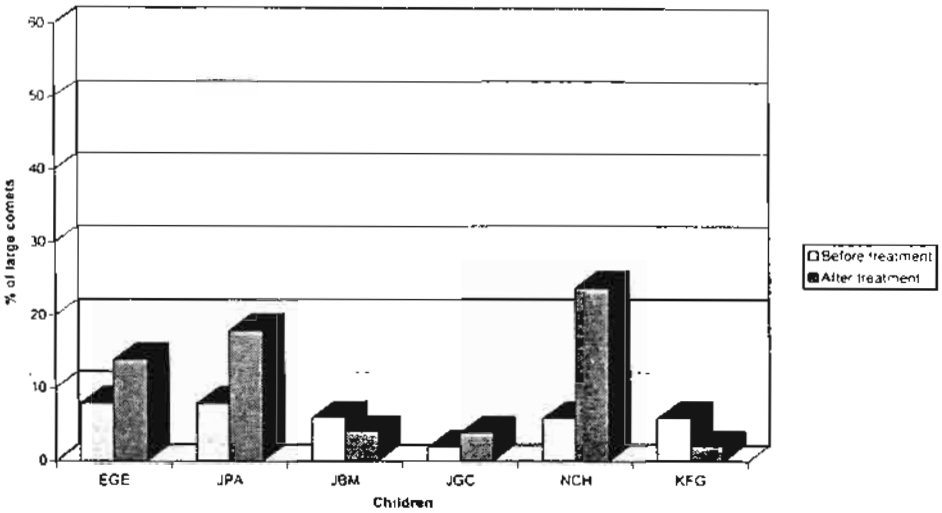


Fig. 5. Percentage of cells with high DNA migration in a group of well-nourished children before and after a period of drug treatment.

DISCUSSION

DNA migration length before drug treatment was two times greater in MN severely infected children (35.1 μm) than in WN severely infected children (16.5 μm). Also, the proportion of cells with medium and high damage before drug treatment was nearly twice as high in MN children (40%) than in WN children (21.7%).

After drug treatment, the average tail length was again twofold greater in MN-T (62.8 μm) than that observed in WN-T children (28.8 μm). In relation to the proportion of cells with medium and high damage, this increase was only 1.5 times in MN-T children. Nevertheless, these children clearly showed a greater (40%) proportion of cells with high damage, in relation to WN-T (11%).

These results show that malnutrition and drug treatment are two factors associated with a significant increase in DNA damage in lymphocytes sampled from malnourished and well-nourished children, both severely infected. In a previous study in well-nourished and malnourished, infected children, the same association was previously observed [6]. In that work, we proposed that greater levels of DNA damage associated with malnutrition could be related to the deficiency of proteins implicated with DNA integrity and/or to a depressed ability of cells from these children to repair DNA damage. At present, we have evidence supporting this last possibility (data not shown).

In the present study, we compared the same group of children before and after a drug treatment to determine if malnourished children had a higher susceptibility to DNA damage induced by drugs. As mentioned in the Introduction, higher levels of DNA damage in malnourished may be related also to other factors, and certainly this higher DNA damage may result from the interaction of several factors.

In all cases dispersion coefficient values did not show statistical differences. This indicates that DNA migration length intercellular distribution was similar between WN and MN, before and after treatment. This means that lymphocytes from WN and MN children presented a variable response to the drug treatment.

In both groups, it was observed that there was a cell subpopulation (non-damaged cells) apparently more resistant to DNA damage induced by drugs. This subpopulation clearly was more prevalent in WN children. In addition, MN children even showed a higher proportion of cells with low, medium, and high damage. After treatment, in WN-T children, the proportion of cells with medium damage showed a larger increase. In MN children the cells with low damage diminished, and cells with medium and high damage increased considerably, particularly with high damage. Only one WN child (NCH) showed an elevated proportion of high damaged cells. These results showed that a cell subpopulation in MN children seems to be more susceptible to higher levels of DNA damage.

The decrease in the proportion of cells with high damage observed in two WN-T children (JBM and KFG) and in one MN-T child (NCR) may indicate that some cells very efficiently repair DNA damage and this tends to decrease. The increase in the proportion of cells with high damage, observed in one WN child (NCH), seems to be related with the administration of metronidazol; it is know that this drug is associated with an increase of DNA strand breaks [18]. In MN children, this relation is not so clear. In general, a higher number of drugs was administered to malnourished children, possibly due to their impaired immune response, since there is no evidence supporting alterations in absorption or elimination levels of drugs in children with protein-calorie malnutrition [1].

Transition from low to medium or high damage may be associated with antioxidative protection in the cells. It is well known that some of the drugs used may produce free radicals [19–21], and consequently the antioxidant defence system could be affected in children with protein-calorie malnutrition [22,23].

Antibiotics induce DNA damage, not only by the production of free radicals, but some interfere with DNA synthesis [21,24]. Others, like aminoglycosides interfere at some level with the normal translation of proteins [25], although it appears that increased DNA damage is not directed simply through a general reduction in protein synthesis [26]. Moreover, it is known that aminoglycosides are polycationic molecules with a strong affinity for DNA nucleotides [27].

In the present study an extensive interindividual variability was observed. It was particularly evident in the MN children group; this observation agrees with previous reports in which a higher variability was observed in these children [6]. Furthermore, as previously mentioned more drugs were administered to malnourished children, this may contribute to the increased variability observed in these children.

