

Importancia de la proporción cobre/zinc: una aproximación al análisis de los efectos de la suplementación *in vitro* sobre el genoma

Importance of the copper/zinc ratio: an approach to the analysis of the effect of *in vitro* copper/zinc supplementation on the genome

 Melisa Mantella¹ |  Rocío Celeste Gambaro¹ |  Analía Seoane¹ |  Gisel Padula^{1,2*}

1) IGEVET. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires. Argentina. **2)** Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.

REVISTA ARGENTINA DE ANTROPOLOGÍA BIOLÓGICA

Volumen 24, Número 1
Julio-Diciembre 2022

Financiamiento: CONICET (PIP No. 0657)
y Universidad Nacional de La Plata
(Proyecto 11/V246).

*Correspondencia a: Gisel Padula.
IGEVET. Facultad de Ciencias
Veterinarias. Universidad Nacional de
La Plata. 118 y 60 s/n. 1900 La Plata.
Argentina.
E-mail: giselpadula@gmail.com

RECIBIDO: 15 Junio 2021

ACEPTADO: 9 Enero 2022

<https://doi.org/10.24215/18536387e052>

e-ISSN 1853-6387

<https://revistas.unlp.edu.ar/raab>

Entidad Editora
Asociación de Antropología Biológica
Argentina

Resumen

El cobre (Cu) y el zinc (Zn) son micronutrientes esenciales que participan en numerosas actividades metabólicas. La proporción Cu/Zn resulta más importante aún que la concentración individual de cada uno de éstos y es uno de los parámetros asociados con la reducción de la homeostasis frente a un evento desestabilizador. Debido a que las deficiencias y los excesos de micronutrientes no se detectan por técnicas antropométricas, es necesario el diseño de modelos experimentales que permitan investigar sus efectos y aporten información para implementar políticas de prevención sanitarias. Por dichos motivos, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la suplementación combinada con Cu y Zn sobre el genoma teniendo en cuenta la proporción entre ambos micronutrientes, en un modelo experimental con sangre periférica cultivada *in vitro*. Se llevó a cabo el ensayo cometa y se determinó el índice de daño (ID). Las células fueron cultivadas durante 5 días y se realizaron 8 tratamientos: 3 combinaciones con sulfato de zinc (SO₄Zn) y de cobre (SO₄Cu) y sus respectivos controles. Para el análisis estadístico se utilizaron los ensayos de ANOVA y el método LSD de Fisher. Se observaron frecuencias de ID significativamente aumentadas a medida que la proporción Cu/Zn se incrementó. Dado que el Zn y el Cu juegan un rol fundamental tanto en el mantenimiento de la estabilidad genómica como en el crecimiento de los niños, el desarrollo de enfermedades y el proceso de

envejecimiento, es fundamental determinar los valores adecuados de ingesta diaria combinada de ambos micronutrientes. Rev Arg Antrop Biol 24 (2), 2022. <https://doi.org/10.24215/18536387e052>

Palabras Clave: micronutrientes; sangre periférica; daño en el ADN

Abstract

Copper (Cu) and zinc (Zn) are essential micronutrients that are involved in numerous metabolic activities. The Cu/Zn ratio is even more important than individual micronutrient concentrations, and is one of the parameters associated with the reduction of homeostasis during a stressful event. Since micronutrient deficiency and excess are not detected by anthropometric techniques, it is necessary to design experimental models to investigate the effects of these micronutrients and provide information for the implementation of health prevention policies. Taking into account the Cu/Zn ratio, the objective of this work was to analyze the effect of combined Cu and Zn supplementation on genomic stability in peripheral blood cultured *in vitro*. Cells were cultured for five days. Eight treatments were implemented: three combinations with zinc sulfate (SO₄Zn), copper sulfate (SO₄Cu), and their respective controls. The comet assay was used to assess DNA damage and the damage index (DI) was determined. ANOVA and Fisher's LSD method were used for statistical analysis. Significantly higher DI frequencies were observed as the Cu/Zn ratio increased. Considering that Cu and Zn play a fundamental role in maintaining genomic stability, and also in child growth, disease development, and aging, we recommend that adequate Cu and Zn daily intakes should be determined. Rev Arg Antrop Biol 24 (2), 2022. <https://doi.org/10.24215/18536387e052>

Keywords: micronutrientes; peripheral blood; DNA damage

Diferentes autores han definido a la alimentación como un fenómeno social complejo en el cual intervienen no sólo aspectos biológicos sino también ecológicos, demográficos, tecnológicos, económicos, sociopolíticos y culturales (Aguirre, 2005 y 2010; Demonte, 2016). La alimentación adecuada es aquella suficiente en términos de cantidad y calidad que responde a las tradiciones culturales de la población y que garantiza una vida psíquica y física, tanto individual como colectiva, libre de angustias, satisfactoria y digna (Demonte, 2016). Una alimentación "aceptable, suficiente y adecuada" resulta restringida para amplios sectores de la población. En Argentina la equidad alimentaria no está garantizada (Aguirre, 2005), lo que compromete no sólo la salud de los sectores de recursos más bajos (Bergel Sanchís *et al.*, 2017) sino que atraviesa de manera transversal a toda la sociedad (Demonte, 2016).

