



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

*"Efectividad de la administración del
alfa-tocoferol y el ácido ascórbico sobre el
estrés oxidativo y daño al ADN en adultos
mayores sanos del área rural y urbana."*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

RAQUEL RETANA UGALDE

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Para realizar los estudios de DOCTORADO se recibió apoyo de la Dirección General de Personal Académico (DGAPA), UNAM, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 176579, y del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

COMITÉ TUTORAL

DR. MARIO. A.ALTAMIRANO LOZANO
DRA. MA. CRISTINA GONZÁLEZ TORRES

ÍNDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	3
IV. Marco Teórico	
IV.1 Homeostasis, Alostasis y carga alostática	5
IV.2 Envejecimiento	8
IV.3 Estrés oxidativo	11
IV.3.1 Fuentes endógenas	13
IV.3.2 Fuentes Exógenas	16
IV.4 Daño al ADN	18
IV.5 Antioxidantes	21
IV.7 Estrés oxidativo y vitaminas antioxidantes	39
V. Planteamiento del problema	53
VI. Hipótesis	54
VII. Objetivos	55
VIII. Material y Métodos	
VIII.1 Tipo de estudio	56
VIII.2 Población	56
VIII.3 Variables	57
VIII.4 Técnicas	60
VIII.5 Diseño estadístico	69
IX. Resultados	
IX.1 Características Bioquímicas	70
IX.2 Concentraciones de vitamina C	70
IX.3 Concentraciones de vitamina E	70
IX.4 Marcadores de estrés oxidativo	71
IX.5 Daño oxidativo al ADN	72
IX.6 Grado de estrés oxidativo	72
IX.7 Indicadores de carga alostática	73
X. Discusión	89
XI. Conclusiones	98
XII. Perspectivas	100
XIII. Referencias	101
XIV. Anexos	
XIV.1 Consentimiento informado	120
XIV.2 Cédula antropométrica	121
XIV.3 Carga Alostática	122
XIV.4 Valores extremos	123
XIV.5 Artículos	124

I. RESUMEN

Introducción. El estrés oxidativo (EOx) es un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO's), endógenas y exógenas y la acción eficaz del sistema antioxidante, no obstante factores pro-oxidantes pueden favorecer que éste proceso se presente. Asimismo se señala que durante el envejecimiento el EOx se intensifica por incremento de los ERO's y/o deficiencia de los sistemas antioxidantes, lo cual se traduce como daño al ADN y predisposición a enfermedades crónico- degenerativas. Así mismo, se ha demostrado que el lugar de residencia constituye un factor determinante para el EOx, propiciado por las condiciones ambientales y los estilos de vida que lo caracterizan. Al respecto, se ha propuesto que el consumo por periodos prolongados de la combinación del alfa tocoferol y el ácido ascórbico como suplemento antioxidante puede ser de utilidad para prevenir o contrarrestar el EOx y daño oxidativo al ADN vinculado con el lugar de residencia. Sin embargo, los reportes científicos son controversiales y por lo tanto no concluyentes.

Objetivo. Evaluar la efectividad de la administración de α -tocoferol y ácido ascórbico para disminuir la frecuencia y grado de estrés oxidativo así como sus repercusiones sobre el daño al ADN en ancianos con diferente carga alostática, determinada por su lugar de residencia.

Material y Métodos. Previo consentimiento informado se llevó a cabo un estudio cuasi-experimental en una población de 141 adultos mayores, 66 con residencia urbana y 75 con residencia rural, mayores de 60 años, sin distinción de sexo y sanos desde el punto de vista gerontológico. Se conformaron tres grupos de tratamiento en forma aleatoria de 25 personas para cada grupo para el área rural y de 22 para el área urbana. Los tratamientos fueron los siguientes: (i) Tx1, se le administró 400UI de vitamina E y 500mg de vitamina C, (ii) Tx2, se le suplementó con 400UI de vitamina E y 1000mg de vitamina C, y (iii) Tx0 se le administró un placebo con una presentación farmacéutica similar a la de los suplementos vitamínicos.

Se tomaron muestras sanguíneas en tubos al vacío con heparina como anticoagulante y sin anticoagulante, entre 7-9 am con un ayuno de 8 horas, se llevó a cabo la determinación de biometría hemática completa, química sanguínea de 8 elementos, como pruebas de tamizaje clínico. Además se midieron los valores séricos de vitamina E y de vitamina C. El estrés se cuantificó a través de las técnicas de peroxidación lipídica, antioxidantes totales, enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y daño al ADN. Los datos obtenidos se analizaron a través χ^2 , análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) y como prueba Pos Hoc Dunnett, ambas con un 95% de confianza. Para la determinación de riesgos se calculó la razón de momios (RM) con un intervalo de confianza al 95%. Para realizar el cálculo de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS V.10.0.

Resultados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los marcadores de estrés oxidativo y daño al ADN después del tratamiento de vitaminas C y E por 12 meses tanto en los grupos del área rural como urbana. Se observó un efecto similar del tratamiento Tx0 (placebo) en comparación con los Tx1 y Tx2. No se encontró una influencia estadísticamente significativa de la carga alostática vinculada con el lugar de residencia sobre la eficiencia antioxidante para prevenir o contrarrestar el EOx y el daño oxidativo al ADN.

Conclusiones. La administración prolongada de altas dosis de vitaminas C (500 ó 1000 mg) y E (400UI) no son suficientes para prevenir o contrarrestar el estrés oxidativo y daño al ADN en adultos mayores relativo al lugar de residencia. El lugar de residencia no influye de manera significativa en la respuesta de la eficiencia antioxidante en los adultos mayores que recibieron tratamiento combinado de vitamina C y E durante 12 meses. Nuestros hallazgos sugieren que la administración prolongada de vitamina C y E pueden tener un efecto placebo sobre el estrés oxidativo y daño al ADN.

II. ABSTRAC

Background. Oxidative stress (OxS) is a serious imbalance between the reactive oxygen species (ROS) produced as part of metabolic processes and the effective action of the antioxidant system. This factor is linked to a number of pathological conditions such as cardiovascular disease, atherosclerosis, diabetes mellitus, Alzheimer's and Parkinson's disease, rheumatoid arthritis and some cancerous disorders. In such regard, antioxidant vitamins C and E have been reported to protect against OxS and DNA damage and consequently to degenerative diseases associated, however this knowledge is not conclusive.

Aim: To determine the effectiveness of administration of α -tocopherol and ascorbic acid to reduce the frequency and degree of oxidative stress and DNA damage in elderly people with different allostatic load, determined by their place of residence.

Methods: Previous informed consent, a double-blind controlled clinical assay carried out in a sample of 141 older people 66 subjects with residence of urban area and 75 with residence of rural area. They divided into three age-paired random groups with 22 subjects (urbana area) and 25 subjects (rural area) in each group. Group Tx0 received placebo, group Tx1 was administered 500 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol, whereas group Tx2 received 1,000 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol for a 12-month period. The following measurements were performed before and after the 6-month and 12-month treatment period: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); total antioxidant status (TAS); superoxide dismutase (SOD), and glutation peroxidase (GPx) and DNA damage by comet assay. Also measured serum vitamin E and vitamin C. Data were analyzed by χ^2 and using analysis of variance for repeated measures (ANOVA) and Pos Hoc Dunett. A p value < 0.05 was considered significant. For the determination of risk was calculated odds ratios (OR) with a confidence interval at 95%.Data were processed by standard statistical software SPSS 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Results: There were no statistically significant differences in markers of oxidative stress and DNA damage after treatment of vitamins C and E for 12 months in both groups of rural and urban. Effect was observed a similar effect Tx0 treatment (placebo) compared to Tx1 and Tx2. We found no statistically significant influence allostatic load related to place of residence on the antioxidant efficiency to prevent OxS and DNA damage.

Conclusion: Prolonged administration of high doses of vitamins C (500 or 1000 mg) and E (400UI) are not sufficient to prevent or diminishing oxidative stress and DNA damage in elderly adults relative to rural and urbana areas. The place of residence did not significantly affect the antioxidant efficiency in older adults who received combination therapy of vitamin C and E for 12 months. Our findings suggest that prolonged administration of vitamin C and E may have a placebo effect on oxidative stress and DNA damage.

III. INTRODUCCIÓN

La ecología humana busca el equilibrio armónico entre el hombre y su ambiente, inmersos en una interacción dinámica que le permita al individuo mitigar o contrarrestar las amenazas o retos de índole biológico, psicológico o social a través del mecanismo biológico denominado alostasis propuesto por Sterling y Eyer en 1988, el cual se refiere a los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren como respuesta a los retos ambientales y a los procesos biológicos inherentes a las etapas críticas del ciclo vital humano como es el caso del envejecimiento. En este sentido, el desarrollo tecnológico, el urbanismo y el estilo de vida frecuentemente alteran dicha interacción, propiciando desequilibrios que se traducen en retos estresantes que repercuten en la homeostasis del individuo, incrementando la generación de radicales libres (RL), estrés oxidativo (EOx) y daño al ADN, y consecuentemente aparición de padecimientos infecciosos y crónico degenerativos.

El EOx se refiere al desequilibrio entre la concentración de las moléculas de alto potencial oxidante de oxígeno conocidas como radicales libres (RL) y los sistemas de antioxidantes, cuyo desbalance es a favor de la generación de RL, este fenómeno biológico transitorio ocurre como parte del metabolismo celular normal, y es compensado por la acción eficaz de los sistemas antioxidantes, no obstante factores pro-oxidantes como el tabaquismo, alcoholismo, desnutrición, alimentación inadecuada, estrés psicológico (urbanismo), contaminación ambiental, ejercicio extenuante e insomnio, constituyen factores de riesgo que favorecen que éste proceso se presente. Asimismo se señala que durante el envejecimiento el EOx se intensifica por incremento de los RL y/o deficiencia de los sistemas antioxidantes, lo cual se traduce como daño al ADN y predisposición a padecimientos crónico-degenerativos.

Al respecto, se ha demostrado que una alimentación rica en antioxidantes del tipo de las vitaminas A, C y E, selenio, melatonina, ácidos grasos omega-3 y flavonoides, entre otros, previenen o mejoran las enfermedades crónico-degenerativas que se presentan con mayor frecuencia durante el envejecimiento. En este sentido Linus Pauling señala

que una dieta rica en frutas y verduras no es suficiente para cubrir las exigencias antioxidantes propiciadas por el envejecimiento, debido a que la concentración de antioxidantes en los alimentos que se consumen de manera cotidiana es insuficiente para contrarrestar el estrés oxidativo con dicho proceso. En este sentido, si consideramos la carga alostática que propicia el ambiente urbano los requerimientos de antioxidantes de los adultos mayores con residencia en el área rural debería ser menor, sin embargo su indicación es generalizada, lo cual paradójicamente el exceso del consumo de vitaminas antioxidantes podría constituir un factor pro-oxidante y consecuentemente incrementar el estrés oxidativo.

La combinación del α tocoferol y el ácido ascórbico es el esquema de antioxidantes más utilizados en adultos mayores sanos con fines preventivos y terapéuticos para las enfermedades crónicas debido a la efectividad sobre los lipoperoxidos y su nula toxicidad. La reacción bioquímica de ambos compuestos sobre los lipoperoxidos es complementaria dando lugar a reacciones sinérgicas entre el α -tocoferol y el ácido ascórbico con la participación de glutatión para detener la cadena de lipoperoxidación.

De acuerdo a lo anterior los estudios en cuanto a la eficacia de la administración de ambas vitaminas así como la dosis útil para la disminución de estrés oxidativo es controversial y no del todo concluyente, además de que no se han establecido los parámetros precisos para recomendar la dosis efectiva, considerando la carga o costo alostático (*allostatic load*) del individuo. De ahí que el propósito del presente estudio fue evaluar la efectividad de la administración de α -tocoferol y ácido ascórbico para disminuir la frecuencia y grado de estrés oxidativo así como sus repercusiones sobre el daño al ADN en ancianos con diferente carga alostática, determinada por su lugar de residencia.

IV. MARCO TEÓRICO

El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio entre la concentración de las moléculas de alto potencial oxidante de oxígeno conocidas como radicales libres (RL) y los sistemas de antioxidantes, cuyo desbalance es a favor de la generación de RL, este fenómeno biológico transitorio ocurre como parte del metabolismo celular normal, y es compensado por la acción eficaz de los sistemas antioxidantes, no obstante factores pro-oxidantes vinculados con el urbanismo como el tabaquismo, alcoholismo, desnutrición, alimentación inadecuada, estrés psicológico, contaminación ambiental, ejercicio extenuante e insomnio, constituyen factores de riesgo que favorecen que éste proceso se presente. Asimismo se señala que durante el envejecimiento el EOx se intensifica por incremento de los RL y/o deficiencia de los sistemas antioxidantes, lo cual se traduce como daño al ADN y predisposición a enfermedades crónico-degenerativas. Por tal motivo, se ha propuesto la indicación de ingesta crónica de vitaminas C y E durante el proceso de envejecimiento para disminuir el EOx y el daño al ADN, sin embargo los hallazgos científicos son controversiales, de ahí la relevancia del presente estudio.

Enseguida se presentará la información teórica sobre los mecanismos homeostáticos vinculados al estrés oxidativo, el proceso de envejecimiento, las características bioquímicas y propiedades de los antioxidantes más utilizados en la vejez, así como una revisión sistemática de los principales estudios publicados sobre la eficacia preventiva y terapéutica de las vitaminas antioxidantes C y E con el fin de precisar el problema y la hipótesis.

IV.1 Homeostasis, Alostasis y Carga Alostática.

En términos generales la homeostasis de un individuo se refiere a la estabilidad dinámica que mantiene a sus sistemas fisiológicos esenciales como el pH, la temperatura corporal, los niveles de glucosa y la tensión de oxígeno en equilibrio para la

vida, lo que permite que los sistemas fisiológicos funcionen de manera armónica y complementaria, para garantizar un estado de salud óptimo.

En 1988 Sterling y Eyer propusieron el término alostasis cuyo significado es “estabilidad a través del cambio” y el cual se refiere a mantener en equilibrio esos sistemas fisiológicos esenciales con el medio ambiente y con su estilo de vida, por lo que este es un proceso de regulación dinámico que necesita continuamente de una adaptación en los puntos de ajuste fisiológico. Sin embargo, esa respuesta adaptativa del organismo a los cambios tiene un costo y se conoce con el término de carga alostática la cual depende de la frecuencia, duración e intensidad de la adversidad a la que el organismo se haya enfrentado y por lo tanto lo que haya gastado para mantener los parámetros fisiológicos en rangos funcionales.¹⁻⁵

En este sentido, Mc Ewen ha propuesto tres formas en las que se acumula la desregulación fisiológica en múltiples sistemas o carga alostática. La tipo 1 considerada como estrés frecuente donde la magnitud y la frecuencia de los eventos estresores se van acumulando; la tipo 2 donde un problema crónico no permite que una falla fisiológica regrese a su estado basal y la tipo 3 donde existe una respuesta inadecuada al evento estresor. Cabe resaltar que la tipo 1 puede pasar a tipo 2 o inclusive a 3 cuando el cuerpo no puede responder adecuadamente a acontecimientos repetidos.¹

En el caso del proceso de envejecimiento, existe una acumulación de la carga alostática debida al desgaste de diferentes tipos de experiencias a lo largo de la vida que pueden ser predisposición genética, acontecimientos importantes o simplemente el vivir de cada día junto con las diferencias en el estilo de vida individual que finalmente está influenciado con la constitución genética de cada individuo.⁶

Al respecto, se ha propuesto evaluar diversos parámetros biológicos que pueden ser considerados como mediadores de la adaptación para predecir la vulnerabilidad posterior a una enfermedad o ser usadas como medidas preventivas que retrasen el desarrollo de una enfermedad asociada con la edad.

Los componentes del constructo para medir la carga alostática, son 10 marcadores que han sido asociados con eventos cardiovasculares y con el declive en el funcionamiento físico y cognitivo; Estos parámetros incluyen a la presión arterial sistólica y diastólica que son indicadores de actividad cardiovascular; el índice cintura-cadera que indica los niveles más crónicos del metabolismo y la acumulación del tejido adiposo, probablemente influenciado por el incremento en la actividad de los glucocorticoides; lipoproteína de alta densidad (HDL) y colesterol total que son marcadores cuyos niveles se sabe pueden influir en el desarrollo de aterosclerosis; hemoglobina glicosilada que es una medida integral de varios meses del funcionamiento del metabolismo de la glucosa; dehidroepiandrosterona y la excreción urinaria de cortisol (12hr.) que son marcadores funcionales del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales; niveles de excreción de noradrenalina y adrenalina (12hrs.) como parámetros de la actividad del sistema nervioso simpático.^{3,5,7}

Por todo lo anterior, podemos señalar que el sistema neuroendocrino, el sistema nervioso autónomo y el sistema inmune son los mediadores de la adaptación a los desafíos de la vida de cada día, los mediadores fisiológicos tales como la adrenalina de la médula suprarrenal, los glucocorticoides de la corteza suprarrenal, y las citocinas de las células del sistema inmune actúan sobre los receptores en varios tejidos y órganos para producir los efectos adaptativos a corto plazo pero que pueden ser perjudiciales si no se apagan cuando ya no son necesarios y sus efectos sobre las células blanco se prolongan, llevando a otras consecuencias que pueden incluir la desensibilización del receptor y daño de tejido. De ahí que durante el proceso de envejecimiento este costo a la adaptación es mayor, y el poder conocer el riesgo de enfermedad en los adultos mayores le confiere importancia ya que pueden proponerse medidas preventivas para disminuirlo.⁶

IV.2 Envejecimiento.

Se puede señalar que el envejecimiento es un proceso multifactorial complejo que involucra mecanismos biológicos, psicológicos y sociales, de ahí que sea individualizado. Por tal motivo, los humanos envejecen de manera distinta y la edad cronológica no siempre es coincidente con la edad biológica.⁸ En este sentido, varios órganos, sistemas de la célula, y células del cuerpo humano pueden comenzar a envejecer a diferente tiempo a lo largo de la vida, de ahí que algunas células o tejidos pueden funcionar en un nivel óptimo en un momento dado, mientras que algunos otros pueden estar en un período decreciente.

De lo anterior, si consideramos un enfoque teórico alostático, el envejecimiento humano se puede definir como un proceso gradual y adaptativo, caracterizado por una disminución relativa de la respuesta homeostática debido a las modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, propiciadas por la carga o costo alostático acumulado a lo largo de su historia, como consecuencia de la acción del tiempo en un ambiente determinado. Acorde con este enfoque el proceso del envejecimiento es determinado por la suma de efectos internos y externos, y algunos de estos elementos tienen mayor importancia que otros (Figura IV.1).⁸⁻⁹

Como podemos observar el hombre a lo largo de su existencia está expuesto a factores pro-oxidantes exógenos y endógenos, que tienen como consecuencia la pérdida gradual de la habilidad del individuo para poder mantener la homeostasis, lo que ha dado lugar a que el envejecimiento se clasifique en exitoso, habitual y frágil.¹⁰⁻¹¹ En el envejecimiento exitoso hay un decremento funcional atribuible sólo al proceso mismo de envejecimiento, en el habitual se observan cambios determinados por el efecto combinado de la enfermedad y el estilo de vida junto con el proceso de envejecimiento y el que se conoce como envejecimiento con fragilidad, donde el adulto mayor presenta efectos combinados del envejecimiento biológico junto con una o más enfermedades crónico-degenerativas que lo llevan a la discapacidad.¹²⁻¹³

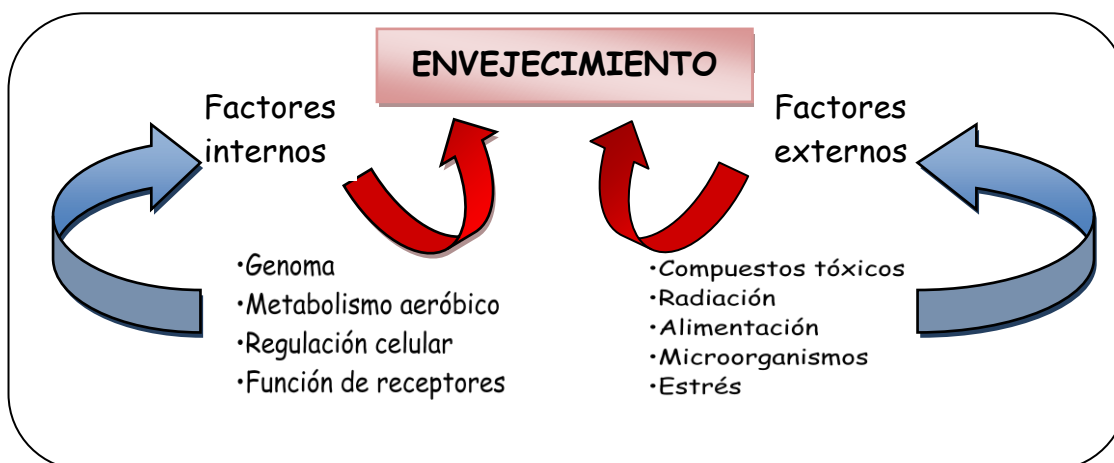


Figura IV.1. Factores internos y externos involucrados en el proceso de envejecimiento.

Respecto a la pregunta de ¿por qué envejecemos? se han planteado diversas teorías para tratar de explicarlo, mismas que se han clasificado de diversas maneras, de forma general se han agrupado entre las que plantean una programación biológica, donde el envejecimiento depende de los relojes biológicos que regulan las etapas de crecimiento, desarrollo, madurez, y edad avanzada y, esta regulación depende de genes que secuencialmente cambian señales por intervalos a los sistemas nerviosos, endocrinos, e inmunes responsables del mantenimiento de la homeostasis y la activación de la respuesta de defensa; y las teorías que apoyan la hipótesis del “error” donde se identifican daños ambientales en los organismos vivos que inducen daño progresivo a varios niveles como el daño mitocondrial en el ADN, acumulación de radicales libres y entrecruzamiento molecular.^{9,14} Sin embargo debido a lo complejo del proceso de envejecimiento se han buscado los puntos de coincidencia de varias teorías, donde la teoría de radicales libres parece ser la más plausible para explicar este proceso.

La teoría de los radicales libres es la que explica la producción de moléculas oxidantes conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs) formadas por el metabolismo aeróbico normal, como causa de ese desequilibrio homeostático en los organismos, dicha teoría fue propuesta en 1956 por Denhan Harman quien relacionó a los RL o

EROs con el envejecimiento y con las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en esta etapa de la vida.¹⁵⁻¹⁸ Esta teoría postula que la producción de estos radicales es la causa de un daño oxidativo crónico y acumulativo a las biomoléculas que puede dar a la célula características de haber envejecido o que incluso la puede llevar directamente a la muerte.

Afortunadamente los organismos poseen un sistema antioxidante que por diversos mecanismos de defensa limitan los niveles de moléculas reactivas oxidantes permitiendo la homeostasis de los mismos, sin embargo cuando existe un desequilibrio en favor de los factores pro-oxidantes sobre el sistema antioxidante se produce lo que llamamos estrés oxidativo (EOx) (Figura IV.2).

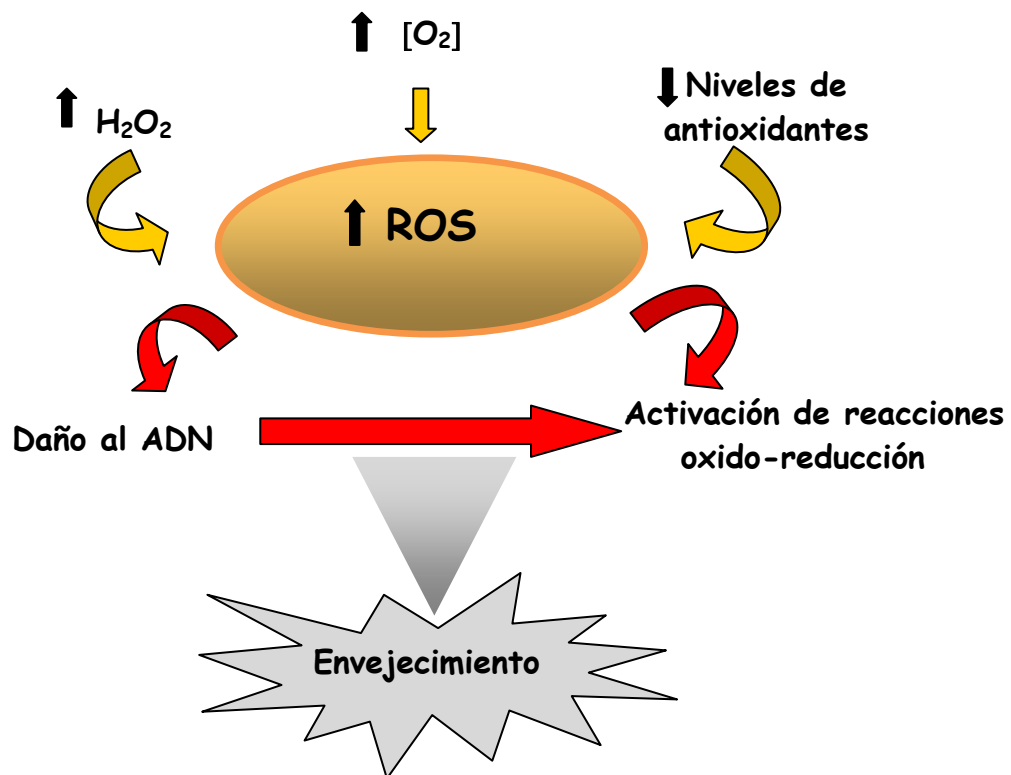


Figura IV.2. Teoría de los Radicales Libres que relaciona al estrés oxidativo con el envejecimiento.

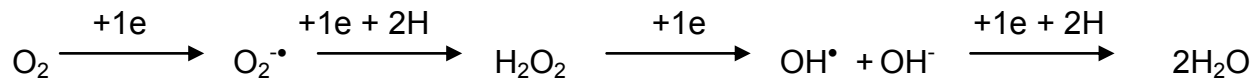
En este sentido se señala que existe una correlación entre la longevidad, la tasa metabólica o tasa de oxígeno utilizado y la actividad protectora antioxidante, así mismo se ha demostrado que el aumento en la expresión de enzimas antioxidantes en animales de experimentación produce un significativo incremento en la longevidad.¹⁹⁻²¹

Por otro lado, se ha demostrado que el EOX provoca daño oxidativo a las biomoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN) y al parecer los RL pueden ser un factor determinante del envejecimiento,²²⁻²⁴ ya que se ha demostrado en estudios *in vitro* que los RL son capaces de propiciar degeneración y muerte neuronal.²⁵ Así mismo varios estudios han evidenciado que el daño oxidativo al ADN y la concentración de lipoperóxidos se incrementa conforme aumenta la edad, al encontrar diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de LPO entre adultos mayores y adultos jóvenes.²⁶⁻³⁰

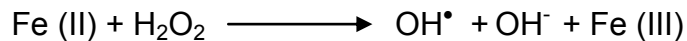
IV.3 Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo (EOX) es causado por la presencia de RL o agentes generadores de los mismos en concentraciones que rebasan la capacidad del sistema antioxidante para bloquearlos o eliminarlos, de ahí que este desbalance a favor de los oxidantes es debida a que éstas especies químicas tienen en su último orbital un electrón desapareado que les confiere una alta reactividad y la capacidad de abstraer un electrón de las moléculas vecinas (lípidos, carbohidratos, proteínas, ADN) para completar su orbital.

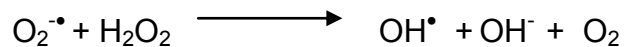
Los RL se pueden formar en el interior de las células como producto de la actividad fisiológica normal, en este sentido el oxígeno (O_2) es una de las moléculas más susceptibles a ser transformada, su reducción involucra cuatro electrones y genera tres especies reactivas de oxígeno (EROs): anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet}).³¹⁻³⁵



El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, pero se considera una EROs por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los RL, ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición, para producir el más reactivo y dañino RL de oxígeno, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}).^{33,35} Los dos metales de transición que frecuentemente reaccionan con el H_2O_2 son el hierro y el cobre, las sales ferrosas o cuprosas reaccionan con el H_2O_2 para formar OH^{\cdot} por una reacción llamada de Fenton.³⁴⁻³⁵



Por su parte, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede reducir ciertos quelatos férricos, interviniendo en la reacción de formación de OH^{\cdot} . La reacción condensada, sin los intermediarios del hierro se conoce como de Haber-Weiss.³⁴⁻³⁵



Otra especie reactiva de oxígeno es el llamado oxígeno simple o singulete ($^1\text{O}_2$) que no es propiamente un radical libre porque no contienen un electrón impar, ya que los dos electrones de la última órbita ocupan el mismo orbital y están apareados. Es una molécula muy reactiva y capaz de oxidar rápidamente a muchas otras moléculas, se forma principalmente por reacciones fotoquímicas y en los eosinófilos.³⁶⁻³⁸

Es importante señalar que los radicales de oxígeno no son los únicos radicales pero se consideran los principales porque son los que inician la producción de otros, entre ellos los radicales con centro de carbono (R^{\cdot}) que pueden ser lípidos, DNA, carbohidratos o proteínas. Los R^{\cdot} reaccionan rápidamente con el O_2 para generar radicales peroxilo

(ROO[•]) que a su vez puede tomar parte en otras reacciones para generar radicales alcoxilos (RO[•]).³⁴⁻³⁸

Por otro lado el nitrógeno también es capaz de formar RL, el de oxido nítrico (NO[•]) y el de dióxido nítrico (NO₂[•]), conformando las llamadas especies reactivas del nitrógeno (ERNs). El NO[•] es producido por la oxidación de nitrógeno guanido-terminal del aminoácido L-arginina, esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS).³⁷⁻³⁹

Así mismo la toxicidad del NO[•] se incrementa cuando este reacciona con el superóxido para formar peroxinitrilo (ONOO⁻), el cual es un fuerte oxidante que daña muchas moléculas biológicas y a pH ácido se puede descomponer liberando pequeñas cantidades de OH[•]. También bajo ciertas condiciones, puede reaccionar con residuos de aminoácidos produciendo nitrotirosina, compuesto que lleva a la inactivación enzimática.³⁷⁻³⁸



IV.3.1 Fuentes endógenas.

Como ya se había mencionado los RL son componentes normales de la fisiología celular e incluso tienen un papel fundamental en la homeostasis del organismo, en las células los RL generalmente son producidos por reacciones de transferencia de electrones, las cuales pueden ser mediadas por acciones enzimáticas que involucran a la fagocitosis, la cadena respiratoria, el sistema citocromo P-450, reacciones del retículo endoplásmico, la acción enzimática de xantina-oxidasa y síntesis de prostaglandinas. Principalmente, son formados a través de reacciones de oxidación-reducción.^{19,34,36}

Uno de los mecanismos fisiológicos más importantes es la fagocitosis, donde los fagocitos activados generan anión superóxido como parte de su papel fisiológico, ya que constituye un mecanismo necesario para combatir infecciones. Aunque los RL son producidos únicamente en la interfase de la membrana plasmática del fagocito y la

bacteria, algunas pérdidas de EROs son inevitables, dichas moléculas pueden difundir y atacar a las diferentes biomoléculas (Figura IV.3).^{33, 35,40}

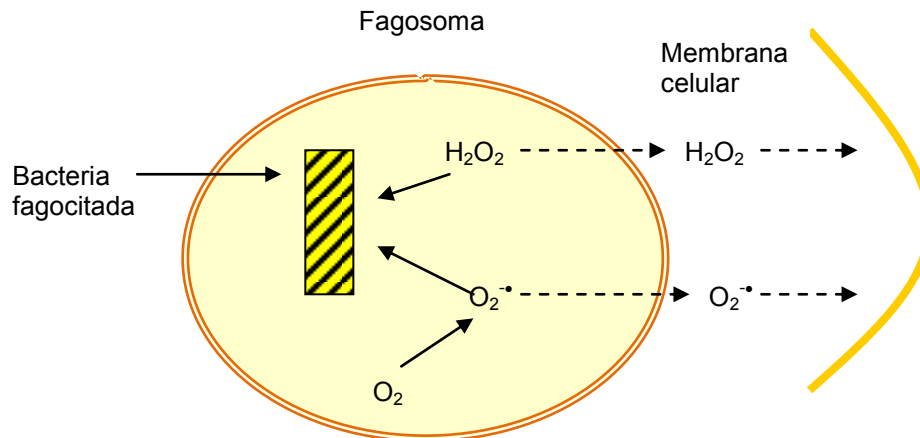


Figura IV.3. Formación de EROs en el interior de una célula fagocitaria.

Tomado de: Huberman (1996)⁴⁰.