The higher levels of DNA damage could be related to an impaired immune response observed in MN children, considering that the greater levels of DNA damage appear to be associated with an impaired cell function. More studies are needed to evaluate this possibility.

CONCLUSIONS

This study shows that before treatment the mean migration lengths and the proportion of lymphocytes with highly damaged DNA were found to be significantly higher in malnourished children. This implies that malnutrition is clearly related to increased DNA damage. After treatment with drugs, migration lengths and the proportion of cells with high DNA damage increase in both groups and differ significantly between the MN and the WN children and these were also greater in MN

children. This show that drugs used for antimicrobial treatment, although necessary may result in undesirable side effects such as increased DNA damage.

The increased migration length and the increased proportion of cells with higher levels of damage, seems to indicate that malnourished children are more susceptible to DNA damage induced by drugs. Additionally, the increased proportion of cells with high damage indicates that MN children had a cell subpopulation more susceptible to DNA damage. This may help to explain the impaired immune response observed in MN children.

REFERENCES

1. Buchanan N. Effect of protein-energy malnutrition on drug metabolism in man. Wld Rev Nutr Diet 1984;43:129–139.
2. Friedland IR. Bacteraemia in severely malnourished children. Ann Trop Paediatr 1992;12:433–440.
3. Murthy PB, Bhaskaram P, Skiranta SG. Sister chromatid exchanges in protein-energy malnutrition. Hum Genet 1983;55:405–406.
4. Ortiz R, Campos C, Gómez JL, Espinoza M, Ramos-Motilla M, Betancourt M. Sister chromatid exchange and cell proliferation in lymphocytes from infected and non-infected children with severe protein calorie malnutrition. Mutation Res 1994;312:33–37.
5. Ortiz R, Cortés L, González C, López L, Pérez P, Cortés E, Betancourt M. Analysis of Mitomicyn C-induced micronuclei in lymphocytes from malnourished infected children. Environm Molec Mutag 1997;30:363–370.
6. Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. Mutation Res 1995;331:65–77.
7. Canella KA, Diwan BA, Gorelick PL, Donovan PJ, Sipowicz MA, Kasprzak KS, Weghorst CM, Snyderwinw EG, Davis CD, Keefer LK, Kryptopoulos SA, Hecht SS, Wang M, Anderson LM, Rice JM. Liver tumorigenesis by *Helicobacter hepaticus*: considerations of mechanisms. In Vivo 1996;10:285–292.
8. Ahuja YR. Bacterial infection, restriction endonucleases, genetic damage and cancer. Biol Zent Bl 1991;110:179–187.
9. Becker K, Leichsenring M, Gana L, Bremer H, Schirmer RH. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: results of a study in Nigeria. Free Radical Biol Med 1995;18:257–263.
10. Lenhartz H, Ndasi R, Anninos A, Böttcher D, Mayatepek E, Tetanye E, Leichsenring M. The clinical manifestation of the kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. J Pediatr 1998;132:879–881.
11. Evans HJ, Vijayalaxmi. Induction of 8-azaguanine resistance and sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to mitomycin C and X-rays in vitro. Nature 1981;292:601–605.
12. Rojas E, López MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromatogr B 1999;722:225–254.
13. Ramos-Galván R. Somatometría pediátrica. Arch Inv Med (Mexico) 1976;6:1–2.
14. Singh NP, McCoy MT, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988;175:184–191.
15. Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: Sutherland, Woodhead A. Methods for detection of DNA damage in human cells. New York: Plenum Press C; 1990. p 291–301.
16. Tice RR, Strauss GHS, Peters WP. High-dose combination alkylating agents autologous bone-marrow support in patients with breast-cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. Mutation Res 1992;271:101–113.
17. Mendiola-Cruz MT, Morales-Ramírez P. Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. Mutation Res 1999;433:45–52.
18. Menéndez D, Rojas E, Herrera LA, López MC, Sordo M, Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. DNA breakage due to metronidazole treatment. Mutat Res 2001;478:153–158.

19. Buschfort C, Witte I. Induction and mechanism of DNA single and double strand breaks by tetracycline/Cu(II) in the absence of light. Carcinogenesis 1994;15:2927–2930.
20. Evans P, Halliwell B. Free radical and hearing. Ann NY Acad Sci 1999;884:19–40.
21. Kovacic P, Beevar LE. Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electrotransfer. Curr Pharm Des 2000;6:143–167
22. Ashour MN, Salem SI, El-Gabdan HM, Ellwan NM, Basu TK. Antioxidant status in children with protein energy malnutrition living in Cairo, Egypt. Eur J Clin Nutr 1999;53:669–673.
23. Tatli MM, Vural H, Koc A, Koseeik M, Atas A. Altered anti-oxidant status and increased lipid peroxidation in marasmic children. Pediatr Int 2000;42:289–292.
24. Cantelli-Forti G, Hrelia P. Potenziale rischio genotossico di farmaci antimicrobici. G Ital Chemioter 1991;38:31–34.
25. McDaniel LD, Schultz RA. Elevation of sister chromatid exchange frequency in transformed human fibroblasts following exposure to widely used aminoglycosides. Env Mol Mutag 1993;21:67–72.
26. Sono A, Sakaguchi K. Inhibition of protein synthesis antagonizes induction of sister-chromatid exchanges by exogenous agents. Mutation Res 1981;80:121–131.
27. Golberg IH, Friedman PA. Antibiotics and nucleic acids. Annu Rev Biochem 1971;40:775–810.