La deficiencia de micronutrientes, definida como desnutrición oculta, se extiende a nivel global aunque presenta un mayor impacto en los países en desarrollo (Carrero *et al.*, 2016).

Este tipo de desnutrición surge como consecuencia de una alimentación inadecuada, homogénea, o deficiente en relación a algún nutriente, lo cual determina que las reservas corporales resulten insuficientes para afrontar los requerimientos del crecimiento o de una infección (Varea *et al.*, 2006). Dada la elevada velocidad de crecimiento durante los

primeros años de vida, la selección de alimentos con escaso valor o calidad nutricional puede afectar la ingesta de micronutrientes críticos y constituir uno de los factores involucrados en el retraso de crecimiento en los niños (Carmuega, 1999).

Los micronutrientes participan en la prevención de enfermedades degenerativas, tales como Alzheimer y envejecimiento prematuro, cáncer y enfermedades cardiovasculares, por el rol que desempeñan en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Ambrosone *et al.*, 1999; Giovannucci *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Selhub *et al.*, 2000; Watkins *et al.*, 2000). Niveles inadecuados de micronutrientes imposibilitan la actividad de enzimas requeridas para la estabilidad genómica al provocar fracturas de doble o simple cadena del ADN y/o estrés oxidativo (Fenech, 2001 y 2005).

El estrés oxidativo celular puede producirse por un exceso de radicales libres y/o por la falta de antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos para contrarrestarlos. Como consecuencia, éste puede dañar componentes celulares tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Jomova y Valko, 2011; Lin *et al.*, 2011; Prá *et al.*, 2012). El daño puede ser permanente (Aksu *et al.*, 2010) y es aceptado como uno de los principales mecanismos subyacentes de ciertas enfermedades crónicas, daños por intoxicación y lesiones tisulares (Fraga y Oteiza, 2002; Toxqui *et al.*, 2010).

Los estudios actuales se centran en el análisis de la suplementación de micronutrientes y su interacción en el fenotipo. El mayor reto en las próximas décadas será definir la ingesta apropiada de micronutrientes combinados (nutriomas) para optimizar el funcionamiento celular y del organismo, favoreciendo la adaptación del individuo. Debido a las numerosas consecuencias producidas por desbalances en los micronutrientes, éstos deben ser una prioridad en las políticas de salud. Para ello es necesario conocer la interacción de las vitaminas y los minerales, así como su biodisponibilidad y su absorción intestinal (Guevara *et al.*, 2017).

El cobre (Cu) y el zinc (Zn) son elementos esenciales en las células de los mamíferos (Suttle, 2010). El Cu participa en la formación de la hemoglobina, el metabolismo del oxígeno, la síntesis de neurotransmisores y de tejido conectivo, y el desarrollo de huesos y tendones, entre otros. Interviene también en reacciones de óxido-reducción provocando la formación de especies reactivas al oxígeno, por lo que aumenta el estrés oxidativo cuando se halla en exceso. Asimismo, el Cu disminuye la viabilidad y aumenta el daño en el ADN (Singh *et al.*, 2006).

Por su parte, el Zn contribuye a la replicación del ADN y la eficacia del sistema inmunológico, es fundamental para el crecimiento, la diferenciación celular, la integridad estructural de proteínas y membranas, y participa en la unión de hormonas a sus receptores. La deficiencia de Zn se asocia con el retraso en el crecimiento y el aumento en la morbilidad de enfermedades infecciosas que afecta más frecuentemente a niños en sus primeros años de vida (Rahn-Chique *et al.*, 2012; Carrero *et al.*, 2016; Maury *et al.*, 2010). En el año 2002 los reportes de salud alimentaria de la OMS advirtieron que, a nivel mundial, el 16% de las infecciones del tracto respiratorio superior, el 18% de la malaria y el 10% de los episodios de diarrea infecciosa se correspondieron con deficiencias de este micronutriente (OMS, 2002). El Zn tiene efectos antioxidantes, ya que induce la síntesis de metalotioneína, la cual disminuye el daño genético (fracturas de doble cadena) provocado por el Cu (Haldsrud y Krøkje, 2009).

Algunas enzimas tales como la citocromo C oxidasa, la tirosinasa, la hidroxifenil piruvato hidrolasa, la dopamina beta hidroxilasa, la lisil oxidasa y la superóxido dismutasa Cu-Zn (CuZn-SOD) incluyen estos minerales como cofactores necesarios para su acción catalítica y su estructura (Gaetke y Chow, 2003). En este sentido, existe evidencia que

indicaría que tanto la deficiencia como el exceso de Cu y Zn podrían inducir citostasis, citotoxicidad y daño en el ADN (Johnson y Thomas, 1999; Kasprzak, 2002; Picco *et al.*, 2004 y 2020; Kambe *et al.*, 2008; Padula *et al.*, 2014 y 2017).