En la cadena respiratoria, que se lleva a cabo en la mitocondria a la cual se le considera como la principal fuente de RL, debido a que en este organelo se produce la mayor parte de energía para la célula. En este sentido la maquinaria de producción de energía consiste fundamentalmente en una serie de cuatro complejos moleculares grandes y dos pequeños. Los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) captan las moléculas NADH y $FADH_2$ provenientes del metabolismo las cuales contienen a los electrones y los envían a través de una serie de reacciones a la ubiquinona, el lugar de mayor producción de RL.⁴¹

La ubiquinona, por su parte transfiere los electrones en sentido descendente por el resto de la cadena (complejo III) hasta llegar al complejo IV (citocromo c oxidasa) donde interaccionan con iones hidrógeno y el oxígeno molecular para formar agua. Así mismo, el flujo de electrones provee un gradiente de protones (H^+) necesarios para activar al complejo V (ATP sintetasa), el cual emplea la energía suministrada por dos protones para fabricar ATP.⁴¹⁻⁴²

De ahí que los RL se forman a partir de los electrones que se escapan de la cadena transportadora de electrones, donde la coenzima Q o ubiquinona semireducida dona su electrón al oxígeno generando anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Subsecuentemente la reducción de un electrón del radical anión superóxido por otra coenzima Q semireducida y/o por la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso resultará en producción de H_2O_2 el cual puede difundir fácilmente a través de la mitocondria y llegar a otras membranas celulares, además puede reaccionar con hierro y formar ión hidroxilo vía reacción de Fenton causando así mayor daño oxidativo (Figura IV.4).^{41, 43-44}

En el hígado el sistema citocromo P-450 es el encargado de metabolizar muchos xenobióticos produciendo $O_2^{\bullet-}$ y de H_2O_2 además de activar numerosos agentes hepatotóxicos y de inhibir el metabolismo de diversos medicamentos de ahí que es gran generador de RL.⁴⁶

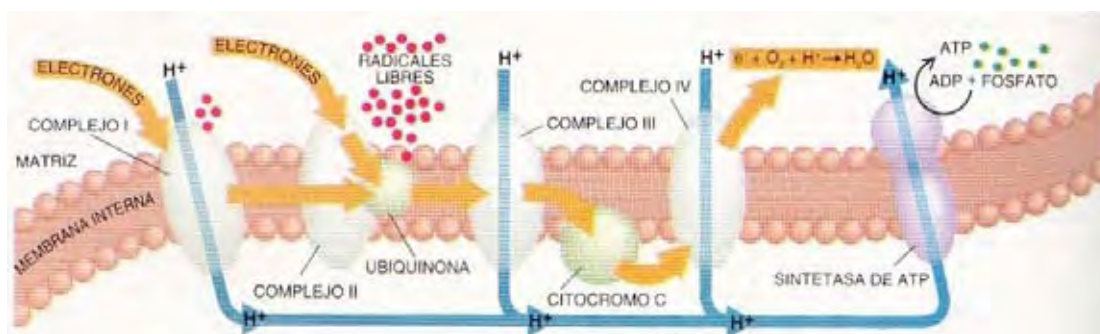


Figura IV.4. Producción de RL en la cadena respiratoria de la membrana interna de la mitocondria. Tomado de: Weindruch (1998)⁴⁵.

Así mismo numerosas enzimas generan RL durante su ciclo catalítico, la más estudiada es la xantina oxidasa, esta genera $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , las concentraciones de estos radicales dependen del pH del medio, de la concentración de oxígeno y la concentración del sustrato.^{35, 38}

IV.3.2 Fuentes exógenas.

Los RL también son producidos de forma exógena por los llamados factores pro-oxidantes como el tabaquismo, alcoholismo, radiación ultravioleta, contaminación ambiental, alimentación inadecuada y ejercicio físico extenuante entre otros. De ahí que si existen altas concentraciones de RL se rompe el equilibrio homeostático produciendo (EOx), en donde la presencia de EROs pueden dañar a la mayoría de constituyentes celulares (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN).

En este sentido se sabe que el humo del cigarro contiene más de 3800 compuestos, incluyendo carcinógenos y sustancias formadoras de radicales libres como la hidroquinona,⁴⁷ además existe daño oxidativo debido a la acción de los radicales OH[•] formados durante la disociación de H₂O₂. Además de lo anterior, la acción directa del humo activa la liberación de factores quimiotácticos, como el leucotrieno B₄, los que a su vez atraen a las células fagocíticas que van a liberar al medio más radicales libres y enzimas proteolíticas.⁴⁸⁻⁴⁹

En relación al alcoholismo, el etanol actúa como catalizador en la formación de RL cuando en el retículo endoplásmico provoca una producción endógena del radical hidroxietil (CH₃-C-[•]HOH) así como radicales derivados del oxígeno. Así mismo el acetaldehído, producto del metabolismo del etanol, puede ser oxidado por vías alternativas como la de xantina oxidasa y la del aldehído oxidasa donde hay producción de O₂^{•-} el cual aumenta la cantidad de RL en el hepatocito provocando daño en el mismo.⁵⁰⁻⁵²

En lo que se refiere a la radiación ultravioleta (UV), se ha reportado que las EROs, como el ¹O₂, el radical peroxilo (ROO[•]) y el O₂^{•-} están involucrados en el mecanismo fisiopatológico del daño inducido por la UV solar, siendo la piel la que está crónicamente expuesta al estrés oxidativo causado por dicha radiación.⁵³⁻⁵⁴

Así mismo se ha reportado que la exposición a niveles altos de contaminación ambiental aumenta el riesgo de presentar daño oxidativo al ADN y disminución de la actividad antioxidante, ya que la mezcla de contaminantes ambientales induce la generación de radicales libres, incrementando el estrés oxidativo. Se sabe que el aire contiene diferentes tipos de moléculas contaminantes siendo tres de las más importantes: el ozono, el dióxido de nitrógeno y las partículas suspendidas.⁵⁵⁻⁵⁸

El ozono es un gas altamente reactivo, capaz de formar RL e inducir lipoperoxidación además es el mayor constituyente del smog. La fuente principal del dióxido de nitrógeno es el tráfico de automóviles en las zonas urbanas y también forma RL. Por último las partículas suspendidas en donde se encuentran un gran número de metales transición, como el hierro y el cobre que pueden generar radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton e inducir EOx.⁵⁵⁻⁵⁸

En lo que respecta a la alimentación inadecuada, se ha reportado que los obesos tienen un mayor riesgo de presentar daño oxidativo debido al tipo de dieta rica en grasas y xenobióticos (aumentando así la producción de EROs) y pobre en frutas y verduras (antioxidantes).⁵⁹⁻⁶⁰ Así mismo la desnutrición favorece la aparición del EOx, propiciando daño al ADN, el cual acelera el acortamiento de los telómeros limitando así la división celular.⁶¹⁻⁶²

El ejercicio físico extenuante, cuando se lleva a cabo de manera intensa incrementa la generación de RL debido al aumento en el consumo de oxígeno de 10 a 20 veces en las células en general, y en el músculo esquelético activo de 100 a 200 veces, de ahí que se incremente la generación de EROs, así mismo durante la fase anaeróbica del ejercicio intenso la xantina oxidasa contribuye en la producción del O_2^{\bullet} propiciando el EOx.⁶³

Por lo anterior podemos señalar que la interacción con los RL de forma endógena o exógena ocurre normalmente durante toda la vida del ser humano, manteniendo así un equilibrio homeostático, sin embargo, en el momento en que la balanza se inclina hacia

una mayor concentración de RL sin que puedan ser neutralizados por el sistema antioxidante se produce estrés oxidativo, con el consecuente daño oxidativo celular en lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA, lo cual puede conducir a una serie de patologías crónico degenerativas relacionadas con el envejecimiento(Figura IV.5).

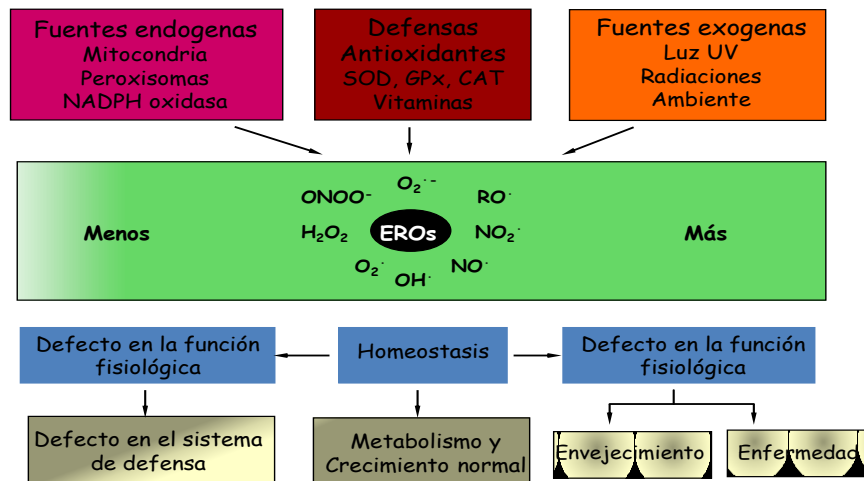


Figura IV. 5. Producción de radicales libres y su equilibrio homeostático.

Tomado de: Finkel y Holbrook (2000)¹⁹.

IV.4 Daño al ADN.

El ADN está constituido por cuatro diferentes bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina y citosina) y mantener su integridad es vital para llevar a cabo la división y supervivencia celular, ya que esta molécula contiene la información genética que codifica para la síntesis de proteínas. Las alteraciones derivadas del efecto oxidante de los RL, producen cambios en la transcripción y transducción del ADN aumentando el riesgo de acumular mutaciones de tipo maligno, senescencia y muerte celular.⁶⁴

En las células podemos encontrar ADN mitocondrial y nuclear, ambos son importantes y vulnerables al daño oxidativo por lo que es posible que se presenten deleciones durante el envejecimiento y muten, provocando una acumulación de 8 hidroxil-2-deoxi-guanosina (8-OHdG) y otros residuos provenientes de la reparación de esas mutaciones,

presentándose como principal consecuencia en el ADN mitocondrial un abastecimiento inadecuado de energía para la célula y un aumento en la producción de ERO's.⁶⁵⁻⁶⁷

En el caso del ADN nuclear la presencia de mutaciones se ha asociado con síndromes de envejecimiento acelerado al observar alteraciones en las enzimas nucleares como la helicasa en síndrome de Werner y el acortamiento de los telómeros y disminución de la capacidad de reparación en el Síndrome de Hutchinson-Gilford.⁶⁸

En condiciones fisiológicas normales el daño oxidativo se hace extensivo ya que se ha estimado que la alteración de una de las bases puede modificar 130,000 bases en el núcleo y en el caso del ADN mitocondrial puede modificar 8,000 bases, dando como resultado la posibilidad de que aparezca un proceso canceroso conforme aumenta la edad.⁶⁷

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es el que frecuentemente se ha visto involucrado en reacciones con la molécula de ADN al ser capaz de abstraer átomos de hidrógeno de manera eficiente, agregándose rápidamente a dobles enlaces. También es capaz de reaccionar con los grupos fosfato aunque de manera más lenta.^{65,69}

El daño oxidativo en la molécula de ADN ocurre por medio de cuatro principales procesos endógenos, reacciones de oxidación, metilación, desaminación y despurinización, que conllevan a la ruptura de hebras y los mecanismos propuestos mediante los que se daña al ADN por acción de los RL se han clasificado en ataque a los azúcares y ataque a las bases.^{65,69}

La desoxiribosa, que es el azúcar del ADN, al oxidarse puede inducir el rompimiento del enlace entre esta y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo que propicia las rupturas de cadena sencilla, en este sentido el radical hidroxilo ataca principalmente a los carbonos 4' y 5' del azúcar por ser los que están más expuestos.^{65, 69}

La reacción anterior, puede dar como resultado la disrupción del enlace fosfodiéster, arriesgando así la integridad de la cadena sencilla de ADN, al crear una muesca, la cual puede presentarse en diferentes configuraciones y sitios. Si esta muesca no es reparada de forma adecuada da como resultado un rompimiento de cadena sencilla.^{65,69}

En el caso de las bases se ha observado que el radical hidroxilo forma aductos con todas las bases, siendo el más estudiado el 8-oxo-deoxyguanosina (8-oxo-dG) por ser el más fácilmente detectable en orina, así mismo se sabe que la modificación de esa base ocurre aproximadamente en 1 de cada 10^5 residuos de guanina en una célula normal humana.^{65,70}

También se ha detectado que el oxígeno singulete (1O_2) es capaz de reaccionar con la guanina eliminándola de la cadena de ADN generando también rompimientos de cadena sencilla, los cuales aparecen después de un tratamiento alcalino y se conocen como sitios sensibles al álcali.⁷¹

Aún cuando los rompimientos de cadena sencilla no son considerados como lesiones letales o mutagénicas, dado que son reparados muy rápidamente, la acumulación de estas lesiones y la sobreexposición a RL puede generar daños irreparables (Figura IV.6).^{65,70}

Las causas de rompimientos de cadena doble del ADN, pueden ser a partir de rupturas previas del ADN de cadena sencilla, al formarse en estos sitios cúmulos de ERO's por la llegada de estas partículas desde diversos sitios del cuerpo; cuando una gran cantidad de RL atacan una parte restringida del ADN, efectuándose numerosos rompimientos de cadena sencilla, que dada su cercanía pueden provocar rompimientos en la cadena doble propiciando un daño de tipo permanente en el material genético y cuando la célula se encuentra en división o en la última etapa de la síntesis ya que puede haber un retraso de la cadena, durante la replicación del ADN, este tipo de rupturas pueden ser provocadas por fuentes exógenas como endógenas (Figura IV.6).^{65,70}

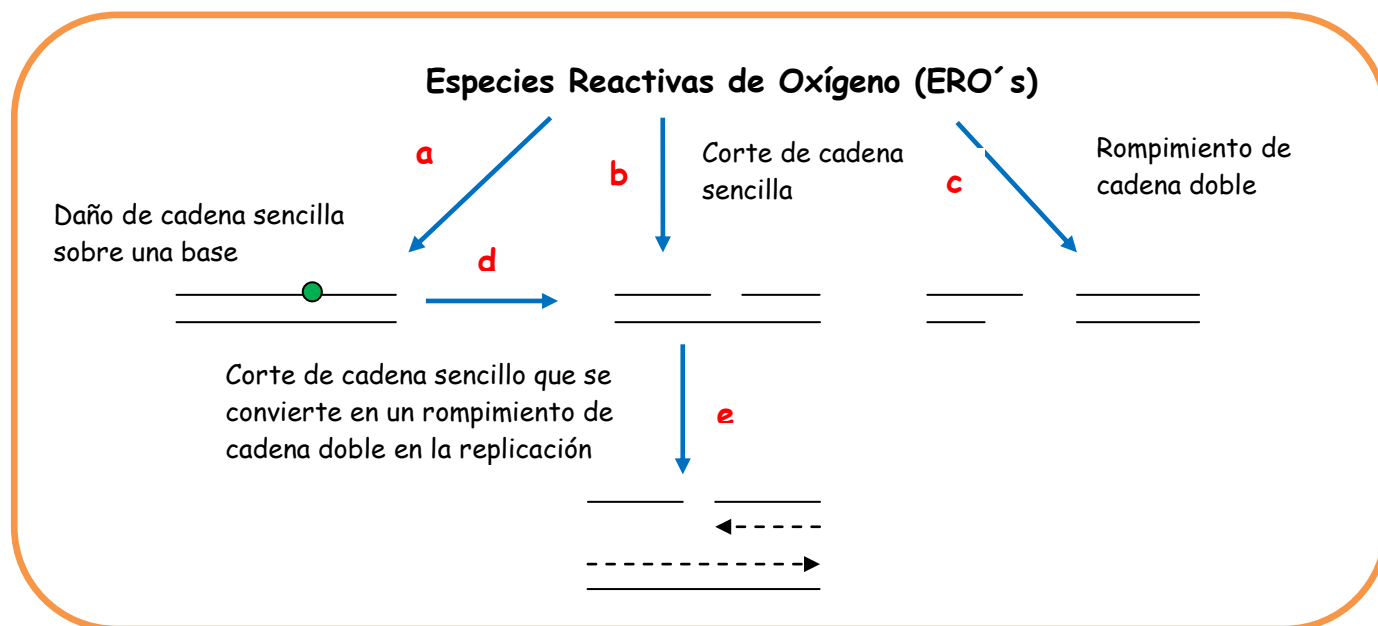


Figura IV.6. Tipos de daño oxidativo al ADN. Las especies reactivas de oxígeno pueden causar diversos tipos de daño al ADN en las bases o en el azúcar (a-c). Algunos sitios en bases dañadas dan lugar a rompimientos de cadena sencilla (d). El ataque por ERO's puede provocar directamente rompimientos de cadena doble (c), así mismo varios cortes en una sola hebra de la cadena presentes durante la síntesis y replicación del ADN provoca el mismo tipo de daño (e). Tomado de: Karanjawala (2004)⁶⁵.

IV.5 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo de una molécula blanco.⁷² Por lo que los antioxidantes pueden actuar eliminando ERO's, removiendo iones metálicos que puedan catalizar reacciones de oxidación y rompiendo cadenas en secuencias de iniciación oxidativa.³⁷

En este sentido, en un organismo la protección antioxidante puede operar a diferentes niveles, por lo que se tienen tres sistemas de defensa que pueden prevenir la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Figura IV.7).⁷³

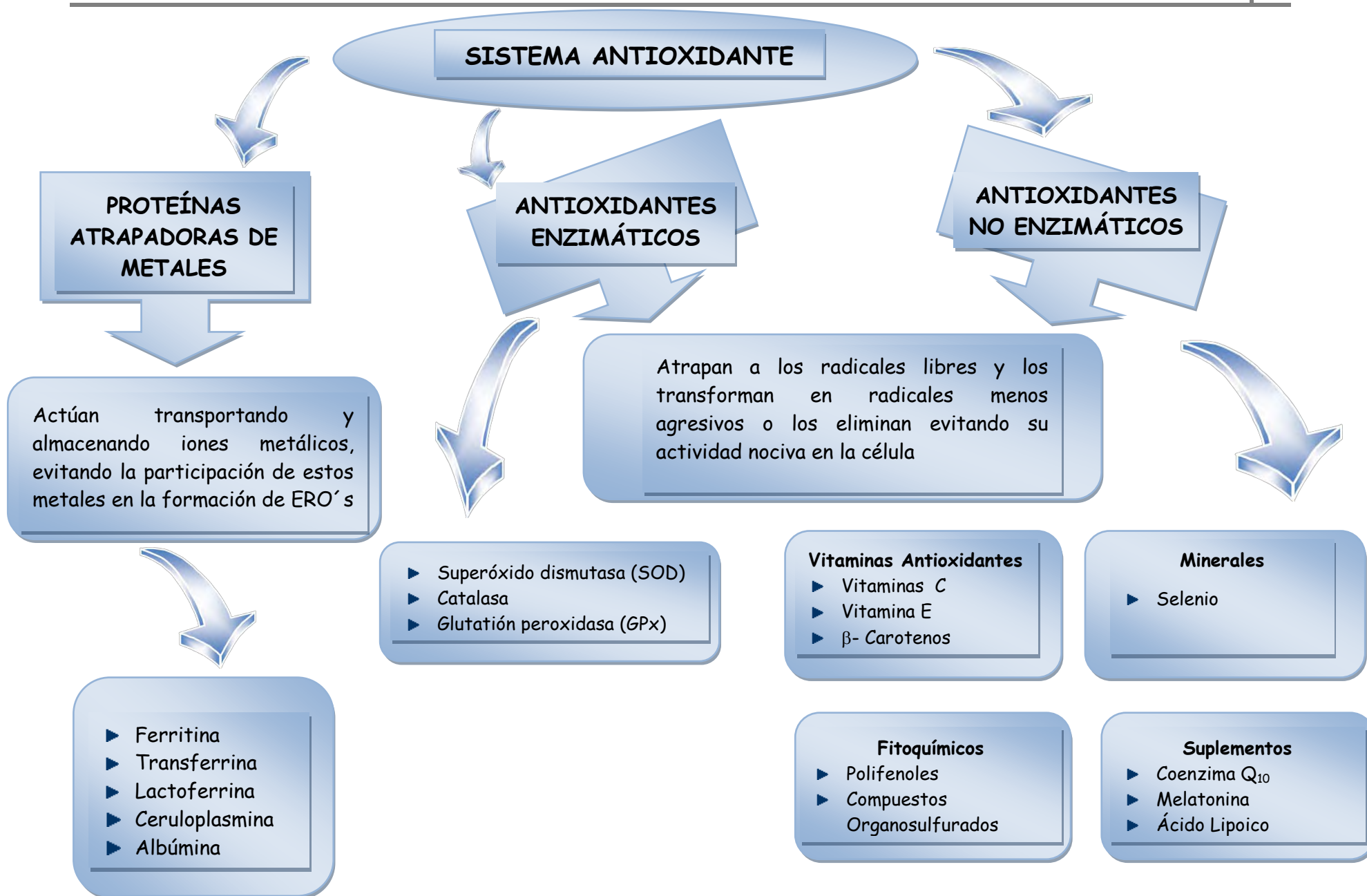


Figura IV. 7. Sistema antioxidante y sus niveles de defensa.

Proteínas Atrapadoras de Metales

Estos antioxidantes actúan transportando y almacenando iones metálicos, evitando la participación de estos metales en la formación de ERO's. Los más importantes son:

Ferritina. Es una proteína intracelular que previene la acumulación excesiva de hierro y es capaz de inhibir la peroxidación al quelar (atrapar) sales de hierro.⁶⁹

Transferrina. Es la proteína que transporta al hierro y usualmente está cargada con un tercio de este ión, lo que le permite mantenerlo unido a ella y que no participe en reacciones de oxido reducción.³⁷

Lactoferrina. Esta proteína transporta al hierro, se encuentra en los líquidos de secreción, entre ellos la leche, y mantiene enlazado a dos átomos de este elemento por mol de proteína a pH 4.⁷³

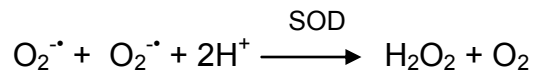
Ceruloplasmina. Es la proteína plasmática que contiene unido a más del 90% del ión cobre (Cu^{2+}), es capaz de inhibir al O_2^- y H_2O_2 , pero su mayor contribución como defensa antioxidante es que rápidamente remueve los iones ferrosos en solución y simultáneamente reduce la cantidad de oxígeno del agua, ya que puede transferir hasta 4 electrones sin formar ERO's, por lo que esta proteína tiene actividad de ferroxidasa catalizando la transformación de Fe^{2+} a Fe^{3+} .

Albúmina. Juega un papel muy importante como antioxidante, ya que está presente en concentraciones relativamente altas en varios fluidos, es capaz de enlazar diferentes iones metálicos, absorber ácido hipoclororoso (HClO), es la responsable de atrapar entre el 10 y el 50% de radicales peroxilo que se generan en el plasma humano. Durante la acción antioxidante, esta proteína se destruye.^{69,73}

Antioxidantes Enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos están presentes en la célula, siendo tres las principales enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx).⁶⁹

Superóxido dismutasa. Fue descrita en 1968 por J.M. McCord y I. Fridovich en eritrocitos, son un grupo de enzimas fácilmente aislables y muy estables. La SOD cataliza la dismutación del ión superóxido en peróxido de hidrógeno:



Se encuentra en tres formas diferentes en tejidos de mamíferos:

- ❖ CuZn-SOD (citoplasma)
- ❖ Mn-SOD (mitocondria)
- ❖ CuZn-SOD de alto peso molecular (Fluidos extracelulares)

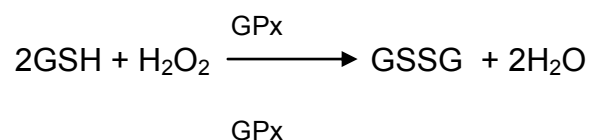
La acción catalítica es llevada a cabo por el cobre y el zinc no tiene función en el ciclo catalítico pero estabiliza a la enzima.⁷⁴

Catalasa. En una enzima con cuatro subunidades proteicas, cada una con un grupo hemo unido a su sitio activo. Su actividad está localizada en los eritrocitos y en los peroxisomas, en donde cataliza la reacción de transformación del peróxido de hidrógeno producido por la SOD en agua y oxígeno molecular.^{69,73}



Glutación peroxidasa. Está compuesta por cuatro subunidades idénticas con un átomo de selenio cada una en forma de seleniocisteína. Se encuentra en el citoplasma y trabaja en combinación con la SOD, eliminando el H_2O_2 de las células y reduce los peróxidos orgánicos (ROOH) en sus respectivos alcoholes.

Durante la reacción el glutati6n es convertido a su forma oxidada (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original por la enzima glutati6n reductasa.⁷³





En el humano se han descrito 4 isoenzimas.⁷⁵

GPx1 y GPx2 son enzimas estrechamente vinculadas en términos de estructura y especificidad para descomponer H_2O_2 e hidroperóxidos de ácidos grasos en el citosol; GPx1 también se encuentra en mitocondria.

GPx3 es una enzima glicosilada extracelular, reduce H_2O_2 , hidroperóxidos de ácidos grasos y de fosfolípidos, pero no los hidroperóxidos de colesterol. Tiene una actividad catalítica más lenta en comparación con otras GPxs.

GPx4 está presente en citosol, mitocondria y núcleo. Reduce hidroperóxidos de fosfolípidos, colesterol y timina y funciona sinérgicamente con vitamina E en la prevención de la lipoperoxidación.

Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos no son sintetizados por los humanos, por lo que es necesario consumirlos de la dieta, existen una gran variedad de este tipo de antioxidantes por lo que para su estudio se puede clasificar como vitaminas antioxidantes, minerales, fitoquímicos y suplementos de los cuales los más importantes son los siguientes:

Vitaminas Antioxidantes

Ácido ascórbico o vitamina C. Es una vitamina hidrosoluble compuesta por seis carbonos en forma de lactona lo que le permite funcionar como un cofactor en diversas reacciones de hidrolización y amidación al transferir electrones a enzimas que proporcionan equivalentes reductores. Permite la oxidación de cadenas laterales de lisina en proteínas, para proporcionar hidroxitrimetil-lisina para la síntesis de carnitina, participa en la conversión de ácido fólico en ácido folínico, en el metabolismo

microsómico de fármacos, y la hidroxilación de dopamina para formar noradrenalina.⁷⁶⁻⁷⁷

A nivel tisular, facilita, la conversión de algunos residuos de prolina y lisina que se encuentran en el procolágeno, en hidroxiprolina e hidroxilisina en la síntesis de colágeno, proteoglucanos y otros constitutivos orgánicos de la matriz intercelular en tejidos como dientes, huesos y endotelio capilar.⁷⁶⁻⁷⁷

Esta vitamina es considerada como el más importante antioxidante en el líquido extracelular por su efectividad al atrapar iones superóxido y radicales peroxilo antes de que inicie la peroxidación lipídica, protegiendo así a las biomembranas. Además de poder eliminar al oxígeno singulete, al ozono, al peroxinitrito, al dióxido de nitrógeno y al ácido hipocloroso.⁷⁶⁻⁷⁷

El ácido ascórbico se oxida al transferir electrones a las ERO's y se forma el ácido dehidroascórbico, el cual debe su estabilidad a la resonancia de sus dobles enlaces. Además, el ácido ascórbico puede ser regenerado por medio de la GSH y vía enzimática por la reducción de NADH que es dependiente de la enzima semidehidroascorbato reductasa.⁷⁶⁻⁷⁷(Figura IV.8)

Debido a que los humanos no pueden sintetizar vitamina C es necesario que la consuman de la dieta, la cual una vez ingerida se absorbe por un mecanismo de transporte activo dependiente de sodio y energía permitiéndole viajar por el torrente sanguíneo donde los linfocitos y los neutrófilos, que son su reservorio, lo absorben como ácido dehidroascórbico y una vez dentro de la célula lo reduce a ácido ascórbico. Así mismo, se absorbe fácilmente en el intestino delgado hasta un 90% cuando la concentración oscila entre 20 y 120mg por día, pero se ha observado que con dosis mayores de 1250mg diarios la absorción es de aproximadamente de un 50%.⁷⁸⁻⁸⁰

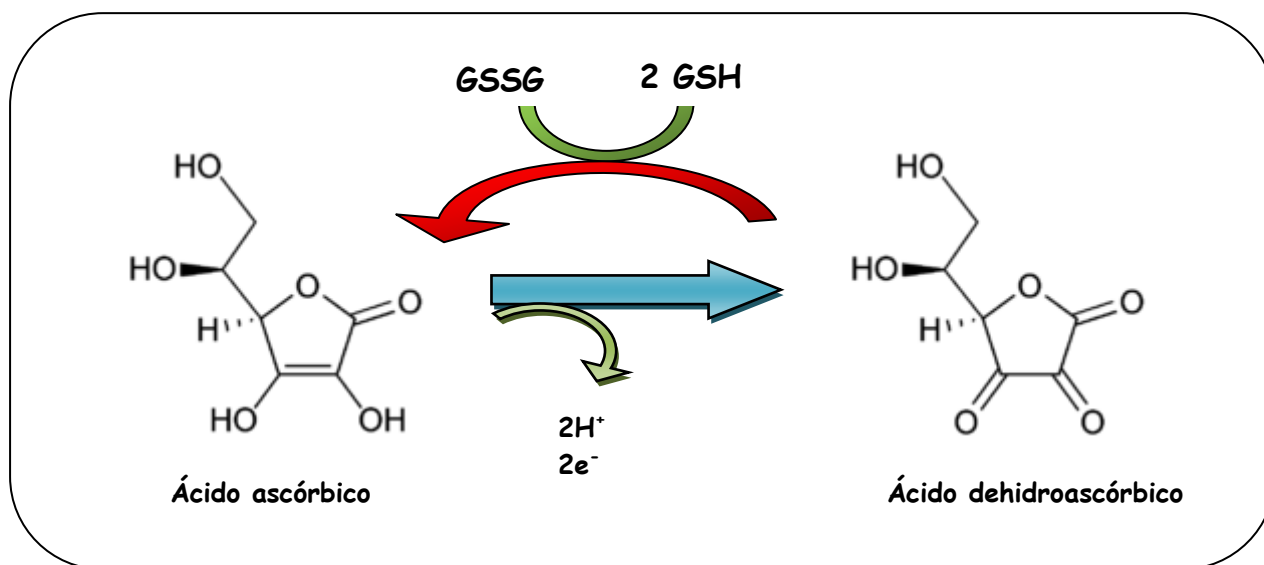


Figura IV.8. Reacción de oxido-reducción del ácido ascórbico.

Esta vitamina se encuentra distribuida en muchas frutas y verduras, se considera que las frutas cítricas y los vegetales de hojas verdes son buenas fuentes de esta, sin embargo, esta vitamina es muy lábil y fácilmente oxidable durante los procesos de cocción y de preparación de los alimentos, ya que puede perderse hasta un 35% de la misma.⁷⁹

Con respecto a la cantidad de vitamina C que contienen los alimentos es muy variable y depende de la estación, de la calidad de la cosecha, del transporte y tiempo de almacenamiento así como de la forma de consumo. El consumo mínimo recomendado para realizar funciones celulares básicas es de 84mg por día, necesario para realizar las funciones básicas donde interviene este nutriente, por lo que se recomienda consumir al menos 5 raciones diarias de frutas y verduras para asegurar un aporte entre 200 y 300mg/d. Como suplemento antioxidante está disponible en el mercado siendo las dosis más comerciales la de 500mg y 1g (Cuadro IV.1).⁷⁹⁻⁸⁰

Con relación a su toxicidad no se ha reportado ningún efecto cuando se consumen megadosis de 3 a 4g por día, sin embargo en humanos se han encontrado molestias gastrointestinales como cólicos, náuseas y diarrea osmótica. Asimismo en consumo de

megadosis por tiempo prolongado se pueden formar cálculos renales de oxalato al ser un producto metabólico de esta vitamina.⁷⁹⁻⁸⁰

Cuadro IV. 1. Cantidad de Vitamina C en frutas y vegetales y su consumo para cubrir 1000mg por día. (Modificado de Padayatty y cols 2003)⁸⁰

Fruta (Ración)	Vitamina C (mg)	Cantidad necesaria para cubrir 1000 mg
Toronja (½ pieza)	40	12.5 piezas
Melón (1 taza rebanado)	40	25 tazas
Kiwi (1 pieza mediana)	75	13 piezas
Mango (1 taza rebanado)	45	22 tazas
Naranja (1 pieza mediana)	70	14 piezas
Papaya (1 taza en cubos)	85	12 tazas
Fresas (1 taza rebanado)	95	10.5 tazas
Sandía (1 taza)	15	67 tazas
Jugo (Ración)		
Toronja (½ taza)	35	14 tazas
Naranja (½ taza)	50	10 tazas
Manzana (½ taza)	50	10 tazas
Uva Forificado (½ taza)	120	4 tazas
Vegetales (Ración)		
Espárragos cocidos (½ taza)	10	50 tazas
Brócoli cocido (½ taza)	60	8 tazas
Col picada (½ taza)	20	25 tazas
Col cocida (½ taza)	15	33 tazas
Coliflor cocida o cruda (½ taza)	25	20 tazas
Pimiento rojo o verde crudo (½ taza)	65	7.5 tazas
Pimiento rojo o verde cocido (½ taza)	50	10 tazas
Papa horneada (1pieza mediana)	25	40 piezas
Jitomate crudo (½ taza)	15	33 tazas
Jitomate enlatado (½ taza)	35	14 tazas

Vitamina E. Es el término genérico utilizado para describir un grupo de al menos 8 compuestos que tienen actividad de α -, β -, δ -, γ - tocoferoles, siendo el primero el más abundante debido a sus características de liposolubilidad es considerado como el más potente antioxidante en la fase lipídica ya que puede actuar en las membranas celulares o en las partículas de lipoproteínas, al participar en la estabilidad física de las mismas y al influir en la arquitectura de los fosfolípidos (Figura IV.9).⁸¹⁻⁸²

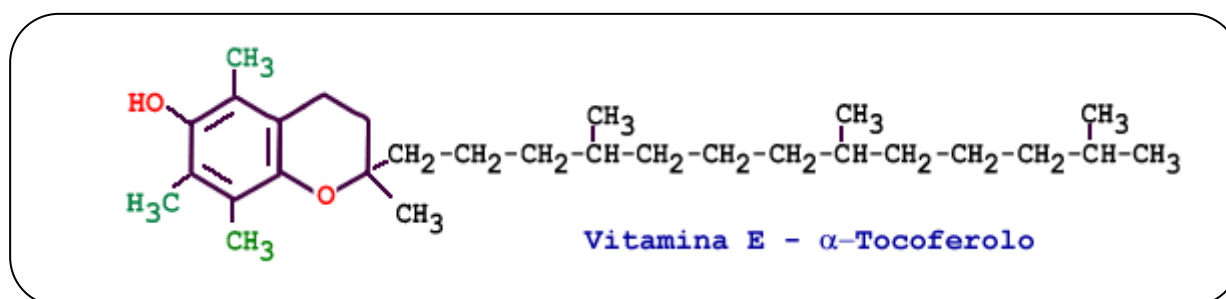


Figura IV.9. Estructura química del alfa-tocoferol.