El balance o la proporción Cu/Zn es más importante que la concentración individual de cada uno de estos micronutrientes (Jerez *et al.*, 2021). La concentración plasmática Cu/Zn es uno de los parámetros asociados al mantenimiento y la recuperación de la homeostasis frente a un evento desestabilizador (Osredkar y Sustar, 2011; Malavolta *et al.*, 2015). La homeostasis alterada del Cu y el Zn puede influir en el sistema de defensa antioxidante y, en consecuencia, provocar estrés oxidativo (Antwi-Boasiako *et al.*, 2019). Por lo tanto, la proporción Cu/Zn es un buen indicador de estrés oxidativo (Fedor *et al.*, 2017). Cuanto mayor es la relación Cu/Zn en suero, mayor es el contenido plasmático de peróxidos lipídicos. Asimismo, existe una relación estricta entre la relación Cu/Zn y la carga oxidante sistémica (Mezzetti *et al.*, 1998).

Las deficiencias y los excesos de micronutrientes no se detectan por técnicas antropométricas. Debido a ello es de suma importancia el diseño de modelos experimentales que permitan investigar sus efectos y que aporten información que favorezca el desarrollo de políticas de prevención adecuadas. Estas políticas deben estar orientadas a mejorar el estado nutricional de los individuos, de modo que se reduzcan las consecuencias negativas de las deficiencias de micronutrientes en el genoma y en el crecimiento y el desarrollo de los individuos. Dichas políticas deben enfatizar la educación nutricional abocada a la concientización del problema y la generación de una vigilancia social que traspase los marcos de los programas prediseñados (Padula *et al.*, 2021). En este contexto, el objetivo de este trabajo es analizar el efecto de la suplementación combinada con Cu y Zn sobre el genoma, teniendo en cuenta la proporción entre ambos en un modelo experimental con sangre periférica cultivada *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Los ensayos *in vitro* proveen información rápida acerca de los efectos de un determinado compuesto o agente. En particular, el modelo *in vitro* de cultivo de sangre periférica es muy eficaz para determinar el efecto de los micronutrientes sobre el daño genómico y la citotoxicidad (Kimura *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009; Fenech, 2010). Este modelo es esencial para definir la concentración óptima y el límite superior más seguro de los micronutrientes (Fenech, 2010).

Diseño experimental

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de mujeres entre 20 y 35 años (donantes sanas), luego de la firma del consentimiento informado, ya que las concentraciones fisiológicas coinciden con las de los niños y la extracción resulta más sencilla. Los protocolos *in vitro* no han establecido un número mínimo de donantes, pero considerando que para los trabajos *in vivo* se utiliza un mínimo de 5 donantes se decidió trabajar con un pool génico (teniendo en cuenta grupo y factor sanguíneo) de 10 individuos. La sangre se recogió por punción venosa con jeringa heparinizada y se cultivó en frascos Falcon utilizando como medio base al HAM F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (60UI de Penicilina y 50µg/ml de Estreptomi-

cina) (Bagó Laboratorio, Buenos Aires, Argentina) para evitar el crecimiento bacteriano. La estimulación de los linfocitos se logró con 100µg/ml de fitohemaglutinina (Gibco Thermo Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina). Las muestras se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 5 días (Fenech, 2010 y 2014). Para lograr la deficiencia de Zn y Cu el medio HAMF12 (HF12) fue quelado (HF12Q). Para tal fin, se utilizó Chelex-100 (95577 Sigma) al 10%, según el procedimiento descrito por Sharif *et al.* (2011; 2012), con algunas modificaciones. Los cultivos se suplementaron desde el inicio con sulfato de zinc (SO₄Zn) y sulfato de cobre (SO₄Cu). De este modo, se establecieron 8 puntos experimentales:

- 1) Control negativo (CN): cultivo estándar (HF12)
- 2) Suplementación con zinc (Zn): HF12Q + 180µg/dl SO₄Zn
- 3) Suplementación con cobre (Cu): HF12Q + 165µg/dl SO₄Cu
- 4) CuZn1: HF12Q + 78µg/dl SO₄Cu + 180µg/dl SO₄Zn
- 5) CuZn2: HF12Q + 165µg/dl SO₄Cu + 180µg/dl SO₄Zn
- 6) CuZn3: HF12Q + 250µg/dl SO₄Cu + 180µg/dl SO₄Zn
- 7) Control positivo (CP): bleomicina 1µg/ml
- 8) Control deficiente (CD): cultivo deficiente (HF12Q)

La concentración de Zn fue establecida en base a los resultados obtenidos en trabajos previos y se corresponde con el valor medio del rango fisiológico normal establecido para niños (Padula *et al.*, 2014; 2017). Para el Cu se tomaron 3 puntos del rango fisiológico normal (Feliu *et al.*, 2005). Las mediciones sobre la concentración exacta de los micronutrientes se realizaron en la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP).

Ensayo de electroforesis en gel de célula única (ensayo cometa)

El ensayo cometa permite visualizar los fenómenos de daño en el ADN a nivel individual. Este ensayo consiste en someter a electroforesis a una muestra de células previamente embebida en agarosa, colocada sobre un portaobjetos y lisada en una solución conteniendo detergente. La electroforesis produce la migración del ADN nuclear de cada célula a lo largo del campo eléctrico, en forma proporcional a la cantidad de daño presente. El ensayo se realizó en condiciones alcalinas, de acuerdo al método de Singh *et al.* (1988). Brevemente, las células se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión (0,5%) y se depositaron en portaobjetos previamente cubiertos con 150 ml de agarosa de punto de fusión normal 0,5%. Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis a pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100) durante 24 h. A continuación, se procedió a un tratamiento alcalino (300mM NaOH, 1mM Na₂EDTA) por 20 min antes de la electroforesis. Esta se realizó a 4°C, 20V y 250mA durante 20 min. Una vez finalizada la electroforesis, los portaobjetos se lavaron con una solución de neutralización y las células se colorearon con SYBR Green. Se realizó el análisis cualitativo de 200 células por punto experimental utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX40, equipado con filtros de excitación de 515-560 nm. La asignación de niveles o grados de daño fue realizada según la extensión de la cola del cometa a partir de la medición visual.

Cada una de las 200 células analizadas por punto experimental fueron clasificadas en 5 categorías: grado 0 (G0) células sin daño en el ADN, cola no visible; grado 1 (G1) células con daño leve en el ADN, pocos fragmentos en la cola; grado 2 (G2) células con daño intermedio, varios fragmentos en la cola del cometa; grado 3 (G3) células con daño severo, muchos fragmentos en la cola del cometa; grado 4 (G4) células con daño grave, casi la totalidad del ADN se encuentra formando su cola (Olive, 1999; Collins, 2004). A partir de

esta clasificación se estableció para cada uno de los preparados un índice de daño genético (ID), según la siguiente fórmula (Collins, 2004).

$$ID = \frac{(1 \times G1 + 2 \times G2 + 3 \times G3 + 4 \times G4) \times 100}{\text{Total de células analizadas}}$$

De este modo, el puntaje total obtenido para cada preparado podría oscilar entre 0 "unidades arbitrarias", cuando todas las células analizadas se encuentran sin daño (G0); y 400 "unidades arbitrarias", cuando todas las células analizadas tienen el mayor de los daños (G4).

Análisis estadístico

Se realizaron 3 repeticiones y se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Debido a que el ID siguió una distribución normal, determinado a partir del coeficiente de curtosis tipificada (-0,919685), se utilizó la prueba de ANOVA simple. Posteriormente se realizó un contraste de múltiples rangos a través del método LSD de Fisher. Estos cálculos se llevaron a cabo utilizando el programa Statgraphics® 5.1 (Manugistics Inc., Rockville, MD) considerando un $P < 0,05$.

RESULTADOS

En la [Tabla 1](#) se observan las concentraciones de SO_4Cu y SO_4Zn junto con las proporciones Cu/Zn para las tres combinaciones establecidas.

En la [Tabla 2](#) y la [Figura 1](#) se presentan los resultados correspondientes al análisis del ensayo cometa. Se detallan los promedios del ID y las desviaciones estándar, producto

TABLA 1. Concentraciones de SO_4Cu y SO_4Zn y proporción Cu/Zn para las tres combinaciones

Combinación	Concentración SO_4Cu	Concentración SO_4Zn	Proporción Cu/Zn
CuZn1	78µg/dl	180µg/dl	0,43
CuZn2	165µg/dl	180µg/dl	0,92
CuZn3	250µg/dl	180µg/dl	1,39

TABLA 2. Promedio del índice de daño (ID) y desvío estándar para cada punto experimental. Grupos homogéneos (método LSD de Fisher)

Tratamiento	ID (desvío estándar)	Grupos homogéneos
CN	2,42 (0,62)	a
Zn	4,17 (1,62)	a
Cu	8,08 (3,99)	a, b
CuZn1	4,95 (3,12)	a
CuZn2	13,92 (2,26)	b, c
CuZn3	19,94 (4,1)	c, d
CP	23,08 (7,14)	d
CD	26,25 (6,94)	d

Grupos homogéneos: a- CN, Zn, CuZn1 y Cu; b- Cu y CuZn2; c- CuZn2 y CuZn3; d- CuZn3, CP y CD



FIGURA 1. Promedio del índice de daño (ID) y desvío estándar para cada punto experimental. Se observaron frecuencias significativamente aumentadas a medida que la proporción Cu/Zn se incrementó (coeficiente-F: 13,83; $P < 0,001$). CN: control negativo; CP: control positivo y CD: control deficiente.

de la suplementación combinada de SO_4Cu y SO_4Zn . Los resultados obtenidos mediante esta técnica mostraron frecuencias de ID significativamente aumentadas a medida que la proporción Cu/Zn se incrementó (coeficiente-F: 13,83; $p < 0,001$).