La vitamina E destruye principalmente radicales peroxilo, pero también es capaz de actuar sobre radicales alcoxilo y superóxido, oxígeno singulete, ozono y es efectiva sobre las especies reactivas del nitrógeno.⁸¹

Además de su participación como antioxidante, se ha observado que está vitamina modula la concentración de oxido nítrico, participando así en la regulación de la vasodilatación arterial. Asimismo regula la agregación plaquetaria inhibiendo la producción de tromboxano que es una prostaglandina; en la función mitocondrial, en el metabolismo de ácidos nucleídos y proteínas y en la producción hormonal.⁸¹

También tiene participación en la regulación de la proteína cinasa C (PKC), inhibiendo su activación en varios tipos celulares como monocitos, macrófagos, neutrofilos y fibroblastos; en este sentido la PKC es la encargada de modular la expresión genética durante el crecimiento, proliferación y diferenciación celular y su activación contribuye a la aparición de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes mellitus, cáncer y enfermedades cardiovasculares.⁸³

La vitamina E es proporcionada por la dieta su absorción es en el intestino, pero ésta es sólo de un 20 a un 40% la cual disminuye al aumentar la dosis, además depende necesariamente de la ingestión de grasa, ácidos biliares y secreciones pancreáticas para posteriormente ser secretada a la circulación en quilomicrones en asociación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL); su sitio de regulación es el hígado y se ha observado que tiene preferencia por la forma alfa de la vitamina, la cual se encuentra almacenado en un 80 al 90% en el tejido adiposo.^{78,84,85}

Durante la lipólisis la vitamina E es transferida a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) catalizada por la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP), misma proteína que puede colocar el α -tocoferol en el revestimiento endotelial de las paredes capilares, manteniendo así las defensas antioxidantes en la pared vascular.⁸⁵

El α -tocoferol se encuentra en los cloroplastos de las células vegetales de ahí que las fuentes naturales de esta vitamina son los aceites vegetales, de los cuales el de germen de trigo, girasol y cártamo son buenas fuentes de α -tocoferol, mientras que los de maíz y soya contienen mayor cantidad de γ -tocoferol, además son fuentes de esta vitamina la mayonesa y la margarina, en el caso de fuentes de origen animal tenemos el hígado de res y los productos lácteos aunque aportan concentraciones más bajas. La concentración de vitamina E en la elaboración de estos productos es muy variable debido a la estabilidad térmica de los vitámeros presentes, a procesos de desecación con exposición al aire y al sol, la adición de ácidos orgánicos y la irradiación entre otros.⁷⁹

El aporte recomendado por día de esta vitamina es de 10 a 15mg (15-22.5UI) para ambos sexos, en este sentido en el mercado existen dosis de 100 y 400UI que son intervalos muy altos en comparación con las dosis recomendadas.^{79,86}

Con respecto a su toxicidad es baja y se ha reportado como límite superior de consumo 1000mg/d (1500 UI), sin embargo los efectos adversos que se han reportados con dosis superiores a 1200mg/d han sido fatiga, dolor de cabeza, debilidad muscular,

cólicos y diarrea, además de la exacerbación de la coagulación sanguínea cuando se ingieren dosis entre 800-1200 mg/d de vitamina E combinada con una deficiencia de vitamina K, causada por una mala absorción o terapia anticoagulante; también se ha reportado un efecto antiadhesivo plaquetario que se puede combinar con el efecto que produce el consumo de aspirina reduciendo la adhesión plaquetaria hasta en un 40%, aumentando el riesgo de hemorragia cerebral en los pacientes con hipertensión arterial.⁷⁸⁻⁷⁹

Cuadro IV.2. Cantidad de Vitamina E en alimentos y su consumo para cubrir 400UI por día.

Alimento (Ración)	Vitamina E (mg)	Cantidad necesaria para cubrir 400 UI (267mg)
Mayonesa (1 cucharada)	3.6	74 cucharadas
Margarina (100g)	14	1907g
Aceite de maíz(1 cucharada)	1.8	148 cucharadas
Mantequilla (1 cucharada)	0.14	1907 cucharadas
Nueces (100g)	25	1068g
Almendras (100g)	25	1068g
Aceite de girasol (100g)	50-62	430g
Aceite de Oliva (100g)	25	1068g
Hígado de Res asado (90g)	0.54	494 cucharadas
Chícharos frescos cocidos (½ taza)	0.44	303 tazas

Carotenoides. Son pigmentos naturales no sintetizados por los animales. Se han identificado más de 500 compuestos y menos del 10% puede ser metabolizado a retinol que funciona como precursor de vitamina A en los mamíferos. Su función principal consiste en la protección del tejido epitelial, en la intervención de los mecanismos que permiten el crecimiento y la reproducción y en el ciclo bioquímico de la retina, donde el 11-cis-retinal se combina con el grupo e-amino de un residuo de lisina específico en la opsina para formar rodopsina permitiendo la fotorecepción por las células retinianas.⁸⁷

Como atrapadores de RL los carotenos son eficaces desactivando al oxígeno singulete a radicales peroxilos, ya que cuentan con un sistema de dobles enlaces que le permiten desactivarlos por transferencia de energía de las especies oxígeno excitadas al carotenoide, produciendo un carotenoide triplete excitado, esa energía es disipada a través de interacciones vibracionales con el solvente recuperando así a la molécula antioxidante (Figura IV.10).^{66,88}

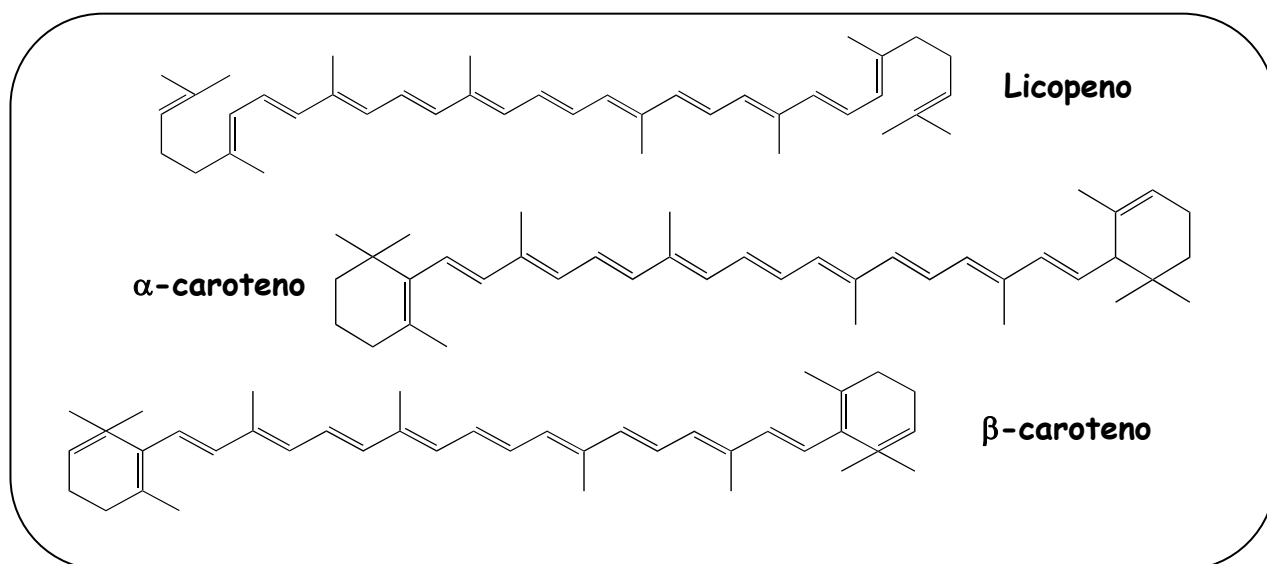


Figura IV.10. Estructura química de algunos carotenoides.

Los carotenoides de las frutas y verduras y los ésteres de retinil provenientes de tejidos animales como el hígado son ingeridos e hidrolizados por lipasas pancreáticas para ser convertidos en retinol en la luz intestinal. El retinol puede ser esterificado y transportado por los quilomicrones, en el hígado se une con la proteína transportadora de retinol para ser distribuido a todos los tejidos, las células del hígado controla su almacenamiento y puede convertirlo en ácido retinoico o retinal que son metabolitos activos o puede ser catabolizado y excretado como ácido retinoico.⁷⁹

Las dosis recomendadas para la ingestión de equivalentes de retinol (ER) por día es de 900 μ g para hombres y de 700 μ g para mujeres, en cuanto a su toxicidad se han

reportado alteraciones óseas y hepáticas cuando la ingesta es mayor a 10000µg ER y al parecer los β-carotenos no son tóxicos en concentraciones altas como el retinol.⁷⁹

Minerales

Selenio. Es un metal que se considera micronutriente y es componente principal de la enzima glutatión peroxidasa, es necesario tomarlo de la dieta ya que el organismo no lo sintetiza y la concentración que se encuentra en los alimentos de origen vegetal depende de la región del cultivo, el pH, la humedad del suelo y la forma química en la que se encuentra.^{79,89}

De la alimentación se absorbe fácilmente como aminoácido selenometionina y después de una transulfuración se libera selenuro el cual es metabolizado a selenofosfato que es el compuesto activo, precursor de la formación de seleniocisteína, proporcionando así su cualidad catalítica en asociación con la selenoproteínas o las selenoenzimas.^{79,89}

En relación a la cantidad de selenio que se debe consumir se ha considerado que 40µg por día es una concentración adecuada para que las enzimas selenio dependientes puedan funcionar correctamente así mismo 300µg por día parece que puede reducir el riesgo de cáncer.^{79,89}

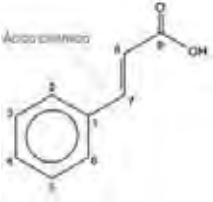
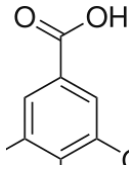
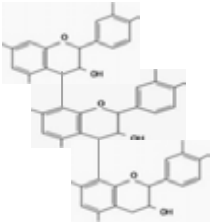
La falta de este elemento está asociada con alteraciones en el metabolismo, principalmente la disminución de la actividad enzimática antioxidante del glutatión, además cuando participa como cofactor puede presentarse una disminución en la regulación oxido-reducción intracelular que realizan estas enzimas.^{79,89}

Fitoquímicos

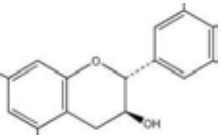
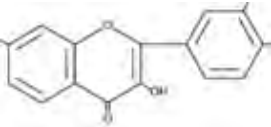
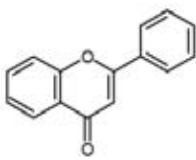
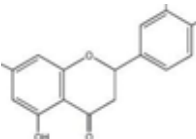
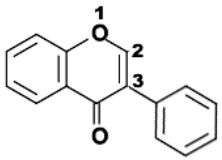
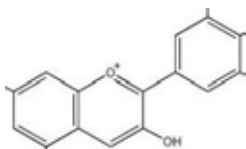
Polifenoles. Constituyen una gran categoría de fitoquímicos que se encuentran presentes en frutas, vegetales y bebidas obtenidas de plantas, por lo que forman parte integral de la dieta humana. Estos compuestos naturales tienen la capacidad de actuar como potentes antioxidantes y esta propiedad está relacionada con su estructura

molecular dependiendo del número de anillos fenólicos que presente, de la posición de los grupos hidroxilo y de la posición de otros grupos funcionales, de ahí que se pueden clasificar en ácidos fenólicos que incluyen a los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, en polímeros fenólicos o taninos y flavonoides que son el grupo más grande e importante ya que se han descrito más de 6,000 compuestos, los cuales se pueden agrupar en antocianidinas y antoxantinas las cuales se subdividen en 5 grupos(Cuadro IV.3 y IV.4).⁹⁰⁻⁹²

Cuadro IV.3. Ácidos fenólicos más representativos

Ácido Fenólico	Compuestos representativos	Alimento o bebida que lo contiene
Ácidos hidroxicinámicos 	Ácido cafeico Ácido ferúlico Gingerol Ácido carnósico	Moras, cerezas, pera, manzana, naranja, ginger, aceite de oliva, café, trigo, maíz, arroz, tomates, espinaca, col, espárrago.
Ácidos hidroxibenzoicos 	Ácido elágico Ácido gálico	Fresas, jugo de uva negra y jugo de uva verde.
Táninos 	Polímeros de catequina Polímeros de epicatequina	Vino tinto, vino blanco, jugo de manzana

Cuadro IV.4. Flavonoides más representativos

Flavonoide	Características	Compuestos representativos	Alimento o bebida que lo contiene
Flavanoles 	Tienen un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo central.	Catequina Epicatequina	Pera, vino tinto, té verde, vino blanco, manzana.
Flavonoles 	Tienen la estructura de las flavonas, además de un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo central.	Quercetina Miricetina Camferol	Aceitunas, cebolla, arándano, brócoli, jitomate, jugo de uva, jugo de manzana, jugo de naranja, té verde, té negro, vino tinto, Ginkgo Biloba.
Flavonas 	Tienen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo central y carecen del grupo hidroxilo en la posición 3.	Apigenina Luteolina	Apio, perejil, pimiento rojo, aceitunas, cítricos, vino tinto
Flavanonas 	Tienen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo central.	Hesperetina Naringenina	Toronja y naranja
Isoflavonas 	Tienen un grupo carbonilo en la posición 4, un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y un anillo fenólico en la posición 4 del anillo central.	Genisteina Daidzeina	Aceite de soya
Antocianidinas 	Tienen unido un grupo hidroxilo en la posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo central	Cianidina Malvidina	Cerezas, uvas rojas, frambuesa, fresa.

El efecto antioxidante de los polifenoles se debe a que pueden actuar como agentes reductores o como donadores de átomos de hidrógeno y como atrapadores del oxígeno singulete, así mismo algunos de ellos pueden actuar quelando de metales de transición. Su eficiencia está directamente relacionada con el grado de hidroxilación de su estructura y son efectivos inhibiendo radicales hidroxilo y peroxilo así como el ión superóxido; además han mostrado ser eficaces para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas.⁹³⁻⁹⁴

Además de eliminar RL, estos compuestos también muestran algunas otras funciones biológicas como una actividad antiinflamatoria, anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, vasodilatadora y anticoagulante. En general, estos compuestos fenólicos se convierten rápidamente en sus derivados glucurónicos después de su ingestión y se transportan al sistema circulatorio y a los diversos órganos del cuerpo incluyendo el cerebro; de ahí que en los últimos años, se ha reportado un efecto neuroprotector en células y en modelos animales.^{90,94}

Compuestos organosulfurados. Compuestos orgánicos que se encuentran presentes en el ajo y la cebolla y que son miembros del género *Allium spp*, como γ -glutamilcisteínas, los sulfóxidos de cisteína (alina), los tiosulfinatos (alicina) y los polisulfuros, como el dialil disulfuro (DADS) y son a los que se les atribuyen propiedades antioxidantes.⁹⁵

Su variedad y concentración está en función de la actividad de la alinasa, una enzima que al ser liberada por la destrucción de la estructura celular del ajo desencadena, a partir de la alina, la formación de la alicina y sus derivados, los polisulfuros.⁹⁵

Se le considera un excelente antioxidante ya que es capaz de inhibir la lipoperoxidación, de atrapar ERO's y de inhibir la producción del radical hidroxilo, además de su acción anticancerígena y preventiva en enfermedades cardiovasculares.⁹⁶

Suplementos

Coenzima Q₁₀. Es una benzoquinona liposoluble que presenta en la posición 6 una cadena lateral constituida por 10 subunidades isoprenoides. La porción benzoquinona de la coenzima Q₁₀ se sintetiza a partir de tirosina, mientras que la cadena isoprenoide se sintetiza a partir de acetil-CoA a través de la ruta del mevalonato. Su principal función es la producción de energía en la mitocondria, al recibir electrones que reducen a la forma oxidada de la ubiquinona en ubiquinol (Figura IV.11).⁹⁷⁻⁹⁸

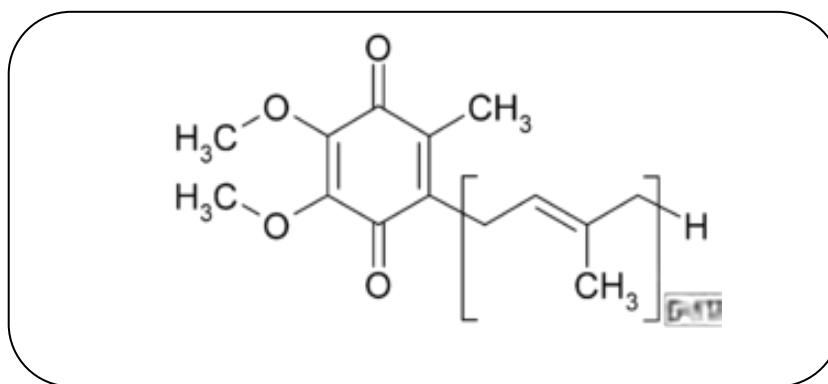


Figura IV.11. Estructura química de la Coenzima Q.

Las propiedades antioxidantes de la Q₁₀ es la prevención de la lipoperoxidación en las membranas celulares al inhibir la cadena de propagación cuando se ha abstraído un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado de dichas membranas, así como la regeneración de la vitamina E y de la vitamina C a sus formas activas.⁹⁷⁻⁹⁸

Melatonina. Es una hormona producida por la glándula pineal que está localizada en el centro del encéfalo, esta indolamina es derivada de la serotonina y su producción está sincronizada con el ciclo luz oscuridad durante las 24 horas del día, sin embargo conforme avanza la edad disminuye su secreción probablemente por alteraciones en los receptores β adrenérgicos, déficit en la vía de utilización de 5-hidroxytriptófano o menor frecuencia en los potenciales de acción durante la noche (Figura IV.12).⁹⁹⁻¹⁰⁰

La melatonina es lipofílica por lo que atraviesa todas las membranas celulares además de la barrera hematoencefálica por lo que su actividad antioxidante incluye la inhibición de la peroxidación lipídica, la inhibición de las prostaglandinas que forman radicales libres por la vía de síntesis y principalmente actúa como atrapadora de OH^\bullet . Así mismo la melatonina tiene la habilidad de regular el balance del glutatión GSH/GSSG mediante un sitio de unión nuclear.⁹⁹⁻¹⁰⁰

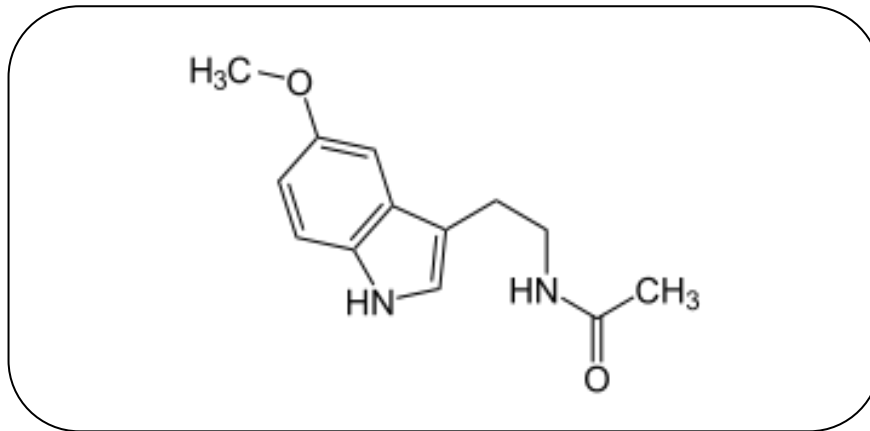


Figura IV.12. Estructura química de la Melatonina.

Ácido lipoico. Es conocido como un cofactor esencial en el metabolismo oxidativo en los complejos multienzimáticos mitocondriales al catalizar la descarboxilación oxidativa de alfa-cetoácidos, está compuesto por una estructura de ocho carbonos y dos grupos tiol, presenta un comportamiento anfipático por lo que esta propiedad le permite participar directamente en los mecanismos de defensa antioxidantes en la fase hidrofílica como hidrofóbica de la membrana.¹⁰¹⁻¹⁰³

El ácido alfa lipoico es la forma oxidada y el ácido dihidrolipoico la reducida, ambas tienen actividad antioxidante, de tal manera que pueden atrapar directamente ERO's, además de quelar metales de transición evitando la lipoperoxidación y son capaces de regenerar antioxidantes endógenos como el glutatión y las vitaminas E y C.

En este sentido, se sabe que modula las proporciones de NADH/NAD^+ y $\text{NADHP}/\text{NADP}^+$ mitocondriales incrementando entre un 30 y un 70% los niveles intracelulares de glutatión (Figura IV.13).¹⁰¹⁻¹⁰³

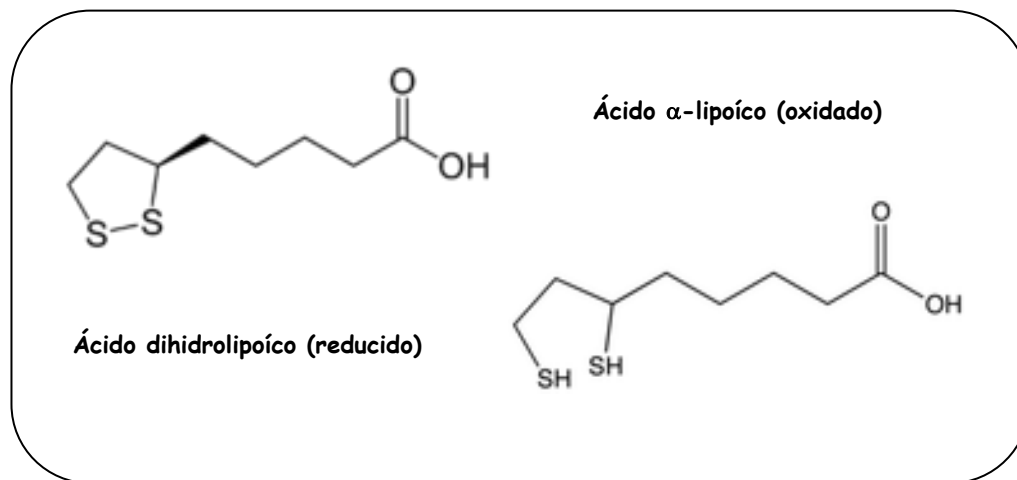


Figura IV.13. Estructura química del Ácido lipoico.

IV.6 Estrés Oxidativo y vitaminas antioxidantes

Como ya se ha mencionado el EOx, ha sido vinculado con la etiología y evolución de los padecimientos crónico-degenerativos de mayor prevalencia durante el envejecimiento, asimismo se señala que durante esta etapa de la vida el EOx se intensifica por el incremento de ERO's y/o deficiencia de los sistemas antioxidantes además de los factores pro-oxidantes que pueden estar presentes como el tabaquismo, alcoholismo, desnutrición, alimentación inadecuada, estrés psicológico (urbanismo), contaminación ambiental, ejercicio extenuante e insomnio, que favorecen que el EOx se presente.

De lo anterior, existen diversos estudios que han demostrado que la administración de α -tocoferol y ácido ascórbico en ancianos puede prevenir o mitigar la aparición de EOx y daño al ADN, repercutiendo positivamente en su estado de salud y longevidad, los

estudios realizados utilizando solamente vitamina E indican que la administración de 600UI de dicha vitamina por 4 semanas y de 1000 UI por 12 semanas reducen significativamente los niveles de lipoperoxidación en plasma;¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ asimismo se reporta que más de 100UI por día durante dos años reduce el riesgo cardiovascular en un 41%;¹⁰⁶ y que 2000UI de vitamina E por día puede proteger a los adultos mayores de daño funcional y cognitivo;¹⁰⁷ con respecto a la utilización de vitamina C se indica que 200mg diarios disminuyen el riesgo de cáncer de estómago, colon y pulmón así como el riesgo de padecer cataratas (Cuadros IV.5-7).¹⁰⁸

Otros estudios indican que la combinación del α - tocoferol y ácido ascórbico es el esquema de antioxidantes más utilizado en adultos mayores sanos y con enfermedades crónicas debido a su efectividad sobre la lipoperoxidación y aparente nula toxicidad (Cuadros IV.6 y 7).

Al respecto, se han probado diversas concentraciones que van desde 100mg de vitamina E con 250mg de vitamina C dos veces al día para reducir el daño al ADN, así como 1000mg de vitamina C con 800UI para disminuir los niveles de lipoperoxidación;¹⁰⁴ la administración en los adultos mayores de 300mg de vitamina E y 1000mg de vitamina C durante un año mostró una mejoría en la memoria a corto plazo, en la respuesta psicomotriz y en la memoria verbal.¹⁰⁹

Sin embargo, existen trabajos que no muestran disminución en el daño al ADN utilizando 1000mg de vitamina C y 533mg de vitamina E,¹⁰⁴ asimismo en otro estudio no se encontraron diferencias en los niveles de lipoperoxidos al utilizar 60,200,400, 800 y 1200UI de vitamina E¹⁰⁴ y otro indica que las concentraciones fisiológicas son suficientes para proteger al organismo de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y con esto la prevención del riesgo cardiovascular,¹¹⁰ de tal manera que la investigación al respecto no es del todo concluyente (Cuadro IV.7).

Por otro lado, existen estudios que indican que la vitamina C puede actuar como pro-oxidante bajo ciertas condiciones, lo que ha causado mucha controversia, al respecto la

reducción por el ascorbato de los metales de transición como el cobre o el hierro podrían tener efectos adversos al producir radicales hidroxilo o alcoxilo en la reducción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos lipídicos respectivamente y aunque esta reacción de Fenton ocurre fácilmente *in vitro*, al parecer *in vivo* es poco probable ya que la disponibilidad de iones metálicos de forma libre se considera muy baja debido a que se encuentran unidos a proteínas como la ferritina, transferrina y ceruloplasmina. Para tratar de verificar si está misma acción pro-oxidante sucede *in vivo*, se han realizado experimentos donde se suplementó hierro en combinación con ácido ascórbico y no se observó ningún efecto pro-oxidante, datos que corroboraron Carr y Frei al realizar un estudio de revisión, donde compilaron evidencia científica de la protección de la vitamina C sobre los lípidos con y sin suplementar hierro.¹¹¹ Por otro lado, Podmore en 1998 reportó un aumento en el daño oxidativo al ADN y que podría ser potencialmente mutagénico, después de suplementar con 500mg de vitamina C durante seis semanas a un grupo de sujetos sanos, sin embargo se ha considerado que el diseño experimental propuesto por este autor no fue el correcto y que sus conclusiones no son válidas, ya que se encontraron inconsistencias en los datos reportados sobre la oxidación al ADN *in vivo*, por los mismos autores en un estudio posterior.^{62,69,111-115}

En el caso de la vitamina E, se ha reportado que *in vitro* puede actuar como pro-oxidante e incrementar la lipoperoxidación y el daño al ADN en cultivos celulares, el mecanismo bioquímico que se plantea es la formación de un radical de alfa-tocoferol el cual requiere de otro antioxidante como la vitamina C o la coenzima Q para ser regenerado, si esto no sucede aumenta la oxidación por un proceso llamado peroxidación mediada por tocoferol (TMP) que produce peróxido de hidrógeno.¹¹⁶

In vivo se ha reportado que una concentración de 1050mg por día de alfa-tocoferol incrementa la susceptibilidad de oxidación en los eritrocitos humanos, en contraste con los eritrocitos de pacientes a los que se les suplemento con 560mg o menos en donde disminuyó.⁷³ Así mismo el reporte más importante fue en 2005, en el cual en un meta análisis se demostró que el consumo de 400UI por día por más de un año en pacientes

adultos con un rango de edad entre 47 y 84 años, estaba asociado a un aumento en la mortalidad, encontrando un riesgo relativo de 1.06 con un intervalo de confianza al 95% de 1.01 a 1.11, con este resultado los autores causaron una gran controversia sobre la utilidad de la vitamina E.¹¹⁷⁻¹¹⁸

Por todo lo anterior, se presentan los resultados de varios estudios donde se administraron vitamina C y vitamina E, de tal manera que muestran las inconsistencias que hay en la utilidad de las vitaminas antioxidantes, con la finalidad de justificar la realización del presente trabajo (Cuadros IV.5-7).

Cuadro IV.5. Estudios relativos a la actividad antioxidante de la vitamina C y E.

Autor-año	Universo de estudio	Finalidad	Cantidad de vitaminas administradas	Tiempo de administración y marcadores	Hallazgos
Mulholland, <i>et al.</i> , 1996 ¹¹⁹	16 mujeres fumadoras	Observar el efecto de la administración de una dosis alta de vitamina C sobre el potencial antioxidante y la oxidación lipídica.	Se formaron 2 grupos. Grupo A. Placebo Grupo B. 1000 mg Vitamina C	14 días Potencial antioxidante (TRAP) y Lipoperoxidos (TBARS)	En ambos marcadores no se observaron diferencias estadísticamente significativas después del tratamiento.
Mol, <i>et al.</i> , 1997 ¹²⁰	14 pacientes controles 12 fumadores 11 Diabéticos	Conocer el efecto de la administración de vitamina E sobre la oxidación de lípidos <i>in vivo</i> .	A los tres grupos se les administró 600UI de Vitamina E.	Dosis diaria por 4 semanas. Medición de lipoperoxidos (TBARS)	Se observó una disminución estadísticamente significativa en los grupos con DM y fumadores antes y después del tratamiento pero no hay diferencia con respecto al grupo control.
Wen, <i>et al.</i> , 1997 ¹²¹	20 pacientes sanos	Conocer el efecto de la administración de vitamina C sobre la lipoperoxidación y su interacción con el glutatión.	Se formaron 2 grupos. Grupo A. Control n= 9 Grupo B. 1000mg de vitamina C n=11	Dosis diaria por 4 semanas. Medición de lipoperoxidos (TBARS) y Glutatión.	En ambos marcadores se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo B después del tratamiento.
Anderson, <i>et al.</i> , 1997 ¹²²	48 pacientes sanos	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C sobre los biomarcadores generadores de oxidativo.	Se formaron tres grupos de 16 pacientes cada uno y se administraron tres tratamientos en tres periodos utilizando un diseño cruzado.	Se administro un placebo, 60mg y 6g de vitamina C por 14 días cada tratamiento durante 6 semanas. Medición de TBARS, Capacidad Antioxidante Total (AT) y Daño al ADN (ensayo cometa).	No se observó una disminución estadísticamente significativa en la medición de TBARS ni en el daño al ADN, se encontró un aumento estadísticamente significativo en AT, pero no hubo diferencias entre usar 60mg o 6g de vitamina C.
Mosca, <i>et al.</i> , 1997 ¹²³	45 pacientes con enfermedad cardiovascular	Determinar el efecto de la suplementación antioxidante sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) .	Se formaron 3 grupos Grupo A. Placebo Grupo B. 500mg de Vitamina C, 400UI de vitamina E y 12mg de β-carotenos. Grupo C. 1000mg de Vitamina C, 800UI de vitamina E y 24mg de β-carotenos.	Dosis diarias por 12 semanas. Se midió oxidación de LDL	Se encontró una disminución estadísticamente significativa entre el grupo C y el placebo en la oxidación de las LDL. Entre el grupo B y el placebo no se encontraron diferencias.