A través del método LSD de Fisher quedaron conformados 4 grupos homogéneos: a) CN, Zn, CuZn1 y Cu; b) Cu y CuZn2; c) CuZn2 y CuZn3; d) CuZn3, CP y CD. En este sentido, se observó que la combinación con la proporción más baja de Cu/Zn (CuZn1) presentó valores de ID similares a los de CN, Cu y Zn; y significativamente inferiores a los observados para las combinaciones CuZn2 y CuZn3. De esta manera, las combinaciones con las mayores proporciones Cu/Zn (CuZn2 y CuZn3) mostraron valores de ID significativamente aumentados respecto de CN, Zn, Cu y CuZn1. Es de remarcar que la combinación 3 (CuZn3) presentó valores de ID semejantes a los observados para CP y CD.

DISCUSIÓN

El concepto de seguridad alimentaria, definido como el derecho de todas las personas en todo momento al acceso físico y económico a alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades nutricionales y sus preferencias a fin de llevar una vida sana, supone el reconocimiento de la causalidad estructural del problema del acceso y la necesidad de soluciones intersectoriales (Demonte, 2016). En este contexto, el objetivo del presente trabajo es analizar el efecto de la suplementación combinada de Cu y Zn, micronutrientes importantes para el crecimiento y desarrollo de los niños, sobre el genoma. El estudio evalúa la proporción entre ambos micronutrientes y sus efectos en el daño génico, a través un modelo experimental con sangre periférica cultivada *in vitro*. Los resultados obtenidos pueden ser utilizados para informar políticas de prevención adecuadas. El aumento de las enfermedades y los problemas sociales ligados a la alimentación muestra la importancia de trabajar en la prevención y promoción de la salud, haciendo hincapié en los aspectos educativos y comunicacionales orientados a toda la población (Borrás y García, 2013).

En esta investigación se observó un aumento del daño citomolecular con el incremento de la proporción Cu/Zn utilizando concentraciones correspondientes a los rangos fisiológicos normales establecidos para niños. De esta manera, las combinaciones CuZn2 y CuZn3 (proporción 0,92 y 1,39, respectivamente) presentaron un aumento significativo

del ID en relación a la combinación con la proporción más baja ($Cu/Zn=0,43$). Nuestro trabajo previo (Picco *et al.*, 2020), realizado en células del cúmulus de ganado bovino, también halló un aumento tanto del efecto genotóxico como de la muerte celular programada (apoptosis) con una proporción $Cu/Zn >0,5$ (Picco *et al.*, 2020). En pacientes con fibrosis quística se encontró que una proporción $Cu/Zn >1,00$ señalaba un riesgo de deficiencia de Zn y generaba una alta respuesta inflamatoria (Escobedo-Monge *et al.*, 2020).

Existe evidencia de que el Cu y el Zn tienen propiedades prooxidantes y antioxidantes, respectivamente, por lo que se puede esperar que su desequilibrio condicione el estado de estrés oxidativo (Mezzetti *et al.*, 1998). El daño provocado por el Cu sobre el ADN, el estrés oxidativo y la disminución de la viabilidad puede ser permanente y es posible que se relacione con los mecanismos subyacentes de ciertas enfermedades crónicas, daños por intoxicación y lesiones tisulares (Fraga y Oteiza, 2002; Toxqui *et al.*, 2010). El Zn puede disminuir el daño genético provocado por el Cu en diversos tipos celulares (hepatocitos, células intestinales y células mononucleares de sangre periférica), ya que a mayores niveles de Zn aumenta la concentración de glutatión y metalotioneína. Esta última juega un papel importante en la quelación del Cu dentro de las células y podría ser una de las razones del efecto citoprotector del Zn contra la toxicidad del Cu (Singh *et al.*, 2006).

La relación Cu/Zn ha sido poco estudiada en las enfermedades aun cuando ésta se modifica más drásticamente que las concentraciones individuales de estos micronutrientes (Jerez *et al.*, 2021). Sin embargo, se ha comprobado que la elevada proporción Cu/Zn puede ser un biomarcador del estrés oxidativo en células falciformes y de las complicaciones asociadas a esta patología (Antwi-Boasiako *et al.*, 2019). El desbalance de metales es determinante en la producción de estrés oxidativo, por consiguiente, se ha observado un aumento de daño en el tubo renal en poblaciones expuestas crónicamente al cadmio y con proporciones Cu/Zn muy bajas o muy altas (Eom *et al.*, 2020). En un estudio llevado a cabo en niños y adolescentes con miopía se constató que la proporción Cu/Zn resultó significativamente aumentada (Fedor *et al.*, 2017). Lo mismo en pacientes con hemodiálisis, donde se observó una proporción Cu/Zn alta junto con altos niveles de estrés oxidativo y citoquinas pro-inflamatorias, en comparación con individuos sanos. En este caso, la suplementación con Zn mejoró las proporciones plasmáticas de Cu/Zn y redujo el estrés oxidativo, el estado inflamatorio y mantuvo la función inmunológica en dichos pacientes (Guoy Wang, 2013). Asimismo, se constató que la proporción Cu/Zn influyó en el funcionamiento cognitivo durante la vida temprana (Böckerman *et al.*, 2016).

De este modo, se observa la importancia del balance Cu/Zn, ya que niveles adecuados permiten prevenir el daño oxidativo, las fracturas de doble o simple cadena de ADN y los efectos fenotípicos que resultan de una ingesta inadecuada, tal como el desarrollo de enfermedades degenerativas. Cualquier desbalance podría provocar la alteración de varios sistemas orgánicos (Osredkar y Sustar, 2011). En esta investigación, cabe destacar que las concentraciones utilizadas fueron establecidas dentro del rango fisiológico normal para niños (Feliu *et al.*, 2005). Con lo cual, se torna importante la revisión de dicho rango teniendo en cuenta la interacción entre ambos micronutrientes y su impacto en el genoma.

CONCLUSIONES

El Zn y el Cu juegan un rol fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica, el crecimiento de los niños, el desarrollo de enfermedades y el proceso de envejecimiento. El mayor desafío será establecer la ingesta adecuada de micronutrientes a través de mejores dietas, fortificación de alimentos y/o suplementación farmacológica, con el propósito de op-

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración técnica del Sr. César Bianchi y la Lic. Adriana Di Maggio.

timizar el funcionamiento celular y del organismo, favoreciendo la adaptación del individuo y de las poblaciones humanas. En este sentido, la adición de vitaminas y minerales a los alimentos comunes puede ser una excelente estrategia para corregir las deficiencias en grandes sectores de la población, pues no se requiere la modificación de la dieta habitual. Esto se vuelve especialmente importante en la infancia, ya que los requerimientos nutricionales únicos de los niños los hacen altamente susceptibles a una ingesta inadecuada. Definir la ingesta adecuada de nutrientes de manera combinada (nutriomas), teniendo en consideración su proporción y la posible interacción entre ellos, será el principal camino para minimizar el daño en el ADN, mejorando la salud y prolongando la esperanza de vida.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, P. (2005). Contribución para el diseño de una política alimentaria. Centro interdisciplinario para el estudio de las políticas públicas (CIEPP).
- Aguirre, P. (2010). La comida en los tiempos del ajuste. En S. Torrado (dir.), *El costo social del ajuste (Argentina 1976-2002)*. Tomo II (pp. 51-102). Buenos Aires: Edhasa.
- Aksu, B Y, Hasbal, C, Himmetoglu, S, Dincer, Y, Koc, E E, Hatipoglu, S, y Akcay, T (2010). Leukocyte DNA damage in children with iron deficiency anemia: effect of iron supplementation. *European Journal of Pediatrics*, 169(8), 951-956. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1147-1>
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Thompson, P. A., Bowman, E., Vena, J. E., Marshall, J. R., y Shields, P. G. (1999). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer research*, 59(3), 602-606.
- Antwi-Boasiako, C., Dankwah, G. B., Aryee, R., Hayfron-Benjamin, C., Doku, A., N'guessan, B. B., y Campbell, A. D. (2019). Serum iron levels and copper-to-zinc ratio in sickle cell disease. *Medicina*, 55(5), 180. <https://doi.org/10.3390/medicina55050180>
- Bergel Sanchís, M. L., Cesani, M. F. y Oyhenart, E.E. (2017). Malnutrición infantil e inseguridad alimentaria como expresión de las condiciones socio-económicas familiares en Villaguay, Argentina (2010-2012). Un enfoque biocultural. *Población y Salud en Mesoamérica*, 14(2), 60-85. <https://doi.org/10.15517/psm.v14i2.27305>
- Böckerman, P., Bryson, A., Viinikainen, J., Viikari, J., Lehtimäki, T., Vuori, E., y Pehkonen, J. (2016). The serum copper/zinc ratio in childhood and educational attainment: a population-based study. *Journal of Public Health*, 38(4), 696-703. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdv187>
- Borrás, G. y García, J. (2013). Políticas alimentarias en Argentina, derechos y ciudadanía. *Revista Interdisciplinaria de Estudios Agrarios*, 39, 111-136.
- Carmuega, E. (1999). La calidad de la dieta de los dos primeros años de vida. En: A. O'Donnell y E. Carmuega. *Hoy y Mañana. Salud y calidad de vida de la Niñez Argentina*. Buenos Aires: CESNI.
- Carrero, C., Leal, J., Mavo, L., Parody, A., Granadillo, V., y Fernández, D. (2016). Retinol y zinc séricos en escolares sometidos a suplementación nutricional de la Escuela Bolivariana "Catatumbo", Maracaibo, Estado Zulia. *Revista Científica General José María Córdova*, 14(18), 324-332. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476255360015>
- Collins, A. (2004). The comet assay for DNA damage repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol*, 26(3), 249-261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Demonte, F. C. (2016) Un análisis de las políticas sociales alimentarias en la Argentina reciente (2001-2008). *Población & Sociedad*, 23(1), 5-43. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/108057>
- Eom, S. Y., Yim, D. H., Huang, M., Park, C. H., Kim, G. B., Yu, S. D., y Kim, H. (2020). Copper-zinc imbalance induces kidney tubule damage and oxidative stress in a population exposed to chronic environmental cadmium. *International archives of occupational and environmental health*, 93(3), 337-344. <https://doi.org/10.1007/s00420-019-01490-9>