Continuación

Lee, et al., 1998 ¹²⁴	20 pacientes 15 fumadores 5 no fumadores	Evaluar el efecto quimiopreventivo de la administración de antioxidantes sobre el daño al ADN.	Se formaron 5 grupos con 3 pacientes cada uno. Se administraron Grupo A. placebo. Grupo B. 500mg de vitamina C. Grupo C., 200UI de vitamina E Grupo D. 9mg de β-carotenos. Grupo E. 1.8g de ginseng rojo.	Dosis diarias por 4 semanas. Medición de Daño al ADN (8-OHdG).	Se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración de 8-OHdG. En los grupos C y E.
Welch, et al., 1999 ¹²⁵	21 pacientes 9 fumadores 12 no fumadores	Evaluar el efecto de la administración de antioxidantes sobre el daño al ADN.	Se formaron 2 grupos No fumadores Fumadores Se administraron de forma secuencial dos tratamientos primero 350mg de vitamina C, 250mg de vitamina E, 60mg de β-carotenos y 80μg de selenito de sodio. Seguido de 350mg de vitamina C y 250mg de vitamina E.	Se administraron diariamente por 4 semanas con un periodo de suspensión por el mismo tiempo. Medición de Daño al ADN (ensayo cometa y 8-OHdG) y Actividad de GPx.	No se observó una disminución estadísticamente significativa en el daño al ADN, ni un aumento en la actividad de la enzima GPx.
Huang, et al., 2000 ¹²⁶	184 pacientes sanos	Determinar el efecto de la suplementación antioxidante sobre el daño oxidativo al ADN.	Se formaron 4 grupos Grupo A. Placebo Grupo B. 500mg de Vitamina C Grupo C 400UI de vitamina E Grupo D. 500mg de Vitamina C y 400UI de vitamina E.	Dosis diarias por 2 meses. Se midió 8-hidroxi-2-deosiguanosina. (8-OHdG)	No se encontró una disminución estadísticamente significativa del marcador 8-OHdG, entre ningún grupo suplementado y el placebo.
Brennan, et al., 2000 ¹²⁷	14 pacientes sanos 7 en cada grupo de forma aleatoria.	Determinar el efecto protector de la administración de vitamina C o E sobre la inducción de daño al ADN con H ₂ O ₂ en linfocitos.	Se formaron 2 grupos. Grupo A. 1000mg de vitamina C y placebo de vitamina E. Grupo B. 800UI de vitamina E y placebo vitamina C.	Dosis diaria por 42 días. Se determinó por inducción daño al ADN con H ₂ O ₂ en linfocitos.	Se observó una disminución estadísticamente significativa en el daño al ADN por inducción con H ₂ O ₂ en linfocitos.
Proteggente, et al., 2000 ¹²⁸	20 pacientes sanos	Determinar si la administración de vitamina C y hierro produce un efecto pro-oxidante.	Se formaron 3 grupos y se administraron de forma secuencial. Grupo A. placebo Grupo B. 260 mg de vitamina C Grupo C 260 mg de vitamina C y 14 mg de hierro.	Dosis diarias. Por seis semanas con un periodo de suspensión de 8 semanas entre cada tratamiento. Medición de Daño al ADN (8-OHdG).	No se observó un aumento estadísticamente significativo en la concentración de 8-OHdG que indique una acción pro-oxidante de la vitamina C.

Continuación

Jacobson , <i>et al.</i> , 2000 ¹²⁹	63 pacientes fumadores	Determinar si la administración de vitaminas antioxidantes es eficaz en la quimioprevención.	Se formaron 2 grupos. Grupo A. placebo Grupo B. 250mg de vitamina C, 200UI de vitamina E y 6mg de β-carotenos.	Dosis diarias por 6 meses. Se midieron los aductos DNA-hidrocarbonos policíclicos aromático y 8-OHdG.	No se observó una disminución estadísticamente significativa en el daño al ADN.
Ribeiro , <i>et al.</i> , 2007 ¹³⁰	80 pacientes sanos	Evaluar el efecto de una mezcla de vitaminas y minerales sobre el daño al ADN.	Se formaron 2 grupos. Grupo A. placebo Grupo B. Vitasay 25mg de vitamina C, 1mg de vitamina E y 2000UI de acetato de retinol.	Dosis diarias por 4 semanas. Se determinaron inducción de daño al ADN con H ₂ O ₂ en linfocitos y daño por ensayo cometa.	Se observó una disminución estadísticamente significativa en el daño al ADN con ambos marcadores.

Cuadro IV.6. Estudios relativos a la actividad antioxidante de la vitamina C y E con relación a la Diabetes Mellitus.

Autor-año	Universo de estudio	Finalidad	Cantidad de vitaminas administradas	Tiempo de administración y marcadores	Hallazgos
Anderson, <i>et al.</i> , 1999 ¹³¹	40 pacientes. 20 con DM tipo 2 y 20 controles.	Determinar el efecto de la administración antioxidante sobre la cinética de oxidación de LDL en varones con DM tipo 2.	Se formaron 2 grupos. Al grupo de pacientes diabéticos se les administró por 8 semanas placebo posteriormente 12 semanas con 1000mg de vitamina C, 800UI de vitamina E y 24 mg de β -carotenos y finalmente 8 semanas más con placebo. Al grupo control sólo se le administró placebo durante el mismo periodo.	Dosis diarias. Se midió la susceptibilidad de LDL por 4 diferentes técnicas de oxidación. Se midió la formación de dienos conjugados y el daño oxidativo de la apolipoproteína B.	La suplementación antioxidante en los pacientes diabéticos mostró disminución estadísticamente significativa en todos los parámetros de oxidación de LDL. Así como en la formación de dienos conjugados.
Gaede, <i>et al.</i> , 2001 ¹³²	29 pacientes con DM tipo 2	Determinar si la administración de vitamina C y E disminuye la excreción urinaria de albúmina (AER).	Se distribuyó de forma aleatoria a los pacientes para administrar placebo o 1250mg de vitamina C con 680UI de vitamina E por cuatro semanas, posteriormente se suspendieron por tres semanas para finalizar con el tratamiento por cuatro semanas más.	Dosis diarias. Se midió AER por ELISA	Se encontró una disminución estadísticamente significativa en los niveles de AER.
Carrol, <i>et al.</i> , 2003 ¹³³	11 pacientes con DM tipo 2	Determinar el tiempo óptimo para la administración de vitaminas C y E. para prevenir el EOx inducido por un merienda alta en grasas en pacientes con DM tipo 2.	El estudio fue realizado en una secuencia aleatoria administrando 1000mg de vitamina C con 800UI de vitamina E antes del desayuno o antes de la merienda alta en grasa según fuera el caso el día del estudio. El control se realizó sin administración de vitaminas.	Dosis administrada el día del estudio. Se determinaron IL-6 PCR, actividad de PAI-1, MDA y TRAP.	La administración de las vitaminas antes de una cena alta en grasa mostró ser más efectiva que cuando se administran antes del desayuno al obtener una disminución estadísticamente significativa en los niveles de PCR. Los demás parámetros no mostraron ningún cambio significativo.
Beckman JA, <i>et al.</i> , 2003 ¹³⁴	95 pacientes, 26 con DM tipo 1, 23 con DM tipo 2 y 45 controles sanos.	Conocer si la administración crónica de vitamina C y E mejora la vasodilatación del endotelio en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y 2.	Se aleatorizaron a los pacientes para recibir placebo o 1000mg de vitamina C con 800UI de vitamina E.	Dosis diarias por seis meses. Se uso ultrasonografía vascular para determinar la arteria branquial y la vasodilatación del endotelio.	La administración de vitaminas C y E incrementó de manera significativa la función endotelial en los pacientes con DM tipo 1 pero no en los pacientes con DM tipo 2.

Continuación

Regensteiner, <i>et al.</i> , 2003 ¹³⁵	20 pacientes (mujeres) de 30 a 50 años. 10 con DM tipo 2 y 10 no diabéticas.	Conocer la influencia de la administración de vitaminas C y E con L-arginina sobre la función endotelial.	Se formaron 2 grupos. A cada grupo se le administró 9 g de L-arginina por 7 días, posteriormente no se administró nada por otros 7 días y finalmente 1000mg de vitamina C con 1800mg de vitamina E una semana más.	Dosis diarias. Medición del flujo de la arteria branquial (FMD) por dilatación usando ultrasonografía y el flujo sanguíneo del antebrazo por pletismografía	La administración de L-arginina aumento de manera significativa el FMD y el flujo sanguíneo del antebrazo. La administración de vitaminas C y E sólo mostró un aumento significativo en el FMD.
Farvid, <i>e at.</i> , 2004 ¹³⁶	69 pacientes de 30 a 69 años con DM tipo 2.	Conocer el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes y/o minerales sobre la presión sanguínea en pacientes con DM tipo 2.	Se formaron 4 grupos. Grupo M. 30 mg de Zinc con 200mg de magnesio. n= 16 Grupo V. 200mg de vitamina C con 150mg de vitamina E. n=18 Grupo MV. Minerales + vitaminas. n=17 Grupo P. Lactosa como placebo. n=18	Dosis diaria por 3 meses. Medición de la presión sanguínea sistólica y diastólica.	El grupo MV mostró una disminución estadísticamente significativa en los niveles de presión sistólica y diastólica.
Farvid, <i>et al.</i> , 2004 ¹³⁷	69 pacientes de 30 a 69 años con DM tipo 2.	Conocer el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes y/o minerales sobre el perfil lipídico en pacientes con DM tipo 2.	Se formaron 4 grupos. Grupo M. 30 mg de Zinc con 200mg de magnesio. n= 16 Grupo V. 200mg de vitamina C con 150mg de vitamina E. n=18 Grupo MV. Minerales + vitaminas. n=17 Grupo P. Lactosa como placebo. n=18	Dosis diaria por 3 meses. Medición de triglicéridos, colesterol total, HDL-c, LDL-c. APO A1 y B.	El grupo MV mostró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de HDL-c y apo A1.
Naziroglu, <i>et al.</i> , 2004 ¹³⁸	80 mujeres posmenopáusicas 40 con DM tipo 2 y 40 controles	Evaluar el efecto de la terapia de reemplazo hormonal y la administración de vitamina C y E sobre los niveles de antioxidantes y lípidos en pacientes con DM tipo 2.	Se formaron tres grupos. 40 pacientes posmenopáusicas sin DM con terapia hormonal. 20 pacientes con DM y con terapia hormonal. 20 pacientes con DM, terapia hormonal y 1000mg de vitamina C con 600mg de vitamina E.	Dosis diarias por seis semanas. Se determinaron MDA, GPx, CAT y glutatión reducido	La administración de terapia hormonal de reemplazo y vitaminas antioxidantes mostró un aumento estadísticamente significativo en los niveles CAT, GPx y glutatión reducido y una disminución significativa en los niveles de MDA.

Continuación

Levy, <i>et al.</i> , 2004 ¹³⁹	299 mujeres, 113 con DM tipo 2	Evaluar si el tipo de haptoglobina puede predecir el efecto de la terapia antioxidante sobre la aterosclerosis coronaria.	Las pacientes se distribuyeron de forma aleatoria en grupos, a los cuales se les administró placebo, terapia hormonal de sustitución y 1000mg de vitamina C y 800UI de vitamina E.	Dosis diarias por 3 años. Se midió aterosclerosis por angiografía. Se determinó el fenotipo de haptoglobina.	Se encontró una disminución estadísticamente significativa en el diámetro mínimo luminal de las pacientes con terapia antioxidante y haptoglobina 1-1, siendo este efecto más marcado en los pacientes con DM tipo 2.
Farvid, <i>et al.</i> , 2005 ¹⁴⁰	69 pacientes de 30 a 69 años con DM tipo 2.	Comparar el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes y/o minerales sobre la disfunción glomerular y tubular en pacientes con DM tipo 2.	Se formaron 4 grupos. Grupo M. 30 mg de Zinc con 200mg de magnesio. n=16 Grupo V. 200mg de vitamina C con 100UI de vitamina E. n=18 Grupo MV. Minerales + vitaminas. n=17 Grupo P. Lactosa como placebo. n=18	Dosis diaria por 3 meses. Excreción de albúmina urinaria y actividad de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG)	Los grupos V y MV mostraron disminución estadísticamente significativa en los niveles de excreción de albúmina urinaria. La actividad de NAG no mostró cambios en ningún grupo.
Tessier, <i>et al.</i> , 2009 ¹⁴¹	36 pacientes con DM tipo 2.	Comparar el efecto de dos dosis de vitamina C en adultos mayores con DM 2 sobre los marcadores de lipoperoxidación.	Se formaron 3 grupos. Grupo A. Placebo Grupo B. 500mg de vitamina C Grupo C. 1000mg de Vitamina C	Dosis diaria por 12 semanas. Se midieron Dienes conjugados, TBARS, Glutatión oxidado y reducido en granulocitos	Para ambos grupos de tratamiento no se observó disminución estadísticamente significativa en los niveles de TBARS, ni en dienos conjugados, sólo aumentó la actividad del glutatión en su forma reducida para el tratamiento con 1g de vitamina C.

HDL= Lipoproteínas de alta densidad LDL= lipoproteínas de baja densidad APO = Apolipoproteínas MDA = Malondialdehído GPx = Glutatión peroxidasa CAT = Catalasa
PCR = Proteína C reactiva TRAP = Medición del potencial antioxidante total por atrapamiento de radicales PAI1 = Inhibidor del activador de plasminógeno

Cuadro IV.7. Estudios relativos a la actividad antioxidante de la vitamina C y E con relación a aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares.

Autor-año	Universo de estudio	Finalidad	Cantidad de vitaminas administradas	Tiempo de administración y marcadores	Hallazgos
Heart Protection Study, 1999 ¹⁴²	20,536 adultos entre 40 y 80 años con enfermedades coronarias, enfermedad arterial oclusiva o DM tipo 2.	Conocer los efectos de la administración de vitaminas antioxidantes durante 5 años sobre la mortalidad y mayor morbilidad en pacientes con terapia para hipercolesterolemia.	Se aleatorizaron a los pacientes para recibir placebo o 250mg de vitamina C con 600mg de vitamina E y 20mg de β-carotenos.	Dosis diarias por 5años. Se dio seguimiento a los pacientes con chequeos tres veces por año.	No se encontraron diferencias significativas en las causas de mortalidad ni en la morbilidad en pacientes con terapia para hipercolesterolemia después de 5 años de tratamiento.
Huang, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴³	184 pacientes	Determinar el efecto de la administración de la vitamina C y E sobre el daño al ADN.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a 47 se les administró placebo, a 46 se les administró 500mg de vitamina C, a 45 400UI de vitamina E y a 46 ambas dosis de vitaminas C y E.	Dosis diarias por 2 meses. Se midió 8-OHDG por inmunoensayo.	La administración de Vitamina C y E solas o en combinación no mostraron ningún cambio en los niveles de 8-OHDG.
Salonen, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴⁴	458 pacientes 225 varones y 233 mujeres	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E para retardar la progresión de aterosclerosis en la arteria carótida.	Se conformaron 4 grupos a los cuales se les administró un placebo, 272UI de vitamina E, 500mg de vitamina C y ambas vitaminas	Dosis diarias por tres años. Se uso ultrasonografía para evaluar la progresión aterosclerótica..	La administración de vitaminas C y E disminuyó de manera significativa la progresión aterosclerótica en varones, en mujeres la disminución no fue significativa.
Title, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴⁵	75 pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD)	Determinar si los niveles bajos de homocisteína con ácido fólico con o sin antioxidantes puede mejorar función endotelial en pacientes con CAD.	Se conformaron tres grupos a los que se les administró placebo, ácido fólico y ácido fólico y vitamina C y E.	Dosis diarias por 4 meses. Medición de la función endotelial por ultrasonido	La administración de ácido fólico con y sin vitaminas antioxidantes disminuyó los niveles plasmáticos de homocisteína pero sólo mejoro de forma significativa la función endotelial.
Porkkala-Sarataho, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴⁶	48 pacientes (varones)	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E y su combinación sobre la lipoperoxidación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Se conformaron 4 grupos a los cuales se les administró un placebo, 272UI de vitamina E, 500mg de vitamina C y ambas vitaminas	Dosis diarias por 3 años. Se midió 7-hidroxi-8-oxo-2' deoxiguanosina, productos de oxidación del colesterol y TRAP.	La administración de vitaminas E y la combinación de C y E disminuyó de manera significativa el 7β-hidroxicolesterol. No se encontró ningún cambio en la excreción urinaria de 7-hidroxi-8-oxo-2' deoxiguanosina ni en TRAP después de la administración de vitamina C, E y su combinación.

Continuación

Kaikkonen, <i>et al.</i> , 2001 ¹⁴⁷	100 pacientes	Determinar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a los cuales se les administró placebo, 500mg de vitamina C, 200mg de vitamina E y ambas dosis de vitaminas C y E.	Dosis diarias por 12 meses. Se midieron los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos.	La administración de vitamina E reduce significativamente los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos. La administración de vitamina C ni la combinación de ambas mostró cambios significativos en la reducción de los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos.
Huang, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁴⁸	184 pacientes	Determinar el efecto de la administración de la vitamina C y E sobre la excreción urinaria de 8-iso-PGF2, MDA, 4-hidroxi-alquenos y ORAC.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a 47 se les administró placebo, a 46 se les administró 500mg de vitamina C, a 45 400UI de vitamina E y a 46 ambas dosis de vitaminas C y E.	Dosis diarias por 2 meses. Se midió 8-iso-PGF2 por inmunoensayo, MDA y 4-hidroxi-alquenos por TBARS y ORAC por fluorescencia.	La administración de Vitamina C y E solas o en combinación reduce significativamente los niveles de 8-iso-PGF2. No se observó ningún efecto de la administración de vitaminas sobre MDA y 4 hidroxi-alquenos. Sólo el grupo con administración de vitamina C mostró un aumento significativo en ORAC.
Heart Protection Study, 2002 ¹⁴⁹	20,536 adultos entre 40 y 80 años con enfermedades coronarias, enfermedad arterial oclusiva o DM tipo 2.	Conocer los efectos de la administración de vitaminas antioxidantes durante 5 años sobre la mortalidad vascular o no vascular y la mayor morbilidad en pacientes de alto riesgo.	Se aleatorizaron a los pacientes para recibir placebo o 250mg de vitamina C con 600mg de vitamina E y 20mg de β -carotenos.	Dosis diarias por 5 años. Se dio seguimiento a los pacientes con chequeos tres veces por año.	No se encontraron diferencias significativas en todas las causas de mortalidad ni en la incidencia de enfermedad vascular o cáncer después de 5 años de tratamiento.
Harper, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵⁰	12 pacientes con anticuerpos citoplasmáticos anti neutrofilos (ANCA) asociados a vasculitis.	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E en PMN aislados de pacientes con ANCA asociados a vasculitis.	A los pacientes se les administró 800UI de vitamina E con 1000mg de vitamina C.	Dosis diarias por 10 días. Medición de la generación de ión superóxido por reducción de ferricitocromo C y capacidad antioxidante total (CAT) por quimioluminiscencia	La administración de vitaminas C y E mostró un disminución en la generación del ión superóxido y un aumento en al CAT ambas estadísticamente significativas
Fang, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵¹	37 pacientes con trasplante cardiaco de menos de 2 años	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre el desarrollo de la aterosclerosis y la función vasomotora endotelial coronaria en pacientes con trasplante cardiaco.	Se aleatorizaron a los pacientes y se les administró placebo o 400UI de vitamina E con 500mg de vitamina C.	Dosis diarias por un año. Medición de la función endotelial coronaria. y por ultrasonografía el grosor de la íntima arterial.	El grosor de la íntima arterial mostró un aumento en el grupo placebo pero no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de tratamiento y la función endotelial coronaria se mantuvo sin cambio en ambos grupos.

Continuación

Salonen, <i>et al.</i> , 2003 ¹⁵²	440 pacientes 212 varones y 228 mujeres	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre la arteria carótida y el grosos de la capa media de la íntima arterial.	Se conformaron 4 grupos a los cuales se les administró un placebo, 272UI de vitamina E, 500mg de vitamina C y ambas vitaminas	Dosis diarias por seis años. Se uso ultrasonografía para evaluar la progresión aterosclerótica..	La administración de vitaminas C y E disminuyó de manera significativa la progresión aterosclerótica en varones, en mujeres la disminución no fue significativa.
Smolková, <i>et al.</i> , 2004 ¹⁵³	46 pacientes sobrevivientes de un infarto al miocardio y 60 controles sanos	Determinar si una modesta administración antioxidante puede disminuir el EOX durante el periodo invernal.	Se formaron 2 grupos. A uno se le administró placebo y al otro 100mg de vitamina E 100mg de vitamina C y 6mg de β-carotenos.	Dosis diaria por 12 semanas Medición de micronúcleos Folatos, FRAP, MDA, Homocisteína	La administración antioxidante mostró un aumento en los niveles de FRAP y una disminución en los valores de MDA ambos estadísticamente significativos. La administración de vitaminas disminuyó el daño al ADN cuando los niveles de folatos son normales, si estos son bajos hay aumento en la cantidad de micronúcleos y los niveles de homocisteína.
Kinlay, <i>et al.</i> , 2004 ¹⁵⁴	25 pacientes con enfermedad coronaria arterial	Conocer el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes sobre la función endotelial coronaria y la función endotelial de la arteria branquial.	Se aleatorizaron a los pacientes y se les administró placebo o 800UI de vitamina E con 1000mg de vitamina C.	Dosis diaria por 6 meses. Medición de la función endotelial coronaria y la función endotelial de la arteria branquial. Se midió F-2Isoprostanos	No se encontraron aumentos estadísticamente significativos en la función vasomotora del endotelio coronario y branquial. La administración de vitaminas antioxidantes tiene una tendencia a disminuir los niveles de F2-isoprostanos.
Stone, <i>et al.</i> , 2004 ¹⁵⁵	300 pacientes. Con revisiones después de 1, 3,6 y 12 meses de intervención.	Determinar el efecto de la administración de atorvastatina con y sin vitamina C y E sobre la función endotelial en episodios de isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria estable.	Se formaron 3 grupos. Al primero se le administró placebo, al segundo atorvastatina y al tercero atorvastatina y 800UI de vitamina E y 1000mg de vitamina C.	Dosis diarias por un año. Medición de la función endotelial por medio de la dilatación de la arteria branquial.	No se encontró ningún cambio significativo sobre la función endotelial.

Continuación

Zureik, <i>et al.</i> , 2004 ¹⁵⁶	1162 pacientes	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre la estructura y función vascular.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a 563 se les administró placebo, y a 599 se les administró 120mg de vitamina C, 30mg de vitamina E, 6mg de β -carotenos, 100 μ g de selenio y 20mg de zinc.	Dosis diarias por 7 años. Se examinó la carótida por ultrasonido y la velocidad de pulsación femoral-carótida.	No se encontraron diferencias estadísticamente significativas el grosor de la arteria carótida ni en el promedio de pulsaciones femoral-carótida.
Rodrigo, <i>et al.</i> , 2008 ¹⁵⁷	110 pacientes con hipertensión arterial inicial	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre la disminución de la presión arterial.	Se formaron 2 grupos Grupo A. Placebo. Grupo B. 1g de vitamina C y 400UI de vitamina E.	Dosis diarias por 8 semanas. Se evaluaron FRAP, TBARS y 8-iso-PGF2.	Se observó una disminución estadísticamente significativa de TBARS y 8-iso-PGF2 así como un aumento en FRAP en los pacientes de grupo B, además de una disminución en la presión arterial.

MDA = Malondialdehído TRAP = Medición del potencial antioxidante total por atrapamiento de radicales 8-OHDG = 8-hidroxi 2 deoxyguanosina ORAC = Capacidad de absorción del radical oxígeno 8-Iso-PGF2= 8 isoprostanos CAT = Capacidad antioxidante total en equivalentes de trolox FRAP= Habilidad del plasma para reducir el hierro.

Cuadro IV.7. Estudios relativos a la actividad antioxidante de la vitamina C y E con relación a aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares.

Autor-año	Universo de estudio	Finalidad	Cantidad de vitaminas administradas	Tiempo de administración y marcadores	Hallazgos
Heart Protection Study 1999 ¹⁴²	20,536 adultos entre 40 y 80 años con enfermedades coronarias, enfermedad arterial oclusiva o DM tipo 2.	Conocer los efectos de la administración de vitaminas antioxidantes durante 5 años sobre la mortalidad y mayor morbilidad en pacientes con terapia para hipercolestérolémia.	Se aleatorizaron a los pacientes para recibir placebo o 250mg de vitamina C con 600mg de vitamina E y 20mg de β -carotenos.	Dosis diarias por 5 años. Se dio seguimiento a los pacientes con chequeos tres veces por año.	No se encontraron diferencias significativas en las causas de mortalidad ni en la morbilidad en pacientes con terapia para hipercolesterolemia después de 5 años de tratamiento.
Huang, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴³	184 pacientes	Determinar el efecto de la administración de la vitamina C y E sobre el daño al ADN.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a 47 se les administró placebo, a 46 se les administró 500mg de vitamina C, a 45 400UI de vitamina E y a 46 ambas dosis de vitaminas C y E.	Dosis diarias por 2 meses. Se midió 8-OHdG por inmunoensayo.	La administración de Vitamina C y E solas o en combinación no mostraron ningún cambio en los niveles de 8-OHdG.
Salonen, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴⁴	458 pacientes 225 varones y 233 mujeres	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E para retardar la progresión de aterosclerosis en la arteria carótida.	Se conformaron 4 grupos a los cuales se les administró un placebo, 272UI de vitamina E, 500mg de vitamina C y ambas vitaminas	Dosis diarias por tres años. Se usó ultrasonografía para evaluar la progresión aterosclerótica.	La administración de vitaminas C y E disminuyó de manera significativa la progresión aterosclerótica en varones, en mujeres la disminución no fue significativa.
Tittle, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴⁵	75 pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD)	Determinar si los niveles bajos de homocisteína con ácido fólico con o sin antioxidantes puede mejorar función endotelial en pacientes con CAD.	Se conformaron tres grupos a los que se les administró placebo, ácido fólico y ácido fólico y vitamina C y E.	Dosis diarias por 4 meses. Medición de la función endotelial por ultrasonido.	La administración de ácido fólico con y sin vitaminas antioxidantes disminuyó los niveles plasmáticos de homocisteína pero sólo mejoró de forma significativa la función endotelial.
Porkkala-Sarataho, <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴⁶	48 pacientes (varones)	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E y su combinación sobre la lipoperoxidación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Se conformaron 4 grupos a los cuales se les administró un placebo, 272UI de vitamina E, 500mg de vitamina C y ambas vitaminas	Dosis diarias por 3 años. Se midió 7-hidroxi-8-oxo-2' deoxiguanosina, productos de oxidación del colesterol y TRAP.	La administración de vitaminas E y la combinación de C y E disminuyó de manera significativa el 7 β -hidroxicolesterol. No se encontró ningún cambio en la excreción urinaria de 7-hidroxi-8-oxo-2' deoxiguanosina ni en TRAP después de la administración de vitamina C, E y su combinación.

Continuación

Kaikkonen, <i>et al.</i> , 2001 ¹⁴⁷	100 pacientes	Determinar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a los cuales se les administró placebo, 500mg de vitamina C, 200mg de vitamina E y ambas dosis de vitaminas C y E.	Dosis diarias por 12 meses. Se midieron los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos.	La administración de vitamina E reduce significativamente los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos. La administración de vitamina C ni la combinación de ambas mostró cambios significativos en la reducción de los niveles plasmáticos de F2-isoprostanos.
Huang, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁴⁸	184 pacientes	Determinar el efecto de la administración de la vitamina C y E sobre la excreción urinaria de 8-iso-PGF ₂ , MDA, 4-hidroxi-alquenos y ORAC.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a 47 se les administró placebo, a 45 se les administró 500mg de vitamina C, a 45 400UI de vitamina E y a 46 ambas dosis de vitaminas C y E.	Dosis diarias por 2 meses. Se midió 8-iso-PGF ₂ por inmunoensayo, MDA y 4-hidroxi-alquenos por TBARS y ORAC por fluorescencia.	La administración de Vitamina C y E solas o en combinación reduce significativamente los niveles de 8-iso-PGF ₂ . No se observó ningún efecto de la administración de vitaminas sobre MDA y 4 hidroxi-alquenos. Sólo el grupo con administración de vitamina C mostró un aumento significativo en ORAC.
Heart Protection Study, 2002 ¹⁴⁹	20.536 adultos entre 40 y 80 años con enfermedades coronarias, enfermedad arterial oclusiva o DM tipo 2.	Conocer los efectos de la administración de vitaminas antioxidantes durante 5 años sobre la mortalidad vascular o no vascular y la mayor morbilidad en pacientes de alto riesgo.	Se aleatorizaron a los pacientes para recibir placebo o 250mg de vitamina C con 600mg de vitamina E y 20mg de β -carotenos.	Dosis diarias por 5 años. Se dio seguimiento a los pacientes con chequeos tres veces por año.	No se encontraron diferencias significativas en todas las causas de mortalidad ni en la incidencia de enfermedad vascular o cáncer después de 5 años de tratamiento.
Harper, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵⁰	12 pacientes con anticuerpos citoplasmáticos anti neutrofilos (ANCA) asociados a vasculitis.	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E en PMN aislados de pacientes con ANCA asociados a vasculitis.	A los pacientes se les administró 800UI de vitamina E con 1000mg de vitamina C.	Dosis diarias por 10 días. Medición de la generación de ión superóxido por reducción de ferritocromo C y capacidad antioxidante total (CAT) por quimioluminiscencia.	La administración de vitaminas C y E mostró un disminución en la generación del ión superóxido y un aumento en el CAT ambas estadísticamente significativas.
Fang, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁵¹	37 pacientes con trasplante cardíaco de menos de 2 años	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre el desarrollo de la aterosclerosis y la función vasomotora endotelial coronaria en pacientes con trasplante cardíaco.	Se aleatorizaron a los pacientes y se les administró placebo o 400UI de vitamina E con 500mg de vitamina C.	Dosis diarias por un año. Medición de la función endotelial coronaria y por ultrasonografía el grosor de la intima arterial.	El grosor de la intima arterial mostró un aumento en el grupo placebo pero no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de tratamiento y la función endotelial coronaria se mantuvo sin cambio en ambos grupos.

ntinuación

inen, et 2003 ¹⁵²	440 pacientes 212 varones y 228 mujeres	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre la arteria carótida y el grosos de la capa media de la intima arterial.	Se conformaron 4 grupos a los cuales se les administró un placebo, 272UI de vitamina E, 500mg de vitamina C y ambas vitaminas	Dosis diarias por seis años. Se uso ultrasonografía para evaluar la progresión aterosclerótica.	La administración de vitaminas C y E disminuyó de manera significativa la progresión aterosclerótica en varones, en mujeres la disminución no fue significativa.
ilková, et 2004 ¹⁵³	46 pacientes sobrevivientes de un infarto al miocardio y 60 controles sanos	Determinar si una modesta administración antioxidante puede disminuir el EOx durante el periodo invernal.	Se formaron 2 grupos. A uno se le administró placebo y al otro 100mg de vitamina E 100mg de vitamina C y 6mg de β-carotenos.	Dosis diaria por 12 semanas. Medición de micronúcleos Fولات, FRAP, MDA, Homocisteína	La administración antioxidante mostró un aumento en los niveles de FRAP y una disminución en los valores de MDA ambos estadísticamente significativos. La administración de vitaminas disminuyó el daño al ADN cuando los niveles de fólatos son normales, si estos son bajos hay aumento en la cantidad de micronúcleos y los niveles de homocisteína.
lay, et al., 04 ¹⁵⁴	25 pacientes con enfermedad coronaria arterial	Conocer el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes sobre la función endotelial coronaria y la función endotelial de la arteria branquial.	Se aleatorizaron a los pacientes y se les administró placebo o 800UI de vitamina E con 1000mg de vitamina C.	Dosis diaria por 6 meses. Medición de la función endotelial coronaria y la función endotelial de la arteria branquial. Se midió F-2isoprostanos	No se encontraron aumentos estadísticamente significativos en la función vasomotora del endotelio coronario y branquial. La administración de vitaminas antioxidantes tiene una tendencia a disminuir los niveles de F2-isoprostanos.
ne, et al., 04 ¹⁵⁵	300 pacientes. Con revisiones después de 1, 3,6 y 12 meses de intervención.	Determinar el efecto de la administración de atorvastatina con y sin vitamina C y E sobre la función endotelial en episodios de Isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria estable.	Se formaron 3 grupos. Al primero se le administró placebo, al segundo atorvastatina y al tercero atorvastatina y 800UI de vitamina E y 1000mg de vitamina C.	Dosis diarias por un año. Medición de la función endotelial por medio de la dilatación de la arteria branquial.	No se encontró ningún cambio significativo sobre la función endotelial.

Continuación

Zureik, <i>et al.</i> , 2004 ¹⁵⁶	1162 pacientes	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre la estructura y función vascular.	Los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria a 563 se les administró placebo, y a 599 se les administró 120mg de vitamina C, 30mg de vitamina E, 6mg de β -carotenos, 100 μ g de selenio y 20mg de zinc.	Dosis diarias por 7 años. Se examinó la carótida por ultrasonido y la velocidad de pulsación femoral-carótida.	No se encontraron diferencias estadísticamente significas el grosor de la arteria carótida ni en el promedio de pulsaciones femoral-carótida.
Rodrigo, <i>et al.</i> , 2008 ¹⁵⁷	110 pacientes con hipertensión arterial inicial	Evaluar el efecto de la administración de vitamina C y E sobre la disminución de la presión arterial.	Se formaron 2 grupos Grupo A. Placebo. Grupo B. 1g de vitamina C y 400UI de vitamina E.	Dosis diarias por 8 semanas. Se evaluaron FRAP, TBARS y 8-iso-PGF2.	Se observó una disminución estadísticamente significativa de TBARS y 8-iso-PGF2 así como un aumento en FRAP en los pacientes de grupo B, además de una disminución en la presión arterial.

MDA = Malondialdehído TRAP = Medición del potencial antioxidante total por atrapamiento de radicales 8-OHdG = 8-hidroxi 2 deoxyguanosina ORAC = Capacidad de absorción del radical oxígeno 8-Iso-PGF2= 8 isoprostanos CAT = Capacidad antioxidante total en equivalentes de trolox FRAP= Habilidad del plasma para reducir el hierro.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que la oxidación mediada por radicales libres denominada como estrés oxidativo (EOx) puede contribuir en la fisiopatología de diversas enfermedades crónico degenerativas, tales como aterosclerosis, diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, artritis reumatoide y algunos tipos de cáncer, así como en el proceso de envejecimiento.

Al respecto, se han propuesto alternativas para prevenir o controlar el EOx durante la vejez, entre las que podemos destacar la administración conjunta de las vitaminas antioxidantes C y E, cuyos resultados son controversiales, de ahí que nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es el efecto de la administración prolongada de α -tocoferol y ácido ascórbico sobre los marcadores de EOx y daño al ADN en adultos mayores del área rural vs. urbana?

¿Cuáles son los principales factores de la carga alostática que influyen en la efectividad del α -tocoferol y ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo en adultos mayores del área rural vs. urbana?

VI. HIPÓTESIS

- ❖ Tomando en cuenta la influencia de la carga alostática sobre el EOx y el daño al ADN, vinculada con el lugar de residencia suponemos que los adultos mayores del área urbana mostrarán una respuesta antioxidante menos eficiente que los del área rural ante la administración prolongada de α -tocoferol y ácido ascórbico.
- ❖ Considerando el enfoque teórico de la carga alostática, suponemos que los principales factores que influyen en la efectividad antioxidante del α -tocoferol y ácido ascórbico serán el lugar de residencia urbano, el sobrepeso y el sedentarismo.

VII. OBJETIVOS

General

- ❖ Evaluar la efectividad de la administración de α -tocoferol y ácido ascórbico para disminuir el estrés oxidativo y daño al ADN en una población de adultos mayores del área rural vs. urbana.

Específicos

- ❖ Evaluar el efecto de la administración prolongada de α -tocoferol y ácido ascórbico sobre los marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores del área rural vs. urbana.
- ❖ Determinar el efecto de la administración prolongada de α -tocoferol y ácido ascórbico sobre el daño oxidativo al ADN en adultos mayores del área rural vs. urbana.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

VIII.1 Tipo de Estudio

Previo consentimiento informado, se llevó a cabo un estudio cuasi-experimental en una muestra de 141 adultos mayores, 66 con residencia permanente por más de 10 años en la ciudad de México y 75 con residencia permanente por más de 10 años en el municipio de Actopan, Hidalgo (Figura VIII.1).

VIII.2 Población

La muestra del área rural fue seleccionada de los grupos de adultos mayores cautivos del Valle del Mezquital, Estado de Hidalgo (N=400), y del área urbana, del “Club Ecológico de San Juan de Aragón” en la Ciudad de México (N=400); utilizando como criterios de inclusión, edad de 60 a 70 años, sin distinción de sexo, sanos desde el punto de vista gerontológico y excluyendo, a las personas que no desearan participar en el programa de intervención. Así mismo, se eliminaron a los sujetos que no cumplieron con el programa de intervención, que presentaron reacciones alérgicas a los antioxidantes y los que decidieron abandonar el proyecto antes de la primera evaluación post-intervención.

Se conformaron tres grupos de adultos mayores de la ciudad de México y tres grupos de adultos mayores del municipio de Actopan Hidalgo, al primer grupo de cada lugar de residencia se le administró 400UI de vitamina E (α -tocoferol) y 500mg de vitamina C (ácido ascórbico), al segundo grupo de cada lugar de residencia se le suplementó con 400UI de vitamina E (α -tocoferol) y 1000mg de vitamina C (ácido ascórbico), y al tercer grupo de cada lugar de residencia se le administró un placebo con una presentación farmacéutica similar a la de los suplementos vitamínicos. Todos los grupos se formaron de manera aleatoria.

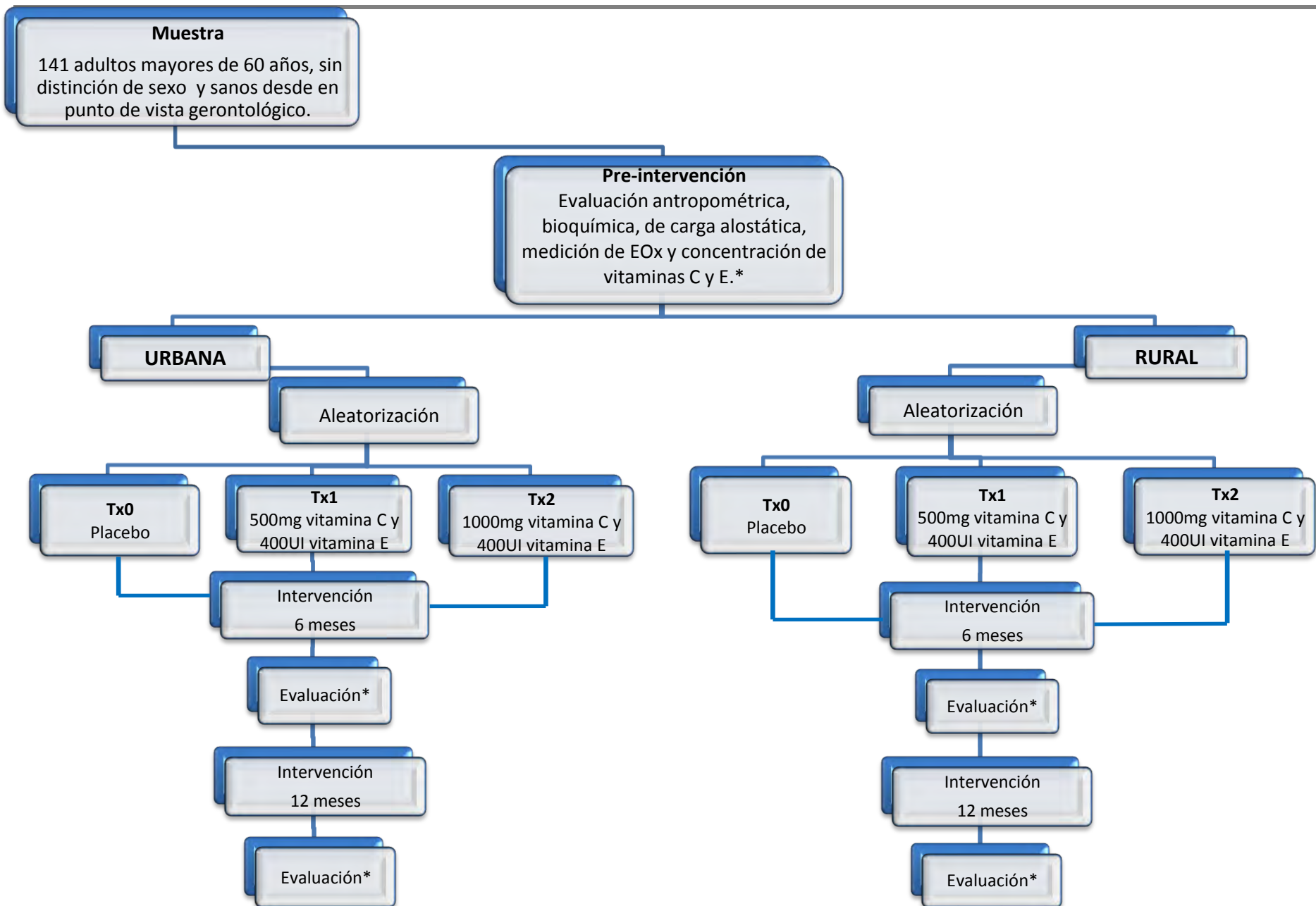


Figura VIII.1. Diseño Experimental. *La evaluación que se realizó fue: antropométrica que consistió en tomar el peso, talla, índice de masa corporal (IMC), índice cintura-cadera (ICC), Tensión arterial sistólica y diastólica (TAS y TAD); Bioquímica que consistió en biometría hemática, química sanguínea y de la carga alostática; evaluación del estrés oxidativo donde se cuantificaron lipoperóxidos plasmáticos (LPO), antioxidantes totales (AT), la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) y daño al ADN; cuantificación sérica de las vitaminas C y E;

VIII.3 Variables

Independiente:

Suplemento vitamínico.

- a) Administración diaria de 400 mg de vitamina E (α -tocoferol) y 500mg de vitamina C (ácido ascórbico).
- b) Administración diaria de 400 mg de vitamina E (α -tocoferol) y 1000mg de vitamina C (ácido ascórbico).
- c) Administración diaria de placebo.

El nivel de medición para las vitaminas antioxidantes fue cuantitativo, obteniéndose los valores en mmol/L de cada analito.

Dependiente:

Estrés oxidativo: que fue evaluado por medio de los niveles de lipoperóxidos plasmáticos (LPO), actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx), capacidad sérica antioxidante total (AT), brecha antioxidante (GAP), relación SOD/GPx y daño oxidativo al ADN.

El nivel de medición fue considerado en dos niveles: Cuantitativo de cada una de las mediciones descritas y cualitativas considerando los siguientes puntos de corte:

LPO \geq 0.340 μ mol/L

SOD \leq 170

GPx \leq 5500

AT \leq 0.9

GAP \leq 190 μ mol/L

SOD/GPx \geq 0.023

Daño al ADN \geq 40% de daño o \geq 6 células con daño.

Así mismo se clasificó el tipo de EOx considerando un puntaje máximo de 7 cuando todos los parámetros estaban fuera de los puntos de corte, de ahí que se estratificó de la siguiente manera:

0-1 Sin estrés oxidativo	4-5 EOx moderado
2-3 EOx leve	6-7 EOx severo

Carga alostática: que fue evaluada utilizando los siguientes marcadores: índice cintura cadera (ICC), presión arterial sistólica (TAS), presión arterial diastólica (TAD), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y colesterol total (COL). Además se evaluó el índice de masa corporal (IMC) y sedentarismo.

El nivel de medición fue considerado de manera cualitativa considerando los siguientes puntos de corte, en el caso de la variable sedentarismo se considero positiva cuando el adulto mayor no realizaba ninguna actividad física programada:

ICC \geq 0.9	HDL \leq 44 mg/dL
TAS \geq 140 mm Hg	COL \leq 217mg/dL
TAD \geq 85 mm Hg	IMC \geq 27

Así mismo se clasifico la carga alostática considerando un puntaje máximo de 5 cuando todos los parámetros estaban fuera de los puntos de corte, estratificándose de la siguiente manera:

0-2 Carga alóstática baja	3-5 Carga alostática alta
---------------------------	---------------------------

VIII.4 Técnicas

Se incluyeron en el estudio a los adultos mayores sanos desde el punto de vista gerontológico diagnosticados por un médico geriatra y que firmaron el consentimiento informado, tal como lo establece la declaración de Helsinki (Edimburgo, 2000).¹⁵⁷

Se llevó a cabo una sesión de información y capacitación sobre el programa de intervención dirigido a los adultos mayores y familiares responsables o vinculados con su alimentación y cuidado personal, sobre la administración de vitamina E (α -tocoferol) y de vitamina C (ácido ascórbico).

Se realizó una evaluación pre y post intervención de las siguientes parámetros: (i) mediciones antropométricas (peso, estatura, circunferencia de la cintura y cadera e índice de masa corporal), (ii) presión de la tensión arterial sistólica y diastólica, (iii) parámetros bioquímicos de estrés oxidativo, (iv) medición del daño al ADN, (v) concentración séricas de vitamina E (α -tocoferol) y de vitamina C (ácido ascórbico).

Mediciones antropométricas y clínicas:

Las medidas antropométricas fueron obtenidas tomando los siguientes parámetros:

Para determinar el peso, las personas fueron pesadas con la menor cantidad de ropa, (con una bata clínica) en una báscula calibrada marca Torino. En el caso de la estatura, los pacientes se colocaron con los talones juntos, glúteos hombros y cabeza en contacto con el estadiómetro, y los ojos mirando al frente y el plano de Frankfurt paralelo al suelo. El índice de masa corporal: se obtuvo a través de la razón peso dividido entre la estatura al cuadrado (kg/m^2).

Para obtener la circunferencia de la cintura se realizó la medida a nivel de la cicatriz umbilical y la cadera se determinó midiendo la parte más prominente de los glúteos, en ambos casos se utilizó una cinta métrica de asbesto sin hacer ninguna presión sobre el cuerpo. El índice cintura-cadera: se obtuvo al dividir el valor obtenido de la circunferencia de la cintura entre la circunferencia de la cadera.

Presión Arterial

La presión arterial se tomó siguiendo el método establecido en el apéndice B de la NOM-030-SSA2-1999 para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial.¹²⁰ Se determinó con el paciente sentado con un buen soporte para la espalda, con el brazo descubierto y flexionado a la altura del corazón. Se utilizó un esfigmomanómetro mercurial, el observador se situó de manera que podía ver el menisco de la columna de mercurio, se colocó el brazalete situando el mango sobre la arteria humeral y mientras se palpa la arteria humeral se infla rápidamente el mango hasta que el pulso desaparece a fin de determinar por palpación la tensión arterial sistólica (TAS), se desinfla nuevamente el mango y se coloca la cápsula del estetoscopio sobre la arteria humeral, se infla rápidamente el mango 30 o 40 mm Hg por arriba del nivel palpatorio de la presión sistólica, se desinfla a una velocidad de 2 mm Hg/seg. La aparición del primer ruido de Korotkoff marca el nivel de la tensión arterial sistólica (TAS) y el quinto la tensión arterial diastólica (TAD).

Técnicas bioquímicas:

Se tomaron muestras sanguíneas en tubos al vacío con heparina como anticoagulante y sin anticoagulante, entre 7-9 am con un ayuno de 8 horas, se llevó a cabo la determinación de biometría hemática completa, química sanguínea de 8 elementos (glucosa, urea, creatinina, triglicéridos, albúmina, ácido úrico, colesterol y lipoproteínas de alta densidad [HDLc]), como pruebas de tamizaje clínico. Además se midieron las concentraciones séricas de vitamina E (α -tocoferol) y de vitamina C (ácido ascórbico). El estrés se cuantificó a través de las técnicas de peroxidación lipídica, antioxidantes totales, enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y daño al ADN.

Biometría hemática

La biometría hemática se realizó en el equipo automatizado Culter Beckman, obteniendo la concentración de hemoglobina (valores de corte: hombres, 12.17-17.26 g/dL, mujeres, 11.48-16.25 g/dL); la determinación del hematocrito (valores de corte:

hombres, 38-52%, mujeres, 36-51%), y la cuenta de leucocitos (puntos de corte: 3500-10650/ mm³).

Química sanguínea

La determinación de glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, albúmina, colesterol, triglicéridos y HDL se llevó a cabo con un analizador automatizado Junior Selectra. Específicamente los niveles de glucosa se midieron por el método de glucosa oxidasa (valores de corte: 63–120 mg/dL), los niveles de urea se cuantificaron por el método de ureasa de Berthelot (valores de corte: 9.5–47 mg/dL), los niveles de creatinina por el método de Jaffe sin desproteinización (valores de corte: hombres, 0.3–1.5 mg/dL; mujeres, 0.3–1.3 mg/dL), y los niveles de ácido úrico por el método colorimétrico de la uricasa (valores de corte: hombres, 2.9–8.88 mg/dL; mujeres, 2.5–8.7 mg/dL). Los niveles de albúmina se midieron por la técnica de verde de bromocresol (3.23–4.03 g/dL).

El colesterol fue analizado usando la técnica de CHOD-PAP (valores de corte: 168–200 mg/dL), y los triglicéridos por la técnica de GPO-Trinder (valores de corte: 89-190 mg/dL), para la medición de las HDL se utilizó la misma técnica de colesterol después de realizar la precipitación de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad utilizando una solución ácido fosfotústico/cloruro de magnesio (valores de corte: 42-77 mg/dL).

Todos los reactivos utilizados en las determinaciones bioquímicas fueron obtenidos de Randox Laboratories, Ltd. (Crumlin, Co, Antrim, UK). Los valores de corte fueron determinados en el laboratorio de investigación clínica gerontológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Zaragoza, en la ciudad de México.¹⁵⁹

Lipoperóxidos plasmáticos (LPO)

Se utilizó la técnica de TBARS descrita por Jentzsch y cols. (1996).¹⁶⁰ Durante la prueba, la muestra es tratada con ácido tiobarbitúrico (TBA) a pH bajo; en la reacción una molécula de malondialdehído (MDA) reacciona con dos moléculas de TBA con la producción de un pigmento rosa cuya absorción máxima es a los 532-535 nm. Para la protección por auto-oxidación de la muestra se agregó butiril-hidroxitolueno (BHT).

A 400 μ L de plasma o al estándar de MDA (0.2-4 μ mol/L) preparado por hidrólisis del 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) se le agregaron 400 μ L de ácido ortofosfórico (0.2 mol/L) (Sigma Chemical Co.) y 50 μ L de BHT (2mmol/L) (Sigma Chemical Co.) mol/L), en tubos de 12x72. Posteriormente se adicionaron 50 μ L de el reactivo de TBA (0.11mol/L in 0.1 mol/L NaOH) (Fluka Chem., Buchs, Switzerland) y se agitaron en vortex por 10 segundos. Los tubos cerrados se calentaron por 45 minutos a 90° C en un baño de agua y para detener la reacción los tubos se colocaron en hielo por 5 min. Para extraer los lipoperóxidos se utilizaron 1000 μ L de butanol (Sigma Chemical Co.) en cada tubo y 100 μ L de solución de NaCl saturada se agitó vigorosamente durante 30 segundos, se centrifugaron a 5000 rpm durante 1 min y se transfirieron 600 μ L de la fase de butanol a una celda y para finalmente leer a 535 nm y a 572 nm y corregir la absorción utilizando un espectrofotómetro UV (Shimadzu, Columbia, MD USA).

La concentración ácido tióbarbitúrico que reaccionó se calcula por medio de la curva estándar de MDA, obtenida a partir del estándar de TMP.

Antioxidantes Totales (AT)

Se trata de una prueba en donde se combinan la peroxidasa (metamioglobina) con peróxido de hidrógeno y ABTS (2,2'- azido-di (etilbenzotiazolin sulfanato) para dar como resultado la formación del radical catión ABTS⁺. Este radical presenta una coloración verde-azulada, la presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración siendo ésta proporcional a la concentración de antioxidantes. La cinética de la reacción se mide a 600 nm (Randox Laboratories, Ltd.).

Se pipetearon 20 μ L de plasma y se adicionó 1 mL de cromógeno. Después de mezclar perfectamente se prosiguió a la lectura de la absorbancia inicial A_1 a una longitud de onda de 600 nm. Se adicionaron 200 μ L de sustrato, y posterior a la mezcla se empezó a cronometrar simultáneamente para leer la absorbancia A_2 al cabo de exactamente tres minutos.

Brecha antioxidante (GAP)

Se calculó utilizando la concentración de antioxidantes totales, albúmina y ácido úrico donde todas deben estar expresadas en $\mu\text{mol/L}$, para posteriormente utilizar la siguiente fórmula:

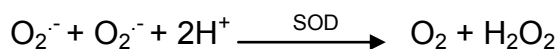
$$\text{GAP} = \text{AT} - [(\text{albúmina} \times 0.69) + (\text{ácido úrico})]$$

Razón SOD/GPx

Se calculó realizando el cociente entre los valores de la actividad de ambas enzimas expresadas en UI/L.

Superóxido dismutasa

El método empleado es la reacción entre la xantina y la xantina oxidasa para generar radicales superóxido que reaccionan con sales de p-iodonitrotetrazolio (INT) para producir el colorante rojo formazán. La actividad de la SOD se mide por el grado de inhibición de la reacción. La cinética se mide a 505 nm (Randox Laboratories, Ltd.).



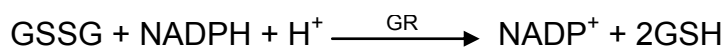
Se tomaron 500 μL de la muestra de sangre total y se lavaron los eritrocitos 3 veces con 3 mL de solución de NaCl al 0.9%, centrifugando durante 10 min. a 3000 rpm después de cada lavado.

Al botón de eritrocitos lavados, se adicionaron 2 mL de agua bidestilada fría, se mezcló y dejó reposar durante 15 minutos a 4°C. Del lisado se tomaron 100 μL y se diluyeron con 1.9 mL de tampón fosfato 0.01 mmol/L pH 7.0. Se pipetearon 0.05mL de la muestra diluida y se adicionaron 1.7 mL de sustrato mixto (xantina 0.05 mmol/L, INT 0.025

mmol/L). Después de mezclar perfectamente se agregaron 0.25 mL de xantin oxidasa (xantin oxidasa 0.94 mmol/L). Se mezcló y se registró la absorbancia A_1 al cabo de 30 segundos y se empezó a cronometrar el tiempo simultáneamente para leer la absorbancia final A_2 al cabo de 3 min.

Glutación Peroxidasa

La GPx cataliza la oxidación del glutati6n (GSH) por el hidróxido de cumeno. El glutati6n oxidado (GSSG) en presencia de glutati6n reductasa (GR) y NADPH es convertido inmediatamente en su forma reducida con una oxidaci6n concomitante de NADPH en $NADP^+$. Se mide la disminuci6n de la absorci6n a 340nm (Randox Laboratories, Ltd.)



Se diluyeron 50 μL de sangre entera heparinizada en 1 mL de soluci6n diluyente, provista por Randox; se incub6 durante 5 min. para posteriormente a6adir 1 mL de reactivo de Drabkin a doble concentraci6n. Las muestras se analizaron en los siguientes 20 min despu6s de la adici6n del reactivo de Drabkin.

Para el ensayo, se colocaron 20 μL de la muestra diluida, 1 mL de reactivo (glutati6n 4 mmol/L, glutati6n reductasa ≥ 0.5 U/L y NADPH 0.34mmol/L) y 40 μL de (hidroper6xido de cumeno 0.18 mmol/L).

Se mezcl6 y ley6 la absorbancia inicial de la muestra y del reactivo blanco al cabo de un minuto y se empez6 a cronometrar simultáneamente para leer de nuevo al cabo de 1 y 2 min.

Electroforesis Unicelular alcalina

La técnica de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa se realizó acorde a Singh (1988).¹⁶¹

Se prepararon laminillas en portaobjetos esmerilados a los cuales se les colocó una capa de 120µl de agarosa regular (0.75% disuelta en PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2}) hasta que solidificaron. A continuación cada muestra de sangre de 10µl se mezcló con 75 µl de agarosa bajo punto de fusión (0.5% disuelta en PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2}) y se colocó sobre los portaobjetos preparados con la capa anterior, una vez solidificada la mezcla se agregó otra capa de 75µl de agarosa de bajo punto de fusión. Finalmente las laminillas se sumergieron en solución fresca de lisis fría (1% lauril sarcosianato de sodio, 2.5M NaCl, 100mM Na_2 EDTA, 10mM Tris-HCl pH 10, 1% tritón X-100 y 10% DMSO se añadieron a la solución recién preparada) y se colocaron a 4°C por lo menos una hora.

Posteriormente las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis, la cual contenía un amortiguador pH 13 (1mM Na_2 EDTA, 300mM NaOH) que cubría totalmente las laminillas permitiendo que el ADN se desenrollara por 20 minutos, después se ajustó la fuente de poder a 25 volts y 300 miliámpers para efectuar la electroforesis por 20 minutos (es importante señalar que los pasos anteriores se realizaron protegidos de la luz). Una vez apagada la fuente de poder se retiraron cuidadosamente la laminillas de la cámara de electroforesis y se lavaron tres veces con amortiguador de neutralización (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) durante 5 minutos.

Se escurrieron las laminillas del exceso de amortiguador y se colocaron por 5 minutos en metanol absoluto, se dejaron secar al aire y posteriormente se tiñeron con 50µl de bromuro de etidio 1x (1mL de "stock" 10x [1mg/10mL] con 9mL de H_2O) cubriendo cuidadosamente con un cubreobjeto, para su observación al microscopio de fluorescencia.

Las laminillas se observaron al microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2

microscope (Nikon, Japan) con un filtro de excitación de 515-560nm utilizando un aumento de 40X. Finalmente con un ocular graduado y calibrado, se midió el diámetro del núcleo y la longitud de la estela del cometa de 100 células.

El control positivo se realizó con 200µL de sangre total en 1mL de solución de Hanks (libre de Ca^{++} , Mg^{++}) que contenía 200µM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por 30 minutos, sumergida en agua fría. Al final del periodo de tratamiento se eliminó el sobrenadante y el botón celular se utilizó para realizar la prueba.

La migración fue calculada como la diferencia entre la longitud de las estelas de los cometas y diámetro del núcleo (Figura VIII.2.).

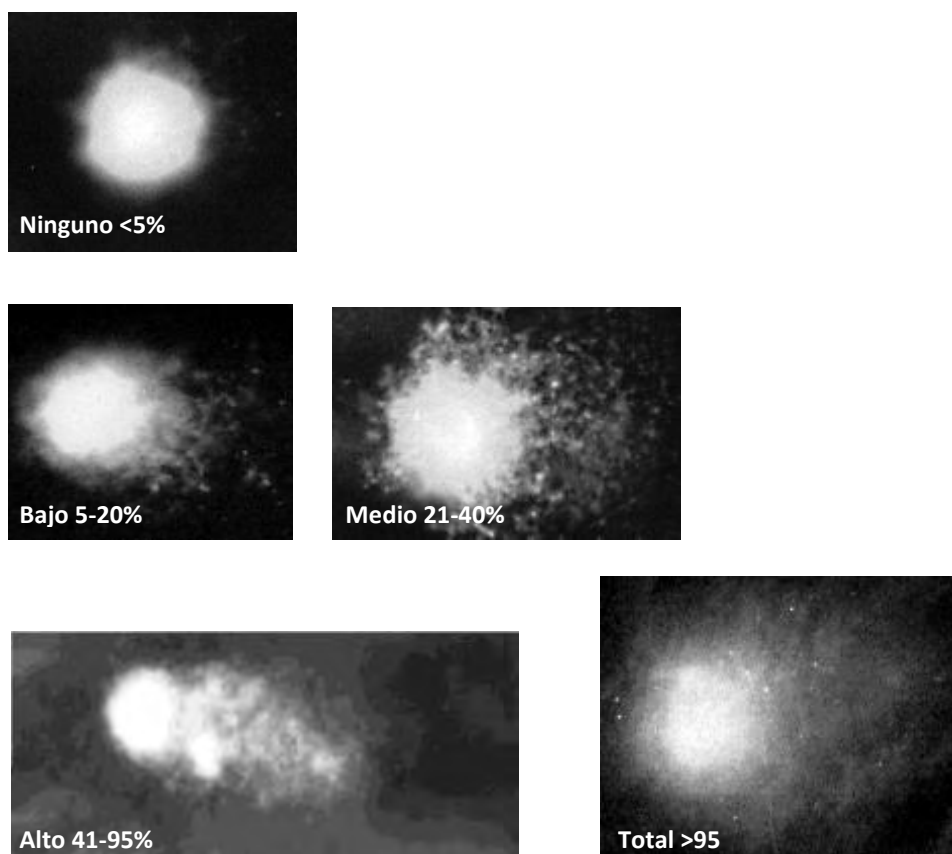


Figura VIII.2 Criterios de evaluación para clasificar el daño al ADN.

Vitamina C

El ácido ascórbico del plasma se estabilizó inmediatamente con igual cantidad de ácido metafosfórico al 10% (p/vol). Posteriormente se centrifugó la muestra a 3000rpm por 10min a 4°C para remover el precipitado, el sobrenadante se congeló a -80°C en tubos ámbar. La concentración de ácido ascórbico se realizó por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) con un detector electroquímico utilizando la técnica descrita por (Lee et al., 1982).¹⁶²

Para tal efecto, se preparó el cromatógrafo con una columna μ Bondapak C₁₈ de 3.9 x 300 mm y un tamaño de partícula irregular de 10 μ además de una fase móvil de buffer de acetatos pH 4 y se dejó estabilizar junto con el detector electroquímico utilizando un potencial de +0.7 V.

La muestra se descongeló y se tomaron 200 μ L a los cuales se les agregaron 50 μ L de hidrobromuro de 3,4-dihidroxibenzilamina como estándar interno y se colocaron en viales en el automuestreador con sistema de refrigeración Peltier (manteniendo la temperatura en 5°C), el cual inyectó 30 μ L de la mezcla, para obtener el cromatograma y la concentración de ácido ascórbico.

Para conocer la concentración de vitamina C se realizó una curva de calibración, utilizando un estándar de ácido ascórbico.

Vitamina E

El alfa-tocoferol fue cuantificado en plasma sanguíneo por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) utilizando un detector ultravioleta a 325nm y siguiendo la técnica descrita por Bieri (Bieri et al., 1979).¹⁶³

El cromatógrafo utilizó con una columna C₁₈ de 3.0cm de longitud y un tamaño de partícula de 3 μ m además de una precolumna holder guarda-pak con inserto nova-pak C₁₈ y una fase móvil de buffer de metanol-agua (94.5:5.5).

Para analizar la muestra se tomaron 300µL y se le adicionaron 300µL de etanol que contenía 0.3µg de retinil acetato como estándar interno, la mezcla se agitó en vortex y se le adicionaron 600µL de hexano se agitó y se centrifugó a 1500rpm durante 5min posteriormente se extrajeron 500µL de la fase orgánica la cual se evaporó con una corriente de nitrógeno, finalmente se adicionaron 250µL de etanol y se colocó en el automuestreador Peltier manteniendo la temperatura de la muestra en 5°C e inyectar 50µL para obtener la concentración de vitamina E.

Para conocer la concentración de vitamina E se realizó una curva de calibración, utilizando un estándar de alfa-tocoferol.

VIII.5 Diseño estadístico

Los datos obtenidos se analizaron a través de estadística descriptiva de los datos cuantitativos (promedios, error estándar y desviación estándar), como prueba de comparación se utilizó análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) y como prueba Pos Hoc la prueba de Dunett, con un 95% de confianza, donde los grupos de tratamiento se compararon con el grupo placebo que fue el control. Así mismo se determinaron las frecuencias y porcentajes de las variables cualitativas y se analizaron las diferencias a través de la prueba Ji cuadrada (χ^2) con un nivel de confianza de 95%. Para la determinación de riesgos se calculó la razón de momios (RM) a través de análisis univariado, estableciendo como riesgo cuando la $RM > 1$, significancia estadística cuando $p < 0.05$ y el intervalo de confianza no incluyó el 1. Para realizar el cálculo de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS V.10.0.

IX. RESULTADOS

IX.1 Características bioquímicas.

Los parámetros bioquímicos de ambos grupos se mantuvieron dentro de los valores de referencia antes y después de la intervención, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (Cuadro IX.1 y IX.2).

IX.2 Concentraciones de Vitamina C.

Al comparar las concentraciones promedio de ácido ascórbico de los adultos mayores de la zona rural antes y después del tratamiento se observó en el grupo Tx0 una disminución en la concentración de ácido ascórbico a los seis meses de suplementación, retornando a la línea base después de doce meses de administración del placebo ($p < 0.05$). En los grupos con terapia antioxidante tampoco se observaron cambios significativos después de seis meses de intervención, sin embargo después de 1 año de administración de las vitaminas en el grupo Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E) aumento su concentración en un 32% y en el grupo Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E) un 79% con una diferencia estadísticamente significativa (Cuadro IX.3 y Figura IX.1).

Respecto a los adultos mayores del área urbana mostraron un aumento estadísticamente significativo en ambos tratamientos después de seis y doce meses de intervención (Cuadro IX.4 y Figura IX.1).

IX.3 Concentraciones de Vitamina E.

Con respecto a las concentraciones promedio del alfa tocoferol de los adultos mayores de la zona rural se observó un incremento significativo después de 12 meses en los grupos con tratamiento antioxidante en comparación con el grupo placebo ($p < 0.05$). En

el caso de la zona urbana la concentración plasmática de vitamina E aumentó de manera significativa después de 6 meses de intervención en los grupos con tratamiento en comparación con el grupo placebo, aunque sólo se mantuvo alta dicha concentración a los 12 meses de tratamiento en el grupo con el Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E) (Cuadro IX.3 y IX.4, Figura IX.2).

IX.4 Marcadores de estrés oxidativo.

En ambos grupos (área rural y urbana) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de lipoperóxidos entre los tratamientos Tx0, Tx1 y Tx2 después de seis y doce meses de tratamiento (Cuadro IX.5, IX.6).

Con relación a los niveles de antioxidantes totales en los adultos mayores del área rural no se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos después de la suplementación antioxidante ($p \geq 0.05$). En el caso de los adultos mayores del área urbana se observó un incremento de los AT después de seis meses de tratamiento en los grupos con terapia antioxidante aunque no fue estadísticamente significativa, sin embargo, dicha tendencia no se mantuvo a los doce meses de tratamiento (Cuadro IX.6).

Respecto a la actividad de la enzima SOD en el área rural después de seis y doce meses de intervención tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos con ningún tratamiento ($p > 0.05$) (Cuadro IX.5, IX.6).

Con relación a la actividad de la enzima GPx en los ancianos del área rural después de seis y doce meses de tratamiento, se observó un aumento en los grupos Tx1 y Tx2, sin embargo sólo el grupo Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E) dicha diferencia fue estadísticamente significativa. (Cuadro IX.5). En el caso de los ancianos del área urbana la actividad enzimática de la GPx mostró incrementos estadísticamente significativos con los tratamientos Tx1 y Tx2 después de seis meses de intervención, comportamiento que se mantuvo después de un año (Cuadros IX.6 y Figura IX.3).

Al analizar la relación SOD/GPx se observó una disminución en el tratamiento Tx1 y Tx2 con respecto al grupo placebo en ambos grupos (área rural y urbana) después de 12 meses de intervención antioxidante, sin embargo dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Cuadro IX.5, IX.6). Al respecto el único grupo que mostró una significancia limítrofe ($p=0.07$) fue el Tx2 del área urbana a los 12 meses.

Respecto a los valores de la brecha antioxidante GAP, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos y tratamientos a los 6 y 12 meses (Cuadro IX.5 y 6).

IX.5 Daño oxidativo al ADN.

Al analizar los promedios de migración de daño al ADN en relación al tipo de tratamiento de los adultos mayores del área rural, se encontró que el promedio de migración que presentó el grupo Tx0 aumentó después de seis y doce meses de tratamiento con una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.01$); en los grupos con tratamiento Tx1 y Tx2 se observó una disminución del promedio de migración antes y después del mismo ($p<0.01$). En el caso de los adultos mayores del área urbana se observó un comportamiento similar, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Cuadro IX.7y Figura IX.4).