- Escobedo-Monge, M. F., Barrado, E., Alonso Vicente, C., Escobedo-Monge, M. A., Torres-Hinojal, M.C., Marugán-Miguelsanz, J. M., y Redondo del Río, M. P. (2020). Copper and Copper/Zinc Ratio in a Series of Cystic Fibrosis Patients. *Nutrients*, 12(11), 3344. <https://doi.org/10.3390/nu12113344>
- Fedor, M., Socha, K., Urban, B., Soroczyńska, J., Matyskiela, M., Borawska, M. H., y Bakunowicz-Łazarczyk, A. (2017). Serum concentration of zinc, copper, selenium, manganese, and Cu/Zn ratio in children and adolescents with myopia. *Biological trace element research*, 176(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0805-1>
- Feliu, M. S., Piñeiro, A., López, C., y Slobodianik, N. H. (2005). Valores de referencia de cobre, zinc y selenio en niños. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(4), 459-462. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53539407>
- Fenech, M. (2001). Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 51-54. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00168-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00168-3)
- Fenech, M. (2005). The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*, 20(4), 255-269. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei040>
- Fenech, M. (2010). Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *The American journal of clinical nutrition*, 91(5), 1438S-1454S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674D>
- Fenech, M. (2014). Nutriomes and personalised nutrition for DNA damage prevention, telomere integrity maintenance and cancer growth control. *Advances in nutrition and cancer*, 427-441. https://doi:10.1007/978-3-642-38007-5_24
- Fraga, C G, y Oteiza, P I (2002). Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 180(1), 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00379-7)
- Gaetke, L. M., y Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)
- Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Fuchs, C., Rosner, B. A., y Willett, W. C. (1998). Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Annals of internal medicine*, 129(7), 517-524. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-129-7-199810010-00002>
- Guevara, D. A., Reyes, S., López, M., Flores, N., Aguirre, S., Muñoz, E. B., Fornasini, M. y Baldeón, M. E. (2017). Impact of milk based micronutrient supplementation in school children in Quito-Ecuador. *Nutrición Hospitalaria*, 34(6), 1305-1313. <https://doi.org/10.20960/nh.1353>
- Guo, C. H., y Wang, C. L. (2013). Effects of zinc supplementation on plasma copper/zinc ratios, oxidative stress, and immunological status in hemodialysis patients. *International journal of medical sciences*, 10(1), 79-89. <https://doi.org/10.7150/ijms.5291>
- Haldsrud, R., y Krøkje, A. (2009). Induction of DNA double-strand breaks in the H4IIE cell line exposed to environmentally relevant concentrations of copper, cadmium, and zinc, singly and in combinations. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 72(3-4), 155-163. <https://doi.org/10.1080/15287390802538964>
- Jerez M., Carreño M., Castro A., Marino Alarcón Corredor O., Rondon C., García Fernandez M.Y. y Di Bernardo Navas M.L. (2021). Importancia de la relación cobre-zinc como indicador bioquímico de dismenorrea primaria. *Red Científica Latinoamericana*. https://www.siiisalud.com/acise_viaje/ensiicas-profundo.php?id=123840
- Johnson, W. T., y Thomas, A. C. (1999). Copper Deprivation Potentiates Oxidative Stress in HL-60 Cell Mitochondria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221(2), 147-152. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1373.1999.d01-68.x>
- Jomova, K, y Valko, M (2011). Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Current Pharmaceutical Design*. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2011/00000017/00000031/art00010>