IX.6 Grado de estrés oxidativo.

Al analizar el porcentaje del grado de EOx que presentaron los adultos mayores de ambos lugares de residencia se observó que en el área rural después de seis meses de intervención el EOx se incrementó en los tres grupos, pero en el grupo Tx0 mostró un incremento en el porcentaje de EOx moderado (pre-intervención 4%, seis meses 32% y 12 meses 24%), sin embargo dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura IX.5).

En el caso del área urbana podemos observar que inicialmente los adultos mayores presentaban estrés oxidativo severo en todos los tratamientos, del cual sólo con el Tx2 mostró un resultado significativo desde los seis meses. Así mismo se encontró incremento en el porcentaje del estrés oxidativo leve de un 18% hasta un 73% en el Tx0 y de un 23% al 73% en el Tx1 (Figura IX.6).

IX.7 Indicadores de carga alostática.

Al relacionar la carga alostática con la presencia de estrés oxidativo en el área rural después de un año de tratamiento antioxidante observamos que aumenta en los tres grupos sin que esta diferencia sea estadísticamente significativa (Cuadro IX.8, Anexo 2).

Respecto a la zona urbana se observa en el grupo Tx1 un incremento en el EOx después de 1 año de tratamiento a un puntaje alto de carga alostática de un 24% a un 50%; en el caso del grupo Tx2 los porcentajes de EOx en relación al puntaje de la carga alostática se mantienen, sin embargo los resultados obtenidos para el grupo Tx0 mostraron un aumento del 78% el cual fue estadísticamente significativo (Cuadro IX.9).

Cuadro IX.1. Características bioquímicas en adultos mayores del área rural en relación al tratamiento

	Tx0 n=25			Tx1 n=25			Tx2 n=25		
	Basal	6 meses	12 meses	Basal	6 meses	12 meses	Basal	6 meses	12 meses
Edad (años)	67±1.5			63±1.9			64±6		
Glucosa (mg/dL)	110±7	106±3	90±2	97±7	100±3	86±2	101±7	99±3	85±2
Urea (mg/dL)	33±2	33±2	36±1	35±2	40±2	41±2	31±2	34±2	35±2
Creatinina (mg/dL)	0.9±0.03	1.0±0.04	1.0±0.04	0.9±0.03	1.0±0.04	0.9±0.05	1.0±0.03	0.9±0.04	1.0±0.05
Ácido úrico (mg/dL)	5.5±0.3	5.5±0.3	4.4±0.2	5.4±0.3	5.7±0.3	4.2±0.2	5.0±0.3	5.2±0.3	4.1±0.2
Colesterol (mg/dL)	207±7	212±8	195±9	214±7	226±9	217±10	202±7	222±9	205±10
Triglicéridos (mg/dL)	158±12	164±16	140±17	155±13	197±17	174±18	144±13	177±17	176±18
HDL (mg/dL)	49±2	51±2	51±2	51±2	51±3	56±2	54±3	52±3	54±2
Albumina (g/dL)	4.5±0.08	4.3±0.33	4.7±0.08	4.3±0.09	4.9±0.35	4.7±0.09	4.5±0.09	4.1±0.37	4.7±0.09
Hemoglobina (g/dL)									
Mujeres	15.1±0.3	14.7±0.2	14.5±0.3	14.9±0.4	14.5±0.3	14.3±0.4	14.3±0.4	14.2±0.3	14.3±0.4
Hombres	16.5±0.6	16.1±0.5	15.8±0.5	16.0±0.7	14.9±0.5	15.6±0.6	15.6±0.7	14.8±0.5	15.7±0.6
Hematocrito (%)									
Mujeres	46.5±0.9	45.6±0.7	44.4±0.9	45.9±1.0	45.1±0.8	43.8±0.2	44.2±1.0	44.2±0.8	43.8±1.0
Hombres	50.5±1.7	50.8±1.4	48.7±1.8	48.4±1.9	47.0±1.6	47.8±2.0	47.2±1.9	46.4±1.6	49.4±2.0
Leucocitos/mm ³	6317±288	5900±336	6317±284	5695±317	6179±370	6053±312	6353±309	6050±360	6150±304

Los datos se presentan en promedios ± Error estándar. ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 p>0.05
Tx0 vs. Tx2 p>0.05

Tx0 (Placebo), Tx1(500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Cuadro IX.2. Características bioquímicas en adultos mayores del área urbana en relación al tratamiento

	Tx0 n=22			Tx1 n=22			Tx2 n=22		
	Basal	6 meses	12 meses	Basal	6 meses	12 meses	Basal	6 meses	12 meses
Edad (años)	66±1.6			67±1.3			67±1.2		
Glucosa (mg/dL)	104±9	97±4	100±5	97±9	96±4	95±5	118±8	106±4	101±5
Urea (mg/dL)	35±2	39±1	34±2	35±2	40±1	30±2	35±2	40±1	28±2
Creatinina (mg/dL)	0.8±0.05	1.0±0.04	0.9±0.04	0.9±0.04	1.0±0.04	1.0±0.04	0.9±0.05	0.9±0.04	0.9±0.04
Ácido úrico (mg/dL)	4.6±0.3	5.2±0.3	5.7±0.3	4.6±0.3	5.5±0.3	5.5±0.2	4.5±0.3	5.3±0.3	5.2±0.3
Colesterol (mg/dL)	227±10	232±10	227±8	209±9	219±9	222±8	220±9	225±9	220±8
Triglicéridos (mg/dL)	202±25	185±24	195±27	177±24	162±23	173±26	215±23	180±22	210±25
HDL (mg/dL)	58±3	57±3	54±4	54±3	53±3	56±3	56±3	52±3	55±3
Albumina (g/dL)	4.5±0.11	4.7±0.07	4.5±0.11	4.4±0.11	4.7±0.08	4.2±0.11	4.7±0.10	4.8±0.07	4.6±0.09
Hemoglobina (g/dL)									
Mujeres	14.4±0.3	12.8±0.7	14.8±0.3	14.5±0.3	14.6±0.7	14.9±0.3	14.8±0.3	14.8±0.7	15.2±0.3
Hombres	16.1±1.3	15.0±0.7	15.7±1.1	16.2±0.8	15.8±0.5	17.3±0.7	15.6±1.1	16.06±0.6	16.4±0.9
Hematocrito (%)									
Mujeres	44.6±0.9	42.9±0.8	45.5±1.0	44.2±1.0	42.2±0.9	45.4±1.1	45.3±0.9	45.2±0.8	46.8±1.0
Hombres	49.5±3.8	45.5±2.5	48.5±4.02	49.4±2.4	48.6±1.6	54.6±2.5	48.0±3.1	49.0±2.0	51.3±3.2
Leucocitos/mm ³	5532±268	5500±338	6300±348	5753±268	5705±338	5832±348	6553±268	5826±338	6395±348

Los datos se presentan en promedios ± Error estándar. ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 p>0.05

Tx0 vs. Tx2 p>0.05

Tx0 (Placebo), Tx1(500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Cuadro IX.3. Concentración de vitamina C y de vitamina E en adultos mayores del área rural en relación al tipo de tratamiento.

	Pre-intervención	Seis meses de intervención	Doce meses de intervención
Rural			
Vitamina C (µmol/L)			
Tx0	49.1 ± 5.2	33.5 ± 4.9	45.2 ± 5.8
Tx1	47.2 ± 5.8	47.9 ± 5.5	62.2 ± 9.5 (+ 32%)
Tx2	50.5 ± 5.4	49.6 ± 5.1	90.4 ± 8.9 (+ 79%)
Vitamina E (µmol/L)			
Tx0	25.5 ± 2.7	17.1 ± 1.9	24.2 ± 4.4
Tx1	30.9 ± 3.0	30.0 ± 2.2	44.6 ± 4.9 (+ 44%)
Tx0	26.1 ± 3.1	30.3 ± 2.2	44.9 ± 5.0 (+ 72%)

Los datos se presentan en promedios ± error estándar

ANOVA de medidas repetidas. Pos hoc Dunett .

Vitamina C: Tx0 vs. Tx1 p=0.173; Tx0 vs. Tx2 p=0.001

Vitamina E: Tx0 vs. Tx1 p = 0.0001; Tx0 vs. Tx2 p= 0.001.

Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Cuadro IX.4. Concentración de vitamina C y de vitamina E en adultos mayores del área urbana en relación al tipo de tratamiento.

	Pre-intervención	Seis meses de intervención	Doce meses de intervención
Urbana			
Vitamina C ($\mu\text{mol/L}$)			
Tx0	40.0 \pm 4.4	50.8 \pm 7.7	62.0 \pm 8.0
Tx1	49.0 \pm 4.4	81.9 \pm 7.7 (+ 67%)	84.5 \pm 8.0 (+ 72%)
Tx2	40.9 \pm 4.2	78.1 \pm 7.4 (+ 91%)	86.7 \pm 7.6 (+ 112%)
Vitamina E ($\mu\text{mol/L}$)			
Tx0	25.8 \pm 3.5	21.4 \pm 2.6	20.4 \pm 2.0
Tx1	28.3 \pm 3.0	32.3 \pm 2.2(+ 14%)	27.5 \pm 1.8
Tx2	27.0 \pm 2.9	32.7 \pm 2.1(+ 21%)	30.4 \pm 1.7 (+ 13%)

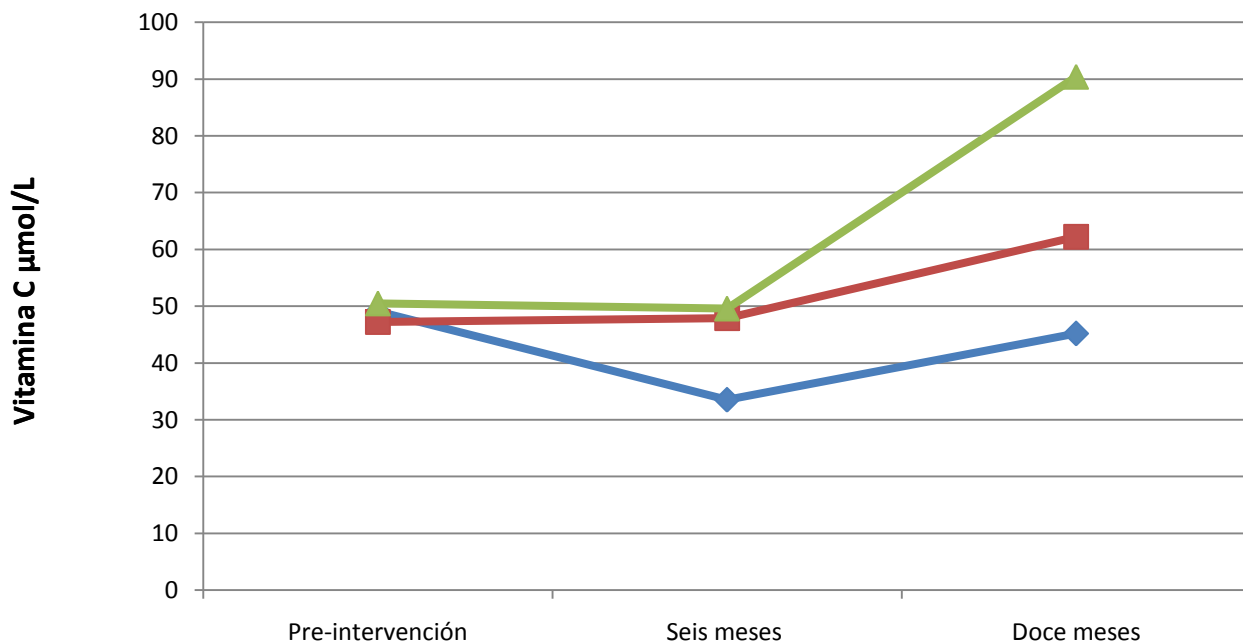
Los datos se presentan en promedios \pm EE

ANOVA de medidas repetidas. Pos hoc Dunett .

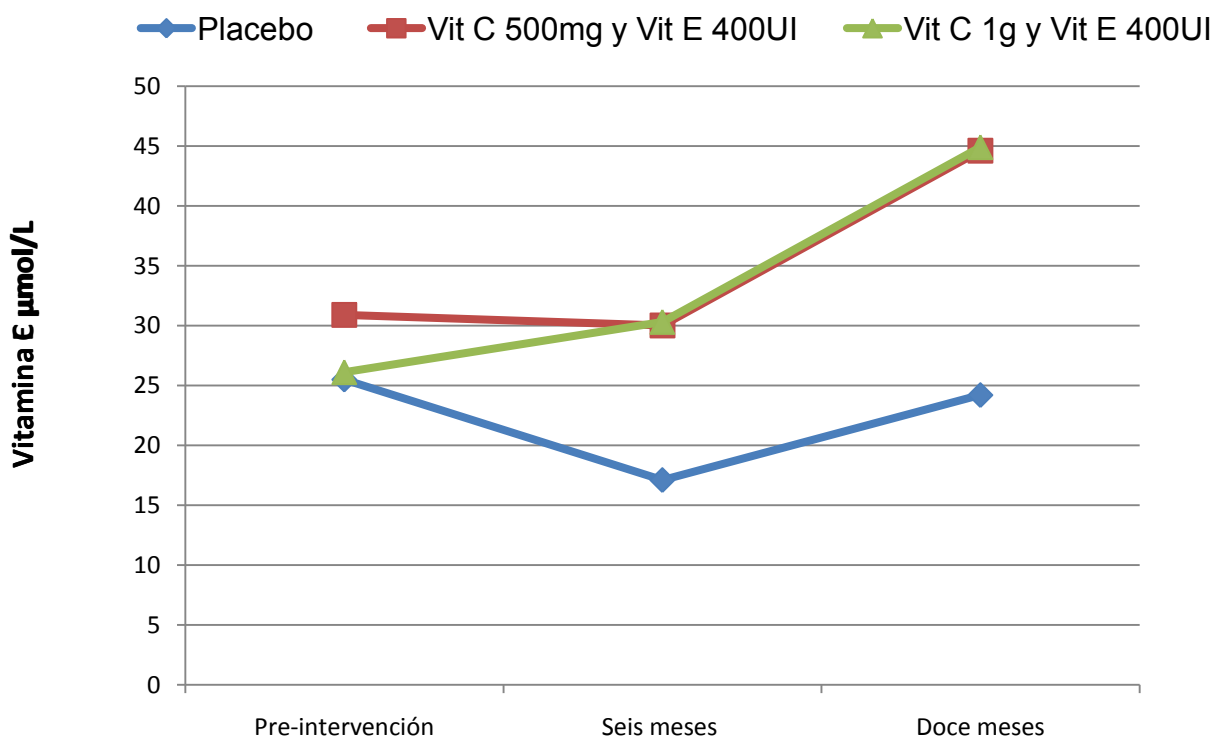
Vitamina C: Tx0 vs. Tx1 p=0.006; Tx0 vs. Tx 2 p=0.020

Vitamina E: Tx0 vs. Tx1 p= 0.014; Tx0 vs. Tx2 p= 0.006.

Tx0 (Placebo), Tx1(500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

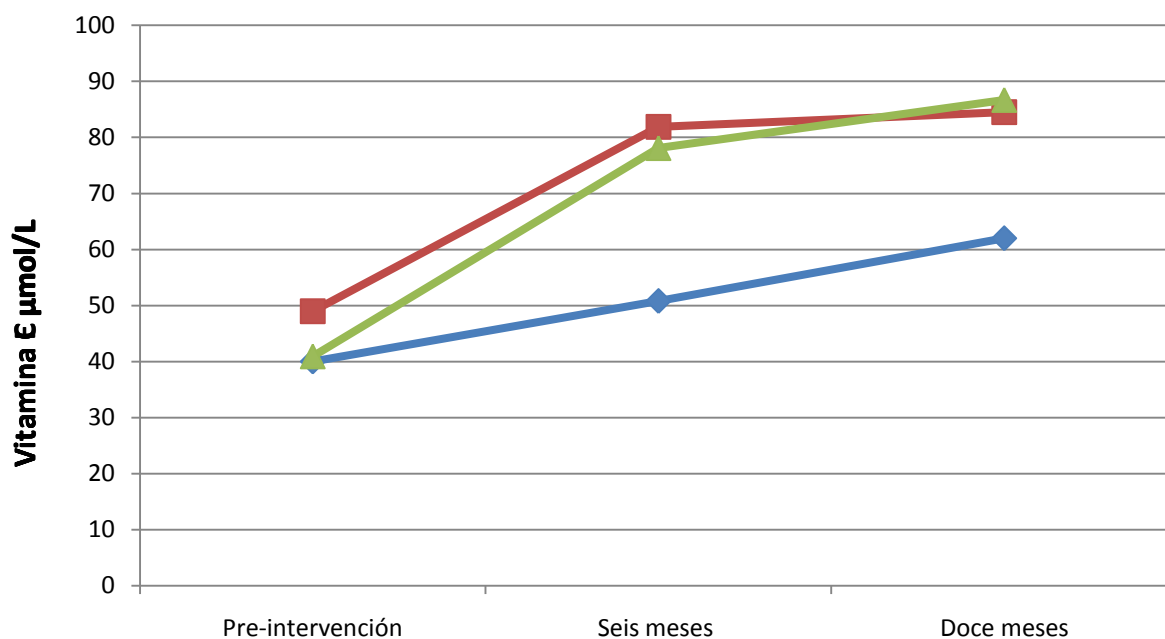


ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx2 p= 0.001

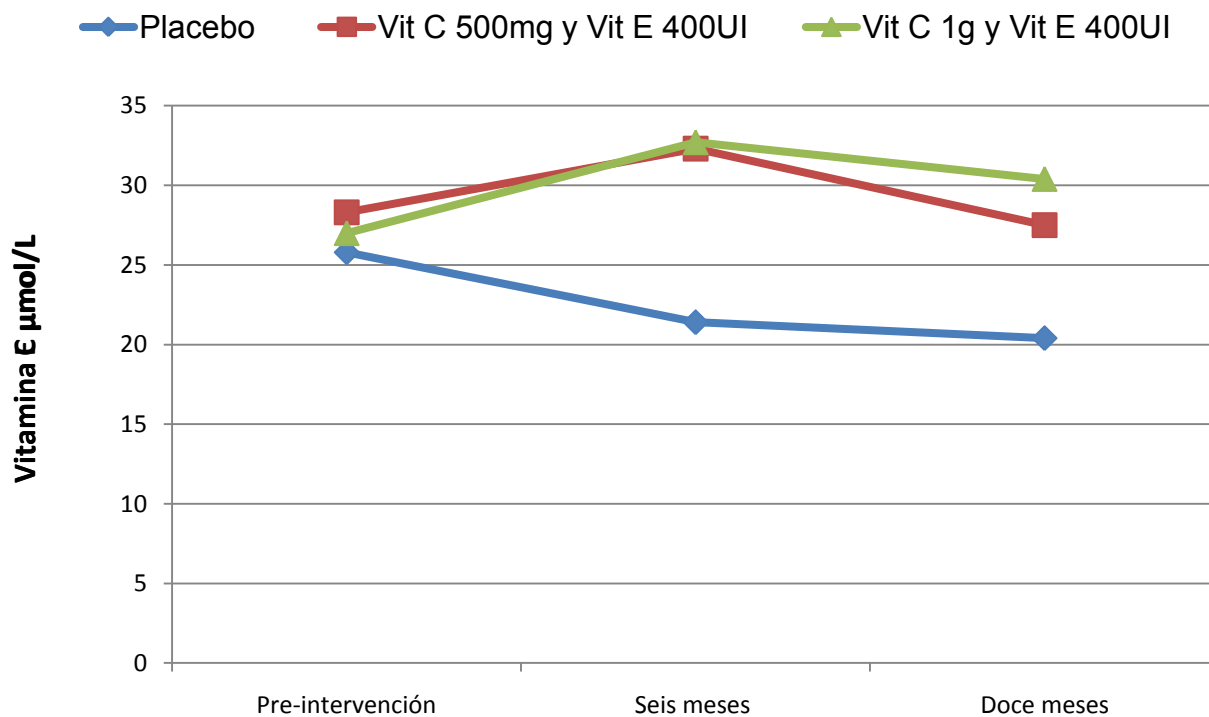


ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 p= 0.0001; Tx0 vs. Tx2 p= 0.001
 Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Figura IX.1. Concentración de ácido ascórbico y alfa tocoferol pre-intervención y después del tratamiento en la población rural.



ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 $p=0,006$; Tx0 vs. Tx2 $p=0,020$



ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 $p=0,014$; Tx0 vs. Tx2 $p=0,006$
 Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Figura IX.2. Concentración de ácido ascórbico y alfa tocoferol pre-intervención y después del tratamiento en la población urbana.

Cuadro IX.5. Marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores del área rural en relación al tipo de tratamiento.

	Pre-intervención	Seis meses de intervención	Doce meses de intervención
Lipoperóxidos (umol/L)			
Tx0	0.28 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.02
Tx1	0.31 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.02
Tx2	0.32 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.19 ± 0.02
Antioxidantes Totales (mmol/L)			
Tx0	1.13 ± 0.05	0.86 ± 0.04	0.82 ± 0.05
Tx1	1.09 ± 0.05	0.90 ± 0.04	0.91 ± 0.05
Tx2	1.17 ± 0.06	0.87 ± 0.04	0.89 ± 0.05
Superóxido dismutasa (UI/L)			
Tx0	170.4 ±1.2	173.0 ±1.4	173.1 ±1.2
Tx1	170.5 ±1.3	171.5 ±1.6	171.5 ±1.3
Tx2	170.8 ±1.2	173.0 ±1.5	172.0 ±1.2
Glutación peroxidasa (UI/L)			
Tx0	7876 ± 330	8843 ± 601	8422 ± 698
Tx1	7176 ± 368	9312 ± 673	10726 ± 780
Tx2	8429 ± 344	8515 ± 627	*12941 ± 727
Razón SOD/GPx			
Tx0	0.023 ± 0.001	0.022 ± 0.002	0.022 ± 0.002
Tx1	0.024 ± 0.001	0.022 ± 0.003	0.019 ± 0.002
Tx2	0.021 ± 0.001	0.024 ± 0.002	0.015 ± 0.002
GAP (µmol/L)			
Tx0	310 ± 50	151 ± 32	177 ± 29
Tx1	324 ± 54	196 ± 36	198 ± 31
Tx2	350 ± 57	128 ± 36	187 ± 33

Los datos se presentan en promedios ± EE. GAP=Brecha de antioxidantes plásmáticos

ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. *GPx: Tx0 vs. Tx2 p=0.011.

Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

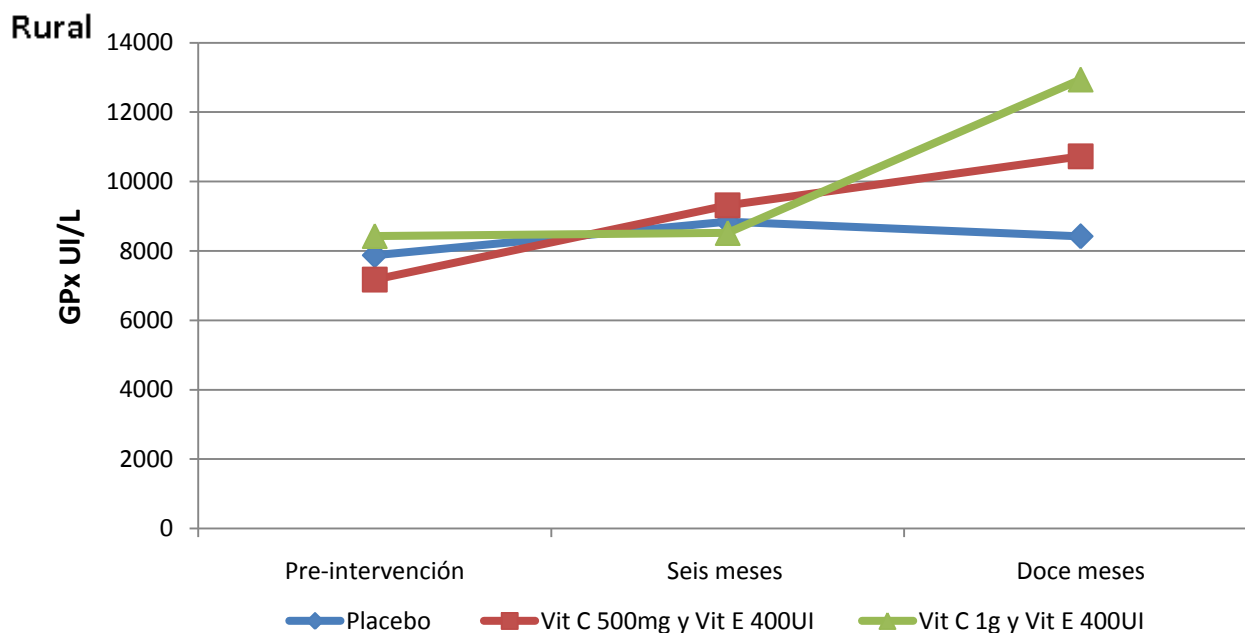
Cuadro IX.6. Marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores del área urbana en relación al tipo de tratamiento.

	Pre-intervención	Seis meses de intervención	Doce meses de intervención
Lipoperóxidos (umol/L)			
Tx0	0.31 ± 0.018	0.28 ± 0.022	0.27 ± 0.017
Tx1	0.30 ± 0.018	0.28 ± 0.020	0.28 ± 0.017
Tx2	0.31 ± 0.017	0.26 ± 0.019	0.26 ± 0.015
Antioxidantes Totales (mmol/L)			
Tx0	0.87 ± 0.04	0.82 ± 0.03	0.76 ± 0.05
Tx1	0.85 ± 0.03	0.91 ± 0.03	0.82 ± 0.05
Tx2	0.83 ± 0.03	0.93 ± 0.03	0.77 ± 0.05
Superóxido dismutasa (UI/L)			
Tx0	166.6 ± 2.3	171.6 ± 2.0	175.7 ± 1.8
Tx1	166.0 ± 2.3	172.4 ± 1.9	174.7 ± 1.7
Tx2	166.1 ± 2.2	172.8 ± 1.8	173.9 ± 1.7
Glutación peroxidasa (UI/L)			
Tx0	5242 ± 489	6484 ± 588	9252 ± 808
Tx1	5387 ± 477	7588 ± 574	12695 ± 789
Tx2	5832 ± 466	8408 ± 561	12659 ± 771
Razón SOD/GPx			
Tx0	0.034 ± 0.003	0.029 ± 0.003	0.018 ± 0.001
Tx1	0.033 ± 0.003	0.026 ± 0.003	0.014 ± 0.001
Tx2	0.032 ± 0.003	0.022 ± 0.003	0.015 ± 0.001
GAP(μmol/L)			
Tx0	144 ± 39	148 ± 44	173 ± 42
Tx1	131 ± 45	202 ± 50	238 ± 49
Tx2	143 ± 33	202 ± 37	265 ± 35

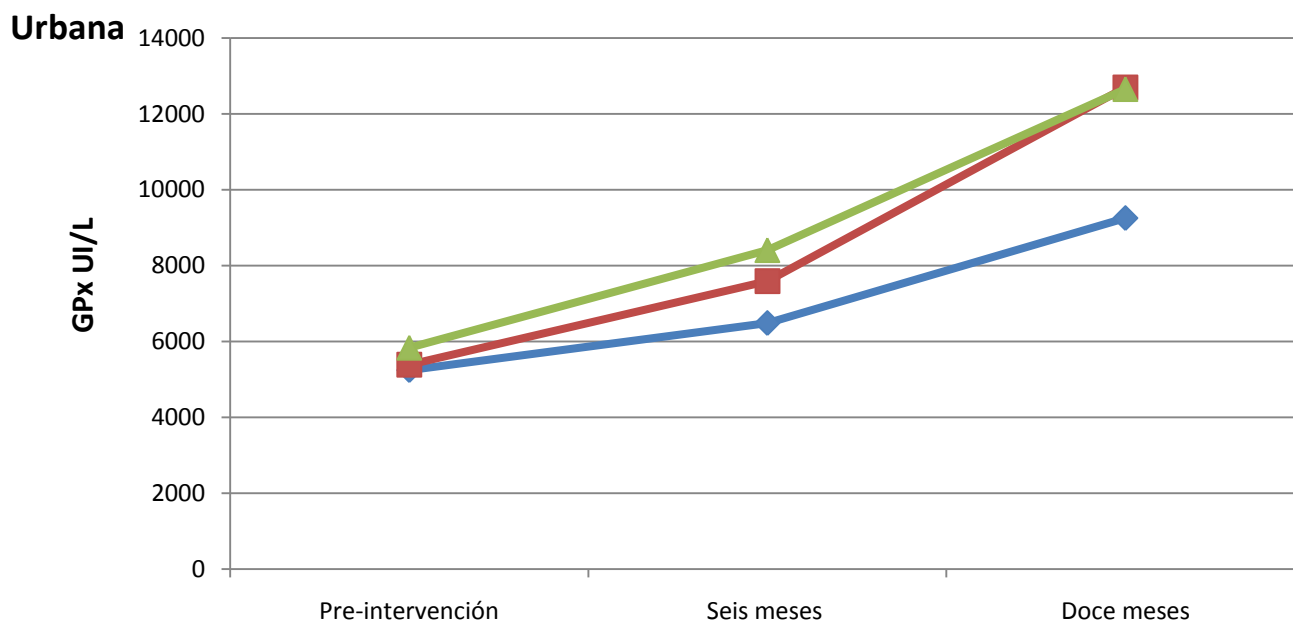
Los datos se presentan en promedios ± EE. GAP=Brecha de antioxidantes plásmáticos

ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunnett. GPx: Tx0 vs. Tx1 p=0.021. Tx0 vs. Tx2 p=0.003.

Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)



ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx2 p= 0.011



ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 p= 0.021; Tx0 vs. Tx2 p= 0.003.
 Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Figura IX.3. Actividad de la Enzima Glutación peroxidasa pre-intervención y después del tratamiento

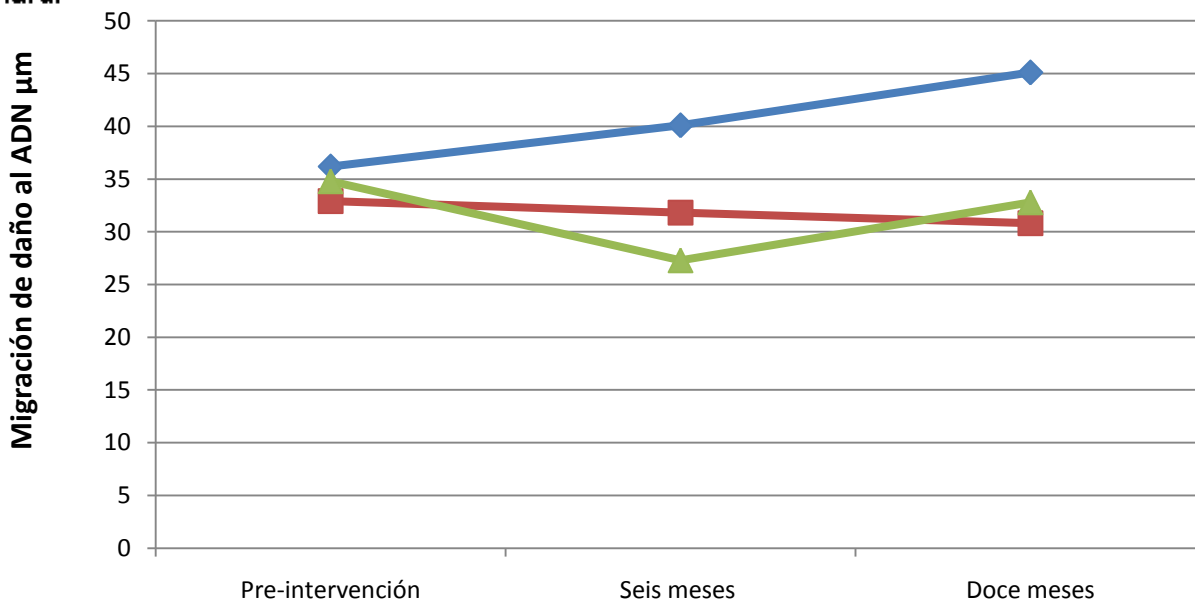
Cuadro IX.7. Valores promedio de migración de ADN en adultos mayores en relación al lugar de residencia.

	Pre-intervención	Seis meses de intervención	Doce meses de intervención
Rural			
Promedio de migración (μm)			
Tx0	36.2 \pm 4.8	40.1 \pm 3.3	45.1 \pm 3.4
Tx1	32.9 \pm 4.9	31.8 \pm 3.4	30.8 \pm 3.5
Tx2	34.8 \pm 4.8	27.3 \pm 3.3	32.2 \pm 3.4
Urbana			
Promedio de migración (μm)			
Tx0	32.8 \pm 2.9	37.7 \pm 3.7	35.7 \pm 3.4
Tx1	31.0 \pm 3.0	29.3 \pm 3.9	27.8 \pm 3.4
Tx2	34.5 \pm 2.9	31.5 \pm 3.7	27.8 \pm 3.3

Los datos se presentan en promedios \pm EE.

ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Rural Tx0 vs. Tx1 $p=0.01$ Tx0 vs. Tx2 $p=0.016$; Urbana $p \geq 0.05$
Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

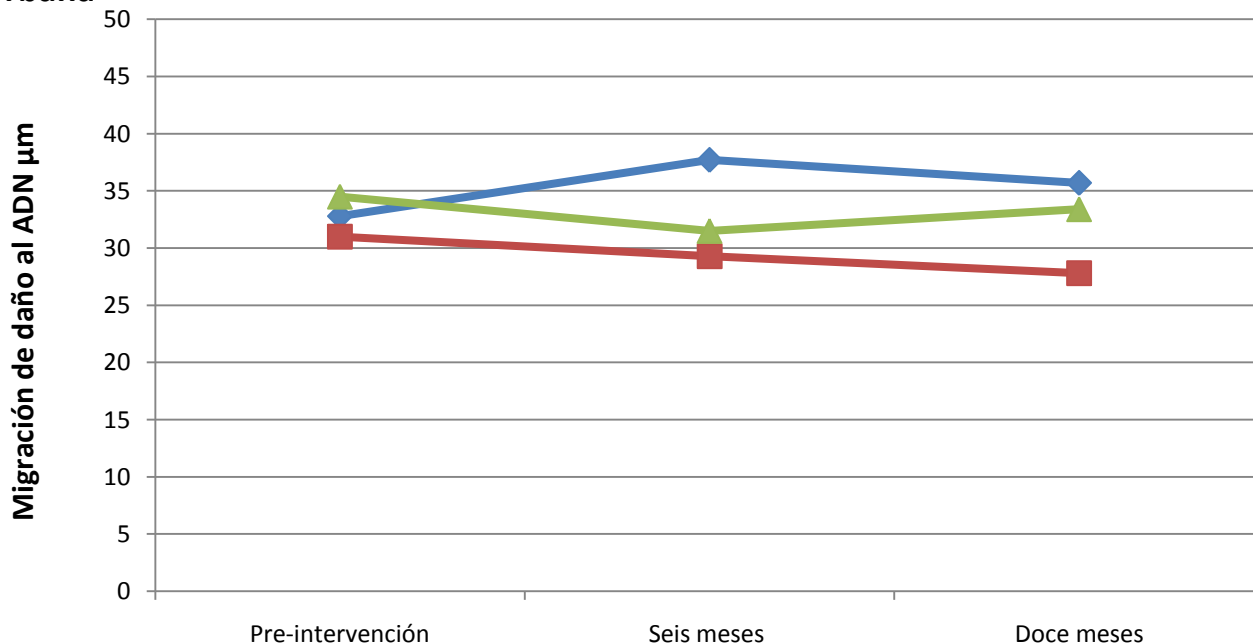
Rural



ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 p= 0.01; Tx0 vs.Tx2 p= 0.016.

◆ Placebo ■ Vit C 500mg y Vit E 400UI ▲ Vit C 1g y Vit E 400UI

Urbana

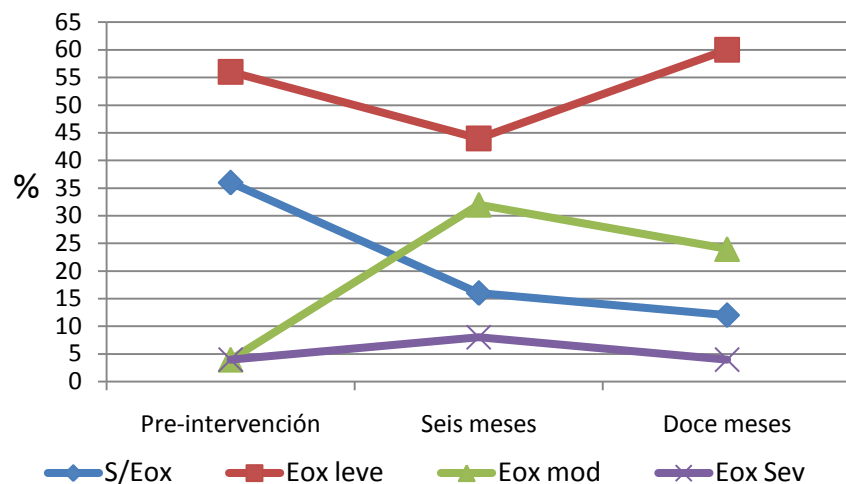


ANOVA de medidas repetidas Pos hoc Dunett. Tx0 vs. Tx1 y Tx0 vs.Tx2 p≥ 0.05.

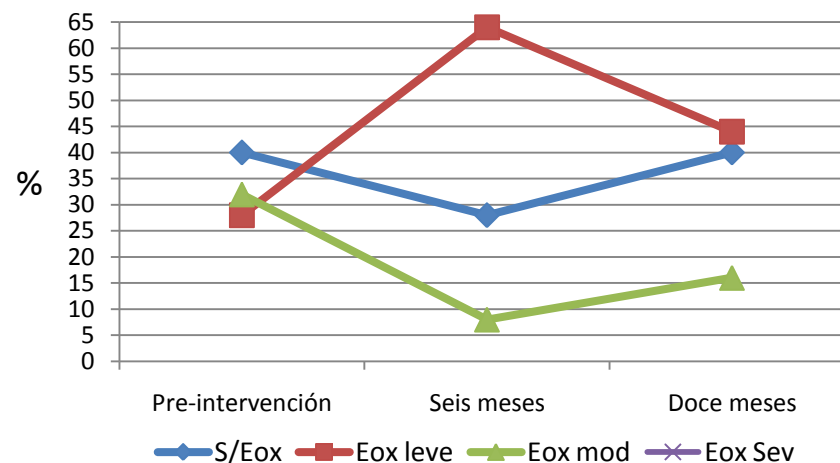
Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Figura IX.4. Promedio de migración de daño al ADN pre-intervención y después del tratamiento.

A. Tx0 (Placebo)



B. Tx 1 (500 mg VITAMINA C Y 400UI VITAMINA E)



C. Tx2 (1000 mg VITAMINA C Y 400UI VITAMINA E)

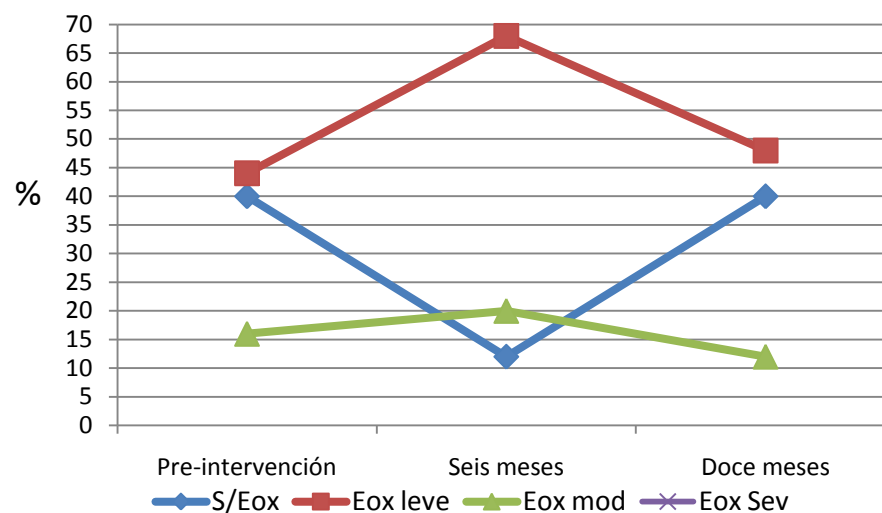
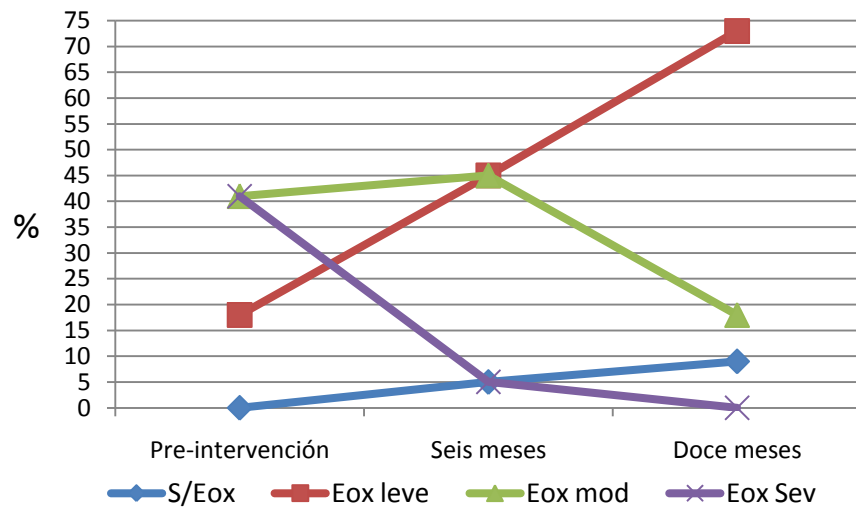
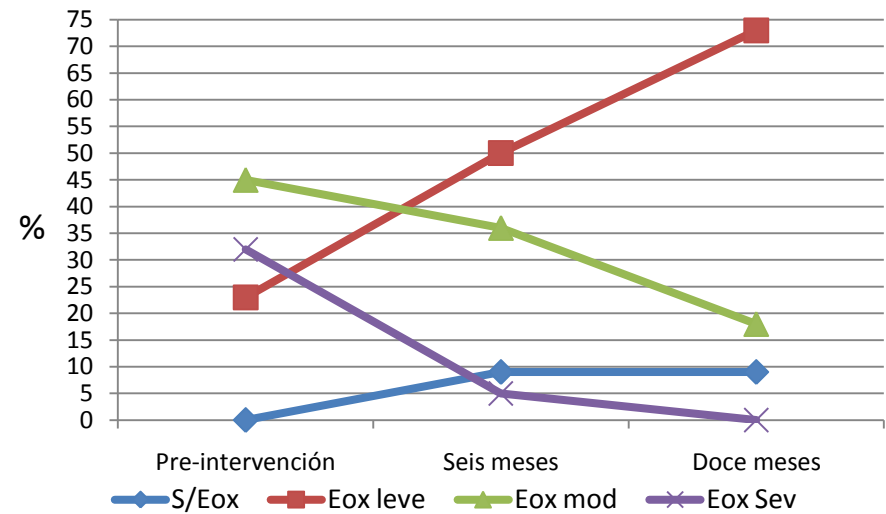


Figura IX.5. Estrés oxidativo en adultos mayores del área rural en relación al tipo y tiempo de tratamiento y al lugar de residencia. A. Tx0. Se observó un aumento del EOX moderado de 4% a 32 y 24% después de la intervención. B. Tx1. Se observó una disminución del EOX moderado de un 32% a un 8% y un 16% después de seis meses y doce meses de intervención respectivamente. C. Tx2. Se observó una ligera disminución del EOX moderado después de 12 meses de intervención de 16 a 12%.

A. Tx0 (PLACEBO)



B. Tx1 (500 mg VITAMINA C Y 400UI VITAMINA E)



C. Tx2 (1000 mg VITAMINA C Y 400UI VITAMINA E)

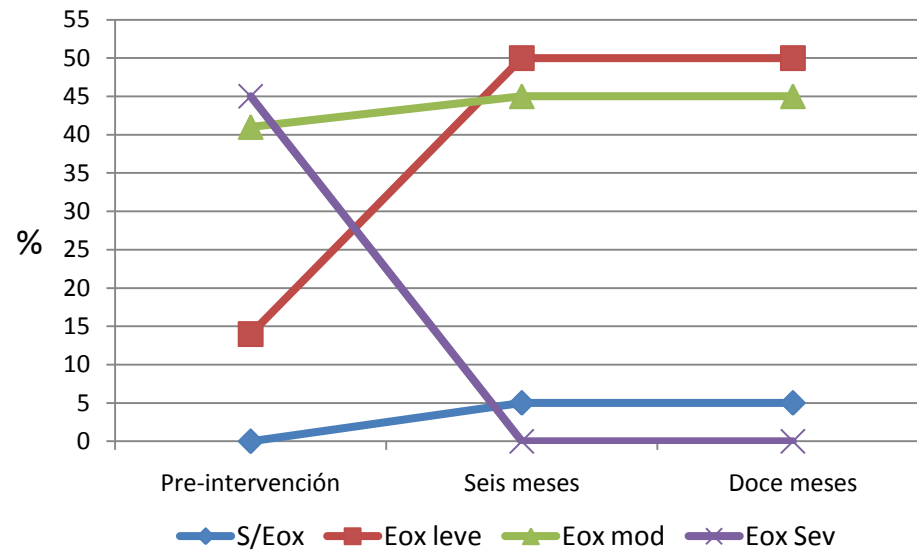


Figura IX.6. Estrés oxidativo en adultos mayores del área urbana en relación al tipo y tiempo de tratamiento y al lugar de residencia. A. Tx0. Se observó un aumento del Eox leve de 18% a 45 y 73% después de la intervención y disminuyó el Eox severo. B. Tx1. Se observó el mismo comportamiento en el aumento del Eox leve y disminución en el Eox severo. C. Tx2. Se observó una disminución del Eox severo después de 12 meses de intervención en un 45%.

Cuadro IX.8. Frecuencia y carga alostática como factor de riesgo para estrés oxidativo en adultos mayores de la zona rural.

	Pre-intervención		12 meses de intervención	
	EOx (+)	EOX (-)	EOx (+)	EOX (-)
Rural				
Carga alostática Tx0				
Puntaje 0-2	2(100%)	20(87%)	6(86%)	11(61%)
Puntaje 3-5	0(0%)	3(13%)	1(14%)	7(39%)
Carga alostática TX1				
Puntaje 0-2	7(88%)	15(88%)	1(25%)	15(71%)
Puntaje 3-5	1(12%)	2(12%)	3(75%)	6(29%)
Carga alostática Tx2				
Puntaje 0-2	3(75%)	17(81%)	2(67%)	14(64%)
Puntaje 3-5	1(25%)	4(19%)	1(33%)	8(36%)

Los datos se presentan en frecuencias y porcentajes.

Se realizó el cálculo de riesgo utilizando razón de momios con un intervalo de confianza al 95% y como prueba de comparación χ^2 al 95%. Y ningún valor fue estadísticamente significativo.

Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

Cuadro IX.9. Frecuencia y carga alostática como factor de riesgo para estrés oxidativo en adultos mayores de la zona urbana.

	Pre-intervención		12 meses de intervención	
	EOx (+)	EOX (-)	EOx (+)	EOX (-)
Urbana				
Carga alostática Tx0				
Puntaje 0-2	14(78%)	3(75%)	0(0%)	16(89%)*
Puntaje 3-5	4(22%)	1(25%)	4(100%)	2(11%)
Carga alostática Tx1				
Puntaje 0-2	13(76%)	5(100%)	2(50%)	13(72%)
Puntaje 3-5	4(24%)	0(0%)	2(50%)	5(28%)
Carga alostática Tx2				
Puntaje 0-2	16(84%)	2(67%)	8(80%)	12(100%)
Puntaje 3-5	3(16%)	1(33%)	2(20%)	0(0%)

Los datos se presentan en frecuencias y porcentajes.

Se realizó el cálculo de riesgo utilizando razón de momios con un intervalo de confianza al 95% y como prueba de comparación X^2 al 95%. * RM= 24 IC_{95%}= 1.13-1149 p= 0.02.

Tx0 (Placebo), Tx1 (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E), Tx2 (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E)

X. DISCUSIÓN

Desde 1956 Denna Harman propuso que los radicales libres tenían una influencia sobre el proceso de envejecimiento, en la actualidad se tiene el conocimiento que el desbalance a favor de los RL respecto a la eficiencia del sistema antioxidante da como resultado el denominado estrés oxidativo (EOx), cuyo desequilibrio bioquímico se vincula con múltiples enfermedades crónico-degenerativas, como la diabetes mellitus, cáncer, artritis reumatoide, aterosclerosis, cataratas, enfermedad de Alzheimer, entre otros. Asimismo la exposición a niveles altos de contaminación ambiental aumenta el riesgo de presentar daño oxidativo al ADN y disminución de la actividad antioxidante, ya que la mezcla de contaminantes ambientales induce la generación de radicales libres, incrementando el estrés oxidativo; aunado a esto los adultos mayores enfrentan el proceso de adaptación para mantener la homeostasis durante el envejecimiento, por lo que el EOx se ve incrementado.

Entre los marcadores de estrés oxidativo relativos al envejecimiento humano destacan los niveles de lipoperóxidos, la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, así como la actividad antioxidante total y el daño al ADN en adultos. En este sentido, dichos indicadores se ven influenciados por la carga alostática a la que se ve sometido el individuo determinada en gran medida por los factores ambientales que influyen significativamente en los estilos de vida.

Por lo anterior se han propuesto algunas alternativas para prevenir o controlar el EOx vinculado con el envejecimiento, considerando el riesgo que representa las enfermedades crónico-degenerativas, entre los que destacan la indicación de suplementos antioxidantes. En este sentido, algunos estudios han demostrado efectos benéficos de la administración de vitaminas antioxidantes de forma aislada o combinada,^{105-109,121,127,130,157} aunque también se ha reportado que la administración crónica de vitaminas antioxidantes no tienen ningún beneficio

biológico consistente,^{104,110,122,126,141} de ahí la importancia de continuar con esta línea de investigación, ya que los resultados son controversiales, además de la necesidad de dilucidar su efecto biológico en ancianos con diferentes estilos de vida vinculados al lugar de residencia.

La cuantificación de vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina E son marcadores bioquímicos que permiten evaluar el sistema antioxidante secundario de tal manera que los valores obtenidos describen a cada una de las poblaciones estudiadas (rural y urbana) y reflejan si estos suplementos: i) se han consumido regularmente, ii) se han absorbido en el tracto-gastrointestinal iii) si se han incrementado significativamente a nivel plasmático y 4) si han sido de utilidad para contrarrestar los niveles altos de lipoperóxidos y mantener un equilibrio en el sistema antioxidante.

Al respecto, en el área urbana los resultados de las concentraciones de vitamina C mostraron un incremento significativo después de 6 y 12 meses de intervención con Tx1 (500mg), asimismo con el Tx2 (1000mg), el incremento fue de un 40% superior con respecto al logrado con el Tx1. En el área rural también se observó un incremento significativo con el Tx1 y Tx2 después de doce meses de intervención, lo cual es congruente con lo reportado sobre la biodisponibilidad del ácido ascórbico ya que al incrementar las dosis orales se observan aumentos relativamente más pequeños en la concentración plasmática. En este sentido, se ha demostrado que la biodisponibilidad del ácido ascórbico no es lineal y es un proceso saturable por lo que la curva dosis-concentración sigue un comportamiento de tipo sigmoide.^{76, 108}

En el caso de la vitamina E se consideró adecuado administrar 400UI diarias en los Tx1 y Tx2, ya que es la dosis más frecuentemente prescrita en la prevención y tratamiento de enfermedades crónico degenerativas.^{85,151,157} En el área urbana las concentraciones plasmáticas no cambiaron en forma significativa con el Tx1 y con

el Tx2 el incremento fue menos del 15% a los 12 meses, en contraste el área rural se observó un incremento significativo con el Tx1 como el Tx2, al respecto se ha reportado que la absorción de esta vitamina se encuentra en un rango entre el 20 y el 40%, por lo que no es muy eficiente, además de que es necesaria la presencia de sales biliares para la formación de micelas que permitan su absorción, de ahí que las diferencias plasmáticas podrían ser explicadas por los diferentes tipos de alimentación del área rural y urbana. En este sentido, nuestros hallazgos son con lo reportado por Huang *et al.* (2002).¹⁴⁸

Los resultados anteriores nos sugieren que ambas vitaminas se consumieron regularmente, se absorbieron y están contribuyendo por diversos mecanismos a mantener el equilibrio homeostático, atrapando al ión superóxido y regenerando al alfa-tocoferol evitando así la oxidación de las membranas.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵

En este sentido, se ha demostrado el efecto sinérgico del ácido ascórbico y del α -tocoferol sobre la disminución en la oxidación de lípidos, lo cual ha impulsado en los últimos años a la administración de suplementos vitamínicos a diferentes poblaciones de estudio con el fin de disminuir el estrés oxidativo;¹⁶⁴⁻¹⁷⁰ Sin embargo, nuestros resultados en ambas áreas no mostraron una disminución significativa en las concentraciones de lipoperóxidos plasmáticos, aún con la administración de 1000mg de ácido ascórbico y 400UI de alfa tocoferol, este resultado es contrario a lo reportado por Mc Call y Frei (1999)¹⁰⁴ donde con la administración de 1000mg de vitamina C y 800UI de vitamina E obtuvieron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de lipoperoxidación y lo reportado por Mosca *et al.* (1997)¹²³ que demostró que una dosis de 1000mg de vitamina C junto con 800UI de vitamina E en pacientes con enfermedad cardiovascular reduce la susceptibilidad de oxidación de las LDL,¹²³ asimismo Butterfield, *et al.* (2002)¹⁷¹ después de la administración de 1g de vitamina C y 400UI de vitamina E reportó la prevención en la oxidación de las lipoproteínas en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado en dos meta-análisis que la suplementación de altas concentraciones de vitamina E puede incrementar el riesgo de muerte en los pacientes que los consumen por periodos prolongados, el primero publicado en 2005 tomó en consideración la revisión de 19 ensayos clínicos, 9 donde sólo se administraba vitamina E y 10 la administración combinada con otras vitaminas y minerales desde 1966 hasta agosto de 2004 y donde el rango de concentración utilizado de alfa-tocoferol fue de 16.5 a 2000UI con promedio de 400UI encontrando un riesgo relativo de 1.04(IC_{95%}=1.01-1.07 p=0.035). Asimismo el análisis dosis-respuesta mostró un incremento en el riesgo de mortalidad en concentraciones por arriba de 150UI.¹¹⁷

El segundo meta-análisis se publicó en 2007 e incluyó referencias desde 1945 hasta octubre de 2005 eligiendo 68 ensayos clínicos donde se administraran beta-carotenos, vitamina A, vitamina C, vitamina E o selenio de forma individual o combinada, encontrando un incremento en el riesgo de mortalidad en los pacientes con un consumo de vitamina E (RM= 1.06 IC_{95%}=1.02-1.10); además de indicar que probablemente la vitamina C este exenta de aumentar ese riesgo ya que no se demostró dicho efecto.¹⁷³

De lo anterior, se ha señalado que las propiedades anticoagulantes de la vitamina E probablemente intervienen con los mecanismos de coagulación dependientes de vitamina K de ahí que es posible que aumente el riesgo de un hemorragia vascular cerebral en los pacientes que son administrados con dicha vitamina. Asimismo, se ha relacionado la participación de EOX sobre la patogénesis de las enfermedades crónico degenerativas, aunque también puede ser la consecuencia de condiciones patológicas, ya que al eliminar a las ERO's de nuestro organismo se puede interferir con los mecanismos esenciales de defensa como en el caso de la apoptosis, fagocitosis y destoxificación.¹¹⁷

La publicación de ambos meta-análisis provocó diversas respuestas por otros investigadores que causaron aún mayor controversia, de ahí que aunque el mecanismo sobre el efecto negativo de los suplementos antioxidantes sobre la mortalidad aún se desconoce, la prescripción de altas dosis de vitamina E para la prevención y/o control de enfermedades crónico degenerativas durante el envejecimiento no estaría justificada, ya que potencialmente puede ser peligroso y su eficacia es aún incierta.

Dentro de esta controversia esta el posible efecto pro-oxidante que se ha reportado para ambas vitaminas, en el caso del alfa tocoferol un aumento en la lipoperoxidación y daño al ADN al formarse otro radical de vitamina E que al no ser regenerado finalmente produce peróxido de hidrógeno en cultivos celulares; y en el caso del ácido ascórbico por medio de la reacción de Fenton se pueden producir radicales hidroxilo o alcoxilo en la reducción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos lipídicos.^{111-114,116,118,172}

En el mismo sentido, algunos estudios han demostrado que el estar sometido a ambientes estresantes provoca un desgaste de la capacidad antioxidante total, y que por lo tanto se hace necesario un consumo mayor de antioxidantes.^{48,174} Sin embargo, se ha reportado que la suplementación de las vitaminas mencionadas no ejercen ningún efecto significativo sobre los AT, ya que su aportación es muy limitada; se sabe que el ácido ascórbico puede aportar a que el plasma tenga una actividad antioxidante en un intervalo donde no se aporte ninguna actividad hasta un 24% como máximo y el alfa-tocoferol apenas entre un 5 a 10%.¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ Por lo que el comportamiento de este marcador en ambas áreas después de seis y doce meses de administración antioxidante no mostró ningún cambio significativo en los dos tratamientos a evaluar. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio al no reflejarse en los valores de AT sugieren que no serían útiles para mejorarlos y contrarrestar el EOx en los adultos mayores de ambas áreas.

En lo que se refiere a la defensa enzimática antioxidante contra el daño oxidativo cuando el organismo se enfrenta a situaciones estresantes,¹⁷⁷ tenemos que la actividad de las enzima SOD en nuestros resultados para ambas áreas prácticamente se mantuvo sin cambios, lo que nos permite confirmar lo que algunos autores han señalado al considerar a la SOD como una enzima reguladora de ahí que no se reporten grandes variaciones en su actividad enzimática, aún suplementando con altas concentraciones de vitaminas antioxidantes.¹⁷⁸⁻¹⁷⁹

En el caso de la GPx nuestros resultados mostraron después de doce meses de tratamiento un incremento estadísticamente significativo para Tx2 del grupo de adultos mayores de la zona rural, en caso de la zona urbana los dos tratamientos con 500mg y 1000mg de vitamina C ambos con 400UI de vitamina E tuvieron un aumento significativo después de doce meses de intervención. En este sentido, nuestros resultados son congruentes con lo reportado por algunos autores respecto a que una suplementación antioxidante puede regular y aumentar la actividad de GPx, asimismo el realizar alguna actividad física moderada también parece incrementar la actividad de la misma.¹⁸⁰⁻¹⁸³

Para la relación SOD/GPx esta fue propuesta por De Haan y cols. (1995)¹⁷⁸ como un buen indicador de EOx debido a que permite tener una aproximación del dinamismo del sistema antioxidante celular partiendo del concepto teórico de que la SOD lleva a cabo la transformación del ión superóxido produciendo H_2O_2 y la GPx es la encargada de la conversión de ese compuesto en H_2O , por lo que la disminución relativa de GPx lleva un incremento de H_2O_2 , aún con actividad enzimática normal. Asimismo se ha demostrado que los cambios en la razón de estas enzimas, son un mejor indicador desde el punto de vista de sensibilidad a las especies reactivas de oxígeno, que los valores absolutos de ambas enzimas, ya que evalúa la actividad sinérgica de éstas en la destoxificación oxidativa. Como se puede observar en los resultados obtenidos en el área rural este equilibrio se

mantiene a lo largo de un año de tratamiento y no se observaron diferencias estadísticamente significativas, en el caso del área urbana prevalece el mismo comportamiento, sin embargo, se observa una tendencia a mantener un valor más bajo de esta relación enzimática para Tx2 en el mismo periodo de tratamiento ($p=0.07$), este resultado es debido a que los valores de GPx fueron mayores en el área urbana. Sin embargo, los valores encontrados en la actividad enzimática de GPx y por ende el de la razón SOD/GPx pueden parecer aislados ya que sólo este marcador fue el que aumentó. Asimismo, al analizar los resultados obtenidos podemos observar que el aumento también lo presenta el grupo placebo en un 19% y una disminución en los LPO para el área rural en el mismo grupo lo sugiere la influencia de un efecto placebo.

Al respecto, se ha demostrado que el efecto placebo ocurre por un mecanismo psicosomático que puede inducir efectos terapéuticos,¹⁸⁴⁻¹⁸⁵ de ahí la propuesta del posible efecto placebo de las vitaminas antioxidantes sobre el EOx. En este sentido, existen dos teorías: el condicionamiento y la expectativa. La primera propone que se presentan cambios corporales cuando el sujeto se expone a un estímulo que previamente conoce activando un proceso que da como resultado un cambio; en la segunda propuesta el cambio sobre los mecanismos corporales ocurre cuando el sujeto tiene altas expectativas de mejoría, en este caso en la respuesta farmacológica que puede dar un tratamiento.^{184,186} Además se ha reportado que un 30% de los sujetos responde al uso de placebos con una forma similar a la de la forma farmacéutica en algunos tratamientos,^{184-185,187} en el caso de los lipoperóxidos sólo se ha reportado su disminución en estudios de relajación física y mental producidos por la meditación, de ahí que existe una correlación positiva entre los niveles psicológicos de estrés y los niveles de cortisol y beta-endorfina^{184,188-194} por lo que en este caso el efecto placebo fue capaz de interactuar con el sistema neurobioquímico y disminuir los niveles LPO y aumentar la actividad de la enzima GPx de ahí que la motivación y la expectativa que tienen los adultos mayores del beneficio que puede proporcionar el consumo de

vitaminas antioxidantes es posible que sea la causa de estos cambios bioquímicos.

Respecto al daño oxidativo al ADN, se ha reportado que se incrementa con la edad y con la disminución de los AT.¹⁹⁵⁻¹⁹⁶ De ahí que se ha demostrado en estudios *in vitro* que el consumo de vitaminas antioxidantes es útil para proteger al ADN del daño oxidativo.¹⁹⁷ Pero en el caso de estudios en humanos los resultados son inconsistentes.^{104,198} En este sentido, al observar los resultados obtenidos, los valores promedio de migración de los adultos mayores del área rural mostraron una disminución en el daño oxidativo la cual fue estadísticamente significativa en ambos tratamientos después de 12 meses, no así para el área urbana en donde no se observó dicha diferencia; cabe aclarar que en ambas poblaciones se incrementó el daño oxidativo al ADN para el grupo placebo a los seis y doce meses de tratamiento siendo dicho incremento significativo sólo en el área rural.

Por otro lado, se encontró un incremento significativo de daño oxidativo al ADN (migración) en el grupo Tx0 del área rural por lo que al parecer la administración de vitaminas antioxidantes podría tener un efecto preventivo contra el daño al ADN en esta área, asimismo en el área urbana no se observó dicho efecto, debido probablemente a que los adultos mayores que viven en la ciudad de México están desarrollando el fenómeno denominado hormesis, que se caracteriza por una respuesta adaptativa (homeostática) ante la exposición de dosis bajas y constantes de agentes estresores.¹⁹⁹⁻²⁰⁰

Así mismo, con la finalidad de evaluar el EOx de manera más dinámica se tomaron los biomarcadores evaluados y se estratificaron para poder obtener un EOx en varios niveles, donde la situación más severa o de mayor riesgo es tener un puntaje entre 6 y 7 (EOx severo), lo que propiciaría una mayor oxidación a las biomoléculas. Bajo este enfoque los resultados obtenidos muestran inicialmente mayor EOx en el área urbana, por lo que los habitantes de la ciudad de México

tienen mayor EOx que los de la zona rural, resultados acordes con otro estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, donde se demostró que el ambiente urbano junto con los altos niveles de contaminación son un factor pro-oxidante en los adultos mayores,²⁰¹ de ahí que se esperaba que después de la administración de vitaminas antioxidantes el EOx disminuyera de manera significativa, sin embargo, no se encontró dicho efecto, sugiriendo que la administración de vitaminas antioxidantes no es suficiente para contrarrestar el estrés oxidativo en adultos mayores relativo a los estilos de vida y lugar de residencia.

Respecto a la carga alostática se demostró que sus indicadores representan un cúmulo de factores que propician una desregulación de múltiples sistemas fisiológicos vulnerando la salud. En este sentido, en el presente trabajo se evaluaron cinco componentes de la carga alostática que son lo que caracterizan al síndrome metabólico y que representan los factores de riesgo típicos para enfermedad cardiovascular y que además están asociados con el EOx, además se consideró el índice de masa corporal y la variable sedentarismo; al evaluar dichos marcadores de ambas áreas con respecto al tiempo y tipo de tratamiento sólo se observó una tendencia de la lipoproteínas de alta densidad a aumentar después de 12 meses de tratamiento antioxidantes en Tx2 siendo mayor en el área rural.

Nuestros hallazgos muestran que el área urbana presenta un mayor porcentaje de EOx y un mayor puntaje de carga alostática, lo cual implica mayor riesgo para enfermedades crónico-degenerativas, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y cáncer.

Finalmente, se analizaron los casos extremos de cada grupo con la finalidad de observar alguna tendencia que nos mostrará el efecto de las vitaminas antioxidantes sobre el EOx y su relación con la carga alostática después de haberse consumido por doce meses, en este caso los resultados fueron similares a

los datos promedio, de ahí que no se incluyeran en el apartado de resultados, dicho análisis se presenta en el anexo 2.

XI. CONCLUSIONES

❖ *Hipótesis*

- *Tomando en cuenta la influencia de la carga alostática sobre el EOX y daño al ADN, vinculada con el lugar de residencia suponemos que los adultos mayores del área urbana mostrarán una respuesta antioxidante menos eficiente que los del área rural ante la administración prolongada de α -tocoferol y ácido ascórbico.*

❖ *Conclusión*

- Nuestros hallazgos sugieren que el lugar de residencia no influye de manera significativa en la respuesta de la eficiencia antioxidante en los adultos mayores que recibieron tratamiento combinado de vitamina C y E durante 12 meses.
- La administración prolongada de altas dosis de vitaminas C (500 ó 1000 mg) y E (400UI) no son suficientes para prevenir o contrarrestar el estrés oxidativo y daño al ADN en adultos mayores relativo al lugar de residencia.
- Nuestros hallazgos sugieren que la administración prolongada de vitamina C y E pueden tener un efecto placebo sobre el estrés oxidativo y daño al ADN.