- Kambe, T., Weaver, B. P., y Andrews, G. K. (2008). The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis*, 46(4), 214-228. <https://doi.org/10.1002/dvg.20382>
- Kasprzak, K. (2002) Oxidative DNA damage in metal-induced carcinogenesis. In: Chang LW, editor. *Toxicology of Metals*. CRC Press Inc, Boca Raton FL, pp. 299-320. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00809-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00809-2)
- Kimura, M., Umegaki, K., Higuchi, M., Thomas, P., y Fenech, M. (2004). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *The Journal of nutrition*, 134(1), 48-56. <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.48>
- Lin, H, Li, L, Jia, X, Ward, DM, y Kaplan, J (2011). Genetic and Biochemical Analysis of High Iron Toxicity in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3851-3862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190959>
- Malavolta M., Piacenza F., Basso A., Giacconi R., Costarelli L., y Mocchegiani, E. (2015). Serum copper to zinc ratio: Relationship with aging and health status. *Mechanisms of Ageing and Development*, 151, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.01.004>
- Maury Sintjago, E., Mattei, A., Perozo, K., Bravo, A., Martínez, E., y Vizcarra, M. (2010). Niveles Plasmáticos de Hierro, Cobre y Zinc en escolares Barí. *Pediatría (Asunción)*, 37(2), 112-117. <https://www.revistaspp.org/index.php/pediatria/article/view/204>
- Mezzetti, A., Pierdomenico, S. D., Costantini, F., Romano, F., De Cesare, D., Cuccurullo, F., y Fellin, R. (1998). Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(6), 676-681. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00109-9)
- Morris, M. C., Beckett, L. A., Scherr, P. A., Hebert, L., Bennett, D. A., Field, T. S., y Evans, D. A. (1998). Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 12(3), 121-126. <https://doi.org/10.1097/00002093-199809000-00001>
- Olive, P. (1999) DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol*, 75, 395. <https://doi.org/10.1080/095530099140311>
- OMS (2002). The world health report 2002. Reducing risks, promoting healthy life. Ginebra, Suiza. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42510/WHR_2002.pdf
- Osredkar, J., y Sustar, N. (2011). Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clin Toxicol* 5, 3(2161), 0495. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.S3-001>
- Padula, G., Ponzinibbio, M. V., y Seoane, A. I. (2014). Suplementación de cultivos de sangre periférica con sulfato de zinc: inestabilidad genómica asociada a su deficiencia y exceso. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 25(2), 41-52.
- Padula, G., Ponzinibbio, M. V., Gambaro, R. C., y Seoane, A. I. (2017). Genomic instability related to zinc deficiency and excess in an *in vitro* model: is the upper estimate of the physiological requirements recommended for children safe? *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 53(7), 586-592. <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-017-0146-1>
- Padula, G., Matella M., Gambaro, R. y Seoane A. I. (2021). Importancia de los micronutrientes en el crecimiento y desarrollo de la población infantil. *RUNA*, 42(2), 83-97.
- Picco S., Padula G., Anchordoquy J.M., Anchordoquy J.P., Furnus C., y Seoane, A (2020). Consequences of copper and zinc co-supplementation on DNA integrity and apoptosis of bovine cumulus cells during oocyte *in vitro* maturation. *Animal Science Papers and Reports*, 38(2), 145-153.
- Picco, S. J., Abba, M. C., Mattioli, G. A., Fazio, L. E., Rosa, D., De Luca, J. C., y Dulout, F. N. (2004). Association between copper deficiency and DNA damage in cattle. *Mutagenesis*, 19(6), 453-456. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh056>
- Prá, D, Franke, S I R, Henriques, J A P, y Fenech, M (2012). Iron and genome stability: An update. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.02.001>

- Rahn-Chique, K., Carrión, N., y Murillo, M. (2012). Determinación de cobre, magnesio y zinc en leucocitos mononucleares mediante espectrometría de absorción atómica con llama. *Investigación clínica*, 53(4), 345-349. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.614s>
- Selhub, J., Bagley, L. C., Miller, J., y Rosenberg, I. H. (2000). B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *The American journal of clinical nutrition*, 71(2), 614S-620S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.614s>
- Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P., Graham, R. D., y Fenech, M. (2011). The effect of zinc sulphate and zinc carnosine on genome stability and cytotoxicity in the WIL2- NS human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 720, 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.12.004>
- Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P., y Fenech, M. (2012). The role of zinc in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.08.009>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Singh, R. P., Kumar, S., Nada, R., y Prasad, R. (2006). Evaluation of copper toxicity in isolated human peripheral blood mononuclear cells and its attenuation by zinc: ex vivo. *Molecular and cellular biochemistry*, 282(1), 13-21. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-1168-2>
- Suttle, N.F. (2010). Mineral Nutrition of Livestock. 4th Edition, CABI, Cambridge. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845934729.0000>
- Toxqui, L., De Piero, A., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez Muniz, F J, y Vaquero, M P (2010). Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutricion Hospitalaria*, 25(3), 350-365.
- Varea, A., Disalvo, L. y González, H. (2006). Repercusión de las deficiencias de micronutrientes en salud pública. *Ludovica Pediátrica*, VII(1), 10-15. <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/3920>
- Watkins, M. L., Erickson, J. D., Thun, M. J., Mulinaire, J., y Heath Jr, C. W. (2000). Multivitamin use and mortality in a large prospective study. *American journal of epidemiology*, 152(2), 149-162. <https://doi.org/10.1093/aje/152.2.149>
- Wu, J., Lyons, G. H., Graham, R. D., y Fenech, M. F. (2009). The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutagenesis*, 24(3), 225-232. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen074>
- Zhang, S., Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Giovannucci, E. L., Rosner, B. A., Colditz, G. A., y Willett, W. C. (1999). A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *Jama*, 281(17), 1632-1637. <https://doi:10.1001/jama.281.17.1632>