❖ *Hipótesis*

- *Considerando el enfoque teórico de la carga alostática, suponemos que los principales factores que influyen en la efectividad del α - tocoferol y ácido ascórbico serán lugar de residencia urbano, el sobrepeso y el sedentarismo.*

❖ *Conclusión*

- Nuestros hallazgos sugieren que la carga alostatica vinculada con el lugar de residencia no influye de manera significativa sobre la efectividad del α - tocoferol y ácido ascórbico consumidos por periodo prolongado para prevenir o contrarrestar el estrés oxidativo y daño al ADN.

XII. PERSPECTIVAS

- ❖ Es necesario incrementar el tamaño de la muestra para confirmar nuestros hallazgos.
- ❖ Es indispensable llevar a cabo estudios longitudinales de largo plazo, para desmitificar o reforzar la utilidad de las vitaminas antioxidantes con fines preventivos o terapéuticos para enfermedades crónico-degenerativas específicas.
- ❖ Es importante implementar técnicas que permitan llevar a cabo mediciones más precisas del estrés oxidativo y daño al ADN, tales como F-2 isoprostanos indicador de oxidación lipídica, proteínas carboniladas y 8,2deoxiguanosina como marcador de oxidación en la reparación del ADN.
- ❖ Es necesario medir todos los parámetros propuestos para evaluar la carga alostática, con la finalidad de tener resultados más claros con respecto al costo alostático en los adultos mayores de ambas áreas. Y su relación con el estrés oxidativo.
- ❖ Es conveniente difundir nuestros hallazgos con los clínicos y con la población en general para que no se indiquen o se consuman de manera generalizada e indiscriminada los suplementos antioxidantes, sin considerar los riesgos, estilos de vida y lugar de residencia.

XIII. REFERENCIAS

1. McEwen BS. Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840:33-44.
2. McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 2003; 43:2-15. Review.
3. Karlamangla AS, Singer BH, Seeman TE. Reduction in allostatic load in older adults is associated with lower all-cause mortality risk: MacArthur studies of successful aging. *Psychosom Med* 2006; 68:500-507.
4. McEwen SB. Allostatic Load, and the aging nervous system: Role of excitatory Amino Acids and Excitotoxicity. *Neurochem Res* 2000; 25:1219-1231.
5. Karlamangla AS, Singer BH, McEwen BS, Rowe JW, Seeman TE. Allostatic load as a predictor of functional decline. *MacArthur studies of successful aging. J Clin Epidemiol* 2002; 55:696-710.
6. McEwen BS. Interacting mediators of allostasis and allostatic load: towards an understanding of resilience in aging. *Metabolism* 2003; 52:10-16. Review.
7. Seeman ET, McEwen SB, Rowe WJ, Singer HB. Allostatic load as a marker of cumulative biological risk: MacArthur studies of successful aging. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:4770-4775.
8. Semsei I. On the nature of aging. *Mech Ageing Dev* 2000; 117:93-108.
9. Weinwert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol*. 2003; 95:1706-16. Review.
10. Rowe JW, Kahn RL. Human aging: usual and successful. *Science* 1987; 237:143-149.
11. Buchner DM, Wagner EH. Preventing frail health. *Clin Geriatr Med*. 1992; 8:1-17. Review.
12. Campbell AJ, Buchner DM. Unstable disability and fluctuations of frailty. *Age Ageing* 1997; 26:315-318.
13. Hamerman D. Toward an understanding of frailty. *Ann Intern Med*. 1999; 130:945-50. Review.

14. Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med.* 2003; 70:3-22. Review.
15. Bruce SK. y Byuny PY. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J Gerontol* 1992; 47: B107-B114.
16. Rusting LR. Why do we age. *Scientific American* 1992; 367:86-95.
17. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:7124-7128.
18. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res.* 2008; 314:1918-1922.
19. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-247.
20. Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Res Physiol* 2001; 128:379-391.
21. Sohal RS, Sohal BH, Orr WC. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage and longevity in different species of flies. *Free Rad Biol Med* 1995; 19:499-504.
22. Pacifici E, Kelvin D. Protein, lipid and DNA repair system in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991; 37:166-180.
23. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad Med* 1997; 23:134-147.
24. Martín RH, Radmarker AW. The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. *Am J Hum Genet* 1987; 41:484-492.
25. Fukagawa NK. Is oxidative stress a marker or is it causal? *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:293-298.
26. Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* 2002; 123:801-810.
27. Sagai CM, Ichinose T, Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases by rats. *Life Sci* 1980; 27:731-738.
28. Knight JA, Smith ES, Kinder EV, Anstall BH. Reference intervals for plasma lipoperoxides: age, sex, and specimen-related variations. *Clin Chem* 1987; 33:2289-2291.

29. Nishimura S. 8-Hydroxyguanine, DNA adduct formed by oxygen radicals. In Dizdaroglu M, Karakaya AE. Advances in DNA damage and repair oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences. Vol. 302 Series a Life Sciences. New York: Plenum Publishers, 1993:319-327.
30. Sigh NP, McCoy MT, Tice RR, y Schneider EL. 1988 A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-185.
31. Gutteridge J. Free radicals and aging. *Rev Clin Gerontol* 1994; 4:279-288.
32. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992; 275:257-266.
33. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source biochemistry, and role in human. *Am J Med* 1991; 91 Suppl 3C:14S-22S.
34. Halliwell B, Gutteridge J, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119:598-620.
35. Chesseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49:481-493.
36. Rodríguez-Perón JM, Menéndez-López JR, Trujillo-López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001; 30:36-44.
37. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41:1819-1828.
38. Knight JA. Free radicals: their presence in biological systems. In *Free radicals, antioxidants, aging and disease*. Washington: AACC Press. 1999. p 21-43.
39. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:48-95.
40. Huberman A. La importancia médica de los radicales libres de oxígeno *Gac Med Mex* 1996; 132:184-195.
41. Kowaltowski JA, Vercesi EA. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:463-471.
42. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997; 174:305-319.

43. Zorov DB. Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1275:10-15.
44. Gabbita SP, Butterfield DA, Hensley K. Aging caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: an electron paramagnetic resonance investigation. *Free Rad Biol Med* 1997; 23:191-201.
45. Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Scientific American* 1996; 274:32-38.
46. Knight AJ. Free radicals and the environment. In: Knight AJ, editor. *Free radicals, antioxidants, aging and disease*. Washington: AACC Press. 1999. p 333-354.
47. Lee HC, Lu ChY, Fahn HJ, Wei YH. Aging and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett* 1998; 441:292-296.
48. Bendich A. Symposium: Antioxidants, immune response and animal function. *J Dairy Sci* 1993; 76:2789-2794.
49. Kiyosawa H, Suko M, Okudaira H, Murata K, Miyamoto T, Chung MH. Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. *Free Rad Res Comm* 1990; 11: 23-27.
50. Lieber SC. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997; 257:59-84.
51. Sherman Dy, Willias R. Liver damage: mechanisms and management. *British Med Bull* 1994; 50:124-138.
52. Veshima Y, Matsuda Y, Wang BY, Takase A: Ethanol and acetaldehyde metabolism in culture rat hepatocytes. *Alcohol Alcohol* 1993; 28:3-10.
53. Valacchi G, Weber SU, Luu Ch, Cross CE, Packer L. Ozone potentiates vitamin E depletion by ultraviolet radiation in the murine stratum corneum. *FEBS Lett* 2000; 466:165-168.
54. Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 801-810.

55. Kelly JF. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* 2003; 60: 612-616.
56. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 2003; 111:455-460.
57. Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen EL, Loft S. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 2003; 544: 255-271.
58. Fortoul T, Valverde M, López MC, Bizarro P, López I, Sánchez I, Colín-Carenque L, Ávila-Acosta MR, Rojas E, Ostrosky-Shejet P. Single-cell gel electrophoresis assay of nasal epithelium and leukocytes from asthmatic and nonasthmatic subject in México City. *Arch Environ Health* 2003; 58:348-352.
59. Mendoza-Núñez VM, Retana-Ugalde R, Sánchez-Rodríguez M, Altamirano-Lozano M. DNA damage in lymphocytes of elderly patients in relations with total antioxidant levels. *Mech Ageing Dev* 1999; 108: 9-23.
60. Chen L, Bowen PE, Berzy D, Aryee F, Stacewicz-Sapuntzakis M, Riley RE. Diet modification affects DNA oxidative damage in healthy humans. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 695-703.
61. Guo ZM, Yang H, Hamilton ML, Van Remmen H, Richardson A. Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in the mouse aorte. *Mech Ageing Dev* 2001; 122 1771-1786.
62. Jennings BJ, Ozanne SE, Hales CN. Nutrition, oxidative damage, telomere shortening, and cellular senescence: individual or connected agents of aging? *Mol Gen Metab* 2000; 71; 32-42.
63. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Rad Biol Med* 2001; 31: 911-922.
64. Barja G. Free radicals and aging. *Trends in neurosciences* 2004; 27:595-600.
65. Karanjawala ZE, Lieber MR. DNA damage and aging. *Mech Age Develop* 2004; 125: 405-416.

66. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37–56.
67. Lenaz G. The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species: Mechanisms and Implications in Human Pathology. *IUBMB Life* 2001; 52: 159-164.
68. Martin GM, Oshima J. Lessons from human progeroid síndromes. *Nature* 2000; 408: 263-266.
69. González-Torres C, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquimia* 2000; 25:3-9.
70. Lieber MR, Karanjawala ZE. Ageing, repetitive genomes and DNA damage. *Nature* 2004; 5: 69-75.
71. Akker van den E, Lutgerink JT, Lafleur MVM, Joenje H, Retél J. The formation of one-G deletions as a consequence of singlet-oxygen-induced DNA damage. *Mutat Res* 1994; 309: 45-52.
72. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Transac Inflammation* 2007; 35:1147:1150
73. Bourgeois CF. Antioxidant vitamins and health. New York: HNB publishing; 2003.
74. Fridovich I. Superoxide Anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272:18515-18517.
75. Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36:1481-95.
76. Padayatty JS, Daruwala R, Wang Y, Eck KP, Song J, Koh SW, Levine M. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants*. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 117-145.
77. Carr CA, Frei B. Vitamin C and cardiovascular diseases. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants*. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 147-165.

78. Rock CI, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and carotenoids. *J Am Diet Assoc* 1996; 96: 693-702.
79. Bourges RH, Casanueva E, Rosado JL. Recomendaciones de Ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. México: Editorial Médica Panamericana; 2005.
80. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 2003; 22:18-35.
81. Landvik VS, Diplock TA, Packer L. Efficacy of vitamin E in human health and disease. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants*. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 75-97.
82. Niki E, Noguchi N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc Chem Res* 2004; 37:45-51.
83. Hopkin K. Appendix: vitamin E and health. Background and objectives. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1031:449-454.
84. Traber MG. Regulation of Human Plasma Vitamin E. In: Sies H, editor. *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. San Diego (CA): Academic Press Inc; 1997. P49-63.
85. Traber MG. Vitamin E Bioavailability, biokinetics and metabolism. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants*. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 99-108.
86. Horwitt MK. Critique of the requirement for vitamin E. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1003-1005.
87. Stahl W, Sies H. Antioxidant effects of carotenoids: Implication in photoprotection in humans. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants*. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 223-233.
88. Stahl W, Sies H. Antioxidant Defense: Vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* 1997; 46: S14-S18.

89. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ* 2008; 400:115-141.
90. Sun YA, Wang Q, Simonyi A, Sun YG. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med* 2008; 10: 259–274.
91. Fuhrman B, Aviram M. Polyphenols and flavonoids protect LDL against atherogenic modifications. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants*. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 303-336.
92. Korkina GL, Afanas'ev BI. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. In: Sies H, editor. *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. San Diego (CA): Academic Press Inc; 1997. p.151-163.
93. Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002; 6: 271-278.
94. Rice-Evans C, Miller JN, Pagangas G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 933-956.
95. Vaidya V, Ingold KU, Pratt DA. Garlic: Source of the Ultimate Antioxidants—Sulfenic Acids. *Angew Chem* 2009; 48:157-160.
96. Rahman K, Lowe GM. Garlic and Cardiovascular Disease: A Critical Review. *J Nutr* 2006; 136:736S-740S.
97. Lenaz G, D'Aurelio M, Merlo PM, Genova ML, Ventura B, Bovina C, Formiggini G, Parenti CG. Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1459: 397-404.
98. James MA, Smith AJ, Murphy PM. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423:47-56.
99. Reiter RJ, Tan D, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:1129-1146.
100. Reiter RJ, Tan D, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol* 2007; 54:1-9.

101. Tirosh O, Roy Sashwati, Packer L. Lipoic acid: Cellular metabolism, antioxidant activity and clinical relevance. In: Cadenas E, Packer L, editors. Handbook of antioxidants. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 473-487.
102. González-Pérez O, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. El alfa-tocoferol y el ácido alfa-lipoico. Una sinergia antioxidante con potencial en medicina preventiva. *Rev Invest Clin* 2008; 60:58-67.
103. Singh U, Jialai I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev* 2008; 66: 646–657.
104. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 1999; 26:1034-53. Review
105. Satchek JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1575-88.
106. Stampfer MJ, Rimm EB. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62:1365S-1369S. Review.
107. Nicolas AS, Andrieu S, Nourhashémi F, Rolland Y, Vellas B. Successful aging and nutrition. *Nutr Rev* 2001; 59:S88-93.
108. Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* 1999; 281:1415-1423.
109. Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18:367-81. Review.
110. Alul RH, Wood M, Longo J, Marcotte AL, Campione AL, Moore MK, Lynch SM. Vitamin C protects low-density lipoprotein from homocysteine-mediated oxidation. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:881-91.
111. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB* 1999; 13:1007-1024.
112. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; 392: 559.

113. Levine M, Daruwala RC, Park JB, Rumsey SC, Wang Y. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 1998; 395:231.
114. Poulsen HE, Weimann A, Salonen JT, Nyssönen K, Loft S. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 1998; 395:231-232.
115. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85: S67-S74.
116. Winterbone MS, Sampson MJ, Saha S, Hughes JC, Hughes DA. Pro-oxidant effect of alpha-tocopherol in patients with type 2 diabetes after an oral glucose tolerance test--a randomised controlled trial. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6:8.
117. Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005; 142:37-46.
118. Pearson P, Lewis SA, Britton J, Young IS, Fogarty A. The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo. *BioDrugs* 2006; 20:271-273.
119. Mulholland CW, Strain JJ, Trinick TR. Serum antioxidant potential, and lipoprotein oxidation in female smokers following vitamin C supplementation. *Int J Food Sci Nutr* 1996; 47:227-231.
120. Mol MJ, de Rijke YB, Demacker PN, Stalenhoef AF. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking: effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis* 1997; 129:169-76.
121. Wen Y, Cooke T, Feely J. The effect of pharmacological supplementation with vitamin C on low-density lipoprotein oxidation. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44:94-97.
122. Anderson D, Phillips BJ, Yu TW, Edwards AJ, Ayesh R, Butterworth KR. The Effects of Vitamin C Supplementation on Biomarkers of Oxygen Radical Generated Damage in Human Volunteers With "Low" or "High" Cholesterol Levels. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30:161-174.
123. Mosca L, Rubenfire M, Mandel C, Rock C, Tarshis T, Tsai A, Pearson T. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:392-399.

124. Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett* 1998; 132:219-227. 126
125. Welch RW, Turley E, Sweetman SF, Kennedy G, Collins AR, Dunne A, Livingstone MB, McKenna PG, McKelvey-Martin VJ, Strain JJ. Dietary antioxidant supplementation and DNA damage in smokers and nonsmokers. *Nutr Cancer* 1999; 34:167-172.
126. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Jul;9(7):647-52.
127. Brennan LA, Morris GM, Wasson GR, Hannigan BM, Barnett YA. The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes. *Br J Nutr* 2000; 84:195–202.
128. Proeggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277:535–540.
129. Jacobson JS, Begg MD, Wang LW, et al. Effects of a 6-month vitamin intervention on DNA damage in heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:1303–1311.
130. Ribeiro ML, Arçari DP, Squassoni AC, Pedrazzoli J Jr. Effects of multivitamin supplementation on DNA damage in lymphocytes from elderly volunteers. *Mech Ageing Dev* 2007; 128:577-580.
131. Anderson JW, Gowri MS, Turner J, Nichols L, Diwadkar VA, Chow CK, Oeltgen PR. Antioxidant supplementation effects on low-density lipoprotein oxidation for individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 1999; 18:451-461.
132. Gaede P, Poulsen EH, Parving H-H, Pedersen O. Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in type 2 diabetics patients. *Diabetic Med* 2001; 756-760.
133. Carrol MF, Schade DS. Timing of antioxidant vitamin ingestion alters

- postprandial proatherogenic serum markers. *Circulation* 2003; 108:24-31.
134. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Keaney JF Jr, Creager MA. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H2392-H2398.
 135. Regensteiner JG, Popylisen S, Bauer TA, Lindenfeld J, Gill E, Smith S, Oliver-Pickett CK, Reusch JE, Eil JV. Oral L-arginine and vitamins E and C improve endothelial function in women with type 2 diabetes. *Vasc Med* 2003; 8:311-318
 136. Farvid MS, Jalali M, Siassi F, Saadat N, Hosseini M. The impact of vitamins and/or mineral supplementation on blood pressure in type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr* 2004; 23:272-279.
 137. Farvid MS, Siassi F, Jalali M, Hosseini M, Saadat N. The impact of vitamin and/or mineral supplementation on lipid profiles in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 65:21-8.
 138. Naziroglu M, Simsek M, Simsek H, Aydilek N, Özcan Z, Atlgan R. The effects of hormone replacement therapy combined with vitamins C and E on antioxidants levels and lipid profiles in postmenopausal women with type 2 diabetes.
 139. Levy AP, Friedenberg P, Lotan R, Ouyang P, Tripputi M, Higginson L, Cobb FR, Tardif J-C, Bittner V, Hoard BV. The effect of vitamin therapy on the progression of coronary artery atherosclerosis varies by haploglobin type in postmenopausal women. *Diabetes care* 2004; 27:925-930.
 140. Farvid MS, Jalali M, Siassi F, Hosseini M. Comparison of the effects of vitamins and/or mineral supplementation on glomerular and tubular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:2458-64.
 141. Tessier DM, Khalil A, Trottier L, Fülöp T. Effects of vitamin C supplementation on antioxidants and lipid peroxidation markers in elderly subjects with type 2 diabetes. *Arch Gerontol Geriatr* 2009; 48:67-72.
 142. MRC/BHF Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering therapy and antioxidant vitamin supplementation in a wide range of patients at increased risk of coronary heart disease: early safety and efficacy experience. *Eur Heart J* 1999; 20:725-741.

143. Huang H-Y, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Preven* 2000; 9:647-652.
144. Salonen JT, Nyyssönen K, Salonen R, Lakka H-M, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Lakka TA, Rissanen T, Leskinen L, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Poulsen HE. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Int Med* 2000; 248:377-386.
145. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr, Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000 36:758-765.
146. Porkkala-Sarataho E, Salonen JT, Nyyssönen K, Kaikkonen J, Salonen R, Ristonmaa U, Diczfalusy U, Brigelius-Flohe R, Loft S, Poulsen HE. Long-term effects of vitamin E, vitamin C, and combined supplementation on urinary 7-hidro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, serum cholesterol oxidation products, and oxidation resistance of lipids in nondepleted men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2087-2093.
147. Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Nyyssonen K, Salonen R, Tuomainen TP, Ristonmaa U, Poulsen HE, Salonen JT. Supplementation with vitamin E but not with vitamin C lowers lipid peroxidation in vivo in mildly hypercholesterolemic men. *Free Radic Res* 2001; 35:967-978.
148. Huang H-Y, Appel LJ, Croft KD, Miller ER, Mori TA, Puddey IB. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:549-555.
149. MRC/BHF Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in a 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:23-33.

150. Harper L, Nuttall SL, Martin U, Savage COS. Adjuvant treatment of patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis with vitamins E and C reduces superoxide production by neutrophils. *Rheumatology* 2002; 41:274-278.
151. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, Suh J, Frei B, Mudge GH, Selyn AP, Ganz P. Effect of vitamin C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet* 2002; 359:1108-1113.
152. Salonen RM, Nyssönen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Rissanen TH, Tuomainen T-P, Vanharanta M, Salonen JT, Poulsen HE. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression. *Circulation* 2003; 107:947-953.
153. Smolkova B, Dusinska M, Raslova K, Barancokova M, Kazimirova A, Horska A, Spustova V, Collins A. Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. *Mutagenesis* 2004; 19:469-476.
154. Kinlay S, Behrendt D, Fang JC, Delagrangre D, Morrow J, Witztum JL, Rifai N, Selwyn AP, Creager MA, Ganz P. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:629-634.
155. Stone PH, Lloyd-Jones DM, Johnstone M, Carlson , Rubenstein J, Creager M, Frei B, Sopko G, Clark ME, Maccallum G, Kinlay S, Orav J, Selwyn AP. Vascular basis for the treatment of myocardial ischemia study: trial design and baseline characteristics. *Am Heart* 2004; 147:875-882.
156. Zureik M, Galan P, Bertrais S, Mennen L, Czernichow S, Blacher J, Ducimetière P, Hercberg S. Effects of long-term daily lo-dose supplementation with antioxidant vitamins and minerals on structure and function of large arteries. 2004; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1485-1491.
157. Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Bächler JP. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clin Sci* 2008; 114):625-634.

158. The world Medical Association, Inc. Ethical principles medical research involving human subjects. Edimburgo: WMA; 2000.
159. Sánchez-Rodríguez M, Mendoza-Núñez VM, García-Sánchez A, González-González B, Rodríguez-Torres E, González-Obregón A. Valores de referencia para una población de ancianos y adultos de la Ciudad de México. Parámetros bioquímicos y hematológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 1998; 32: 812–821.
160. Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 251-256.
161. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184–191.
162. Lee W, Hamernyk P, Hutchinson M, Raisys VA, Labbe RF: Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid-chromatographic assay. *Clin Chem* 1982; 28: 2165–2169.
163. Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL: Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 1979; 32: 2143–2149.
164. Romieu I, Meneses F, Ramírez M, Ruíz S, Pérez-Padilla R, Sienna JJ, Gerber M, Grievink L, Dekker R, Walda I, Brunekreef B. Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:226-232.
165. Samet MJ, Hatch EG, Horstman D, Steck-Scott S, Arab L, Bromberg AP, Levine M, McDonnell FW, Devlin BR. Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:819-825.
166. Jacob R, Aiello G, Stephensen C, Blumberg J, Milbury P, Wallock L, Ames B. Moderate antioxidant supplementation has not effect on biomarkers of oxidant

- damage in healthy men with low fruit and vegetable intakes. *J Nutr* 2003; 133:740-743.
167. Cheng TY, Zhu Z, Masuda S, Morcos NC. Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy humans. *J Clin Biochem* 2001; 12:388-395.
168. Hallfrisch J, Muller D, Singh V. Vitamin A and E intakes and plasma concentrations of retinol, β -carotene, and α -tocopherol in men and women of Baltimore longitudinal study of aging. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:176-182.
169. Fletcher A, Breeze E, Shetty P. Antioxidant vitamins and mortality in older persons: findings from the nutrition add-on study to the medical research council trial of assessment and management of older people in the community. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:999-1010.
170. Fairfield K, Fletcher R. Vitamins for chronic disease prevention in adults. *JAMA* 2002; 287: 3116-3126.
171. Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V: Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2002;13: 444-461.
172. Weinberg RB, Vander Werken BS, Anderson RA, Stegner JE, Thomas MJ: Pro-oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1029-1033.
173. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C: Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 297: 842-857.
174. Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 1995; 338:115-128.
175. Pineda A D, Salucci M, Lazaro R, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1999; 13:104-111.

176. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. 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; 924:408-419.
177. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean PH. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997; 43:562-568.
178. De Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Gen* 1996; 5:283-292.
179. Adachi T, Wang J, Wang XL. Age-related change of plasma extracellular-superoxide dismutase. *Clin Chim Acta* 2000; 290:169-178.
180. Husain K. Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and antioxidants in plasma of rats. *Pathophysiol* 2003; 10: 47-56.
181. Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yilmaz T, Sahap Kukner A. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res* 2005; 75:71-80.
182. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, Pouliopoulou S, Fotinakis P, Taxildaris K, Deliconstantinos G. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36:2065-72.
183. Tauler P, Aguiló A, Fuentespina E, Tur JA, Pons A. Tauler P, Aguiló A, Fuentespina E, Tur JA, Pons A. Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and beta-carotene cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes. *Pflugers Arch* 2002; 443:791-797.
184. Brody H. The placebo response. *J Fam Pract* 2000; 49:649-654.
185. Ernst E, Resch KL. Concept of true and perceived placebo effects. *BMJ* 1995; 311:551-553.

186. Wikinski S. ¿Que sabemos acerca del mecanismo de acción del placebo? *Vertex* 2003; 14:59–64.
187. Macedo A, Farré M, Baños J-E. Placebo effect and placebos: what are we talking about? Some conceptual and historical considerations. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59:337–342.
188. Amanzio M, Benedetti F. Neuropharmacological dissection of placebo analgesia: expectation-activated opioid systems versus conditioning-activated specific subsystem. *J Neurosci* 1999; 19:484–494.
189. Schneider RH, Nidich SI, Salerno JW, Sharma HM, Robinson CE, Nidich RJ, Alexander CN. Lower lipid peroxide levels in practitioners of transcendental meditation program. *Psychosomatic Medicine* 1998; 60:38–41.
190. Johansen O, Brox J, Flaten MA. Placebo and nocebo responses, cortisol, and circulating betaendorphin. *Psychosomatic Medicine* 2003; 65:786–790.
191. Sharma H, Sen S, Singh A, Bhardwaj NK, Kochupillai V, Singh N (2003) Sudarshan Kriya practitioners exhibit better antioxidant status and lower blood lactate levels. *Biological Psychology*, 63, 281–291.
192. Scarpellini F, Sbracia M, Scarpellini L. Psychological stress and lipoperoxidation in miscarriage. *Ann NY Acad Sci* 1994; 709:210–213.
193. Jensen MP, Karoly P. Motivation and expectancy factors in symptom perception: a laboratory study of the placebo effect. *Psychosomatic Medicine* 1991; 53:144–152.
194. Moyad MA. The placebo effect and randomized trials: analysis of conventional medicine. *Urol Clin N Am* 2002; 29:125–133.
195. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrell CH, Schneider EL: Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991; 256: 1–6.
196. Mendoza-Núñez VM, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Vargas-Guadarrama LA, Altamirano-Lozano MA: Total antioxidant levels, gender, and age as risk factors for DNA damage in lymphocytes of the elderly. *Mech Age Dev* 2001; 122: 835–847.

197. Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J: Antioxidant vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 2001; 491: 1–7.
198. Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR: Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996; 56: 1291–1295.
199. Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchai R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K. Hormesis and dose–response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 2005; 26:1835-1845.
200. Bernhard WA, Purkayastha S. Which DNA Damage is likely to be relevant in hormetic responses? *Dose-Response* 2008; 6:184–195.
201. Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Ruiz-Ramos M, Muñoz-Sánchez JL, Vargas-Guadarrama LA, Mendoza-Núñez VM: Efficient antioxidant capacity against lipid peroxide levels in healthy elderly of Mexico City. *Environ Res* 2005; 97: 322–327.

ANEXOS

XIV.1 Consentimiento informado



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
* Z A R A G O Z A ***

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA
PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN**

Efectividad de la administración del α -tocoferol y el ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo y daño al ADN en adultos mayores sanos del área rural y urbana.

Antecedente y Objetivo

El estrés oxidativo (EOx) es un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO's), endógenas y exógenas y la acción eficaz del sistema antioxidante, no obstante factores pro-oxidantes pueden favorecer que éste proceso se presente. Asimismo se señala que durante el envejecimiento el EOx se intensifica por incremento de los ERO's y/o deficiencia de los sistemas antioxidantes, lo cual se traduce como daño al ADN y predisposición a enfermedades crónico-degenerativas. Así mismo, se ha demostrado que el lugar de residencia constituye un factor determinante para el EOx, propiciado por las condiciones ambientales y los estilos de vida que lo caracterizan. Al respecto, se ha propuesto que el consumo por periodos prolongados de la combinación del alfa tocoferol y el ácido ascórbico como suplemento antioxidante puede ser de utilidad para prevenir o contrarrestar el EOx y daño oxidativo al ADN vinculado con el lugar de residencia.

Por tal motivo, en el presente estudio se medirá la efectividad antioxidante de ambas vitaminas y su efecto sobre el estrés oxidativo y daño al ADN en adultos mayores de 60 años y de ambos sexos. Para tal efecto, los adultos mayores se conformarán en tres grupos de tratamiento en forma aleatoria para cada grupo del área rural y para el área urbana. Los tratamientos serán los siguientes: Tx1, se le administrarán 400UI de vitamina E y 500mg de vitamina C, Tx2, se le suplementará con 400UI de vitamina E y 1000mg de vitamina C, y Tx0 será un placebo con una presentación farmacéutica similar a la de los suplementos vitamínicos, por vía oral durante 1 año, bajo la supervisión estricta de un médico certificado. Se les practicarán análisis bioquímicos de rutina (biometría hemática y química sanguínea de 6 elementos) antes de iniciar a los seis meses y al finalizar el tratamiento. Asimismo, se medirán los marcadores de estrés oxidativo y daño al ADN al inicio del tratamiento, a los 6 y a los 12 meses.

Procedimiento

Se seleccionarán adultos mayores de 60 años voluntarios de la cd. de México y de Actopan Hidalgo. A todos los participantes se les hará una medición de composición corporal y la toma de cuatro tubos de sangre, además se les aplicará un cuestionario de factores de riesgo prooxidantes,

Condiciones para ingresar al estudio

- Adultos mayores de 60 años de ambos sexos.
- Clínicamente sanos desde el punto de vista gerontológico.
- Firmar o poner su huella digital en esta carta de compromiso.

Riesgos

No existe ningún riesgo agregado para su salud, las tomas de muestras sanguíneas serán llevadas a cabo por personal experimentado con agujas nuevas desechables en tubos al vacío. Si por alguna circunstancia se observa algún efecto secundario por la ingesta de las vitaminas, notificar para suspensión del tratamiento.

Beneficios

Los resultados hematológicos y de química sanguínea pueden ser de utilidad para el conocimiento de su estado de salud. El tratamiento repercutirá en beneficio para su calidad de vida.

Confidencialidad

Toda la información obtenida es **ESTRICTAMENTE CONFIDENCIAL**, por lo que sólo se le proporcionará a la participante.

Preguntas

Toda duda que tenga durante el tiempo que dura la investigación la podrá consultar con los participantes de la Unidad de Investigación en Gerontología.

Derecho a rehusar

La aceptación a participar en este estudio es enteramente **VOLUNTARIA**. Por lo que si decide no hacerlo no le afectará en su atención en la Unidad de Investigación.

CONSENTIMIENTO

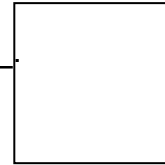
Consiento en participar en el estudio. He recibido una copia de este impreso y he tenido la oportunidad de leerlo o me lo han leído en presencia de un familiar responsable.

Nombre y firma del participante _____

Nombre y firma de un familiar (testigo) _____

Nombre y firma del investigador (testigo) _____

México, D.F. a ____ de _____ del _____
de no
leer y
poner



En caso
saber
escribir,

XIV.2 Cédula antropométrica



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES * Z A R A G O Z A *
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA Clave:

2006

Cédula Antropométrica y
Registro de Presión Arterial

Nombre: _____
Edad: _____ Género: _____ Fecha de evaluación: _____
Fecha de nacimiento: _____

Antropometría

Medición	Resultado
Peso	kg
Talla	m
Altura de la rodilla (medida desde el talón, con la pierna flexionada 20° sobre el muslo con la técnica de Chumlea)	cm
Circunferencia a la mitad del brazo	cm
Circunferencia de la cintura	cm
Circunferencia de la cadera (medida como la máxima de los glúteos)	cm
Circunferencia media de la pantorrilla	cm
Circunferencia del muslo alto*	cm
Circunferencia del muslo medio*	cm
Circunferencia de muñeca*	cm
Talla máxima alcanzada durante la vida (por interrogatorio)	m
Índice de Masa Corporal (IMC)	kg/m ²
Índice Cintura-Cadera (ICC)	

* Únicamente cuando se realice impedanciometría.

Fuente: Vargas LA. Fundamentos para la evaluación antropométrica del estado de nutrición de los ancianos. Cuadern Nutr 1997; 20: 6-14.

Presión Arterial

Medición	Fecha	Sistólica	Diastólica
1ª		mmHg	mmHg
2ª		mmHg	mmHg
3ª		mmHg	mmHg
Promedio		mmHg	mmHg

Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial. Diario Oficial de la Federación 5 abril 2000.

Realizado por: _____ Supervisado por: _____

XIV.3 Carga alostática

Cuadro A3.1. Marcadores de carga alostática en relación al lugar de residencia.

	Pre-intervención			Seis meses de intervención			Doce meses de intervención		
	Tx0	Tx1	Tx2	Tx0	Tx1	Tx2	Tx0	Tx1	Tx2
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Rural									
ICC \geq 0.9	18(72)	15(60)	12(48)	18(72)	17(68)	14(56)	18(72)	17(68)	14(56)
TAS \geq 140	7(28)	6(24)	7(28)	10(40)	6(24)	6(24)	6(24)	2(8)	6(24)
TAD \geq 85	7(28)	7(28)	9(36)	7(28)	8(32)	6(24)	7(28)	8(32)	6(24)
HDL \leq 44	9(36)	6(24)	6(24)	6(24)	9(36)	7(28)	3(12)	3(12)	0(0)
COL \leq 217	7(28)	6(24)	6(24)	6(24)	6(24)	6(24)	8(32)	10(40)	5(20)
IMC \geq 27	14(56)	15(60)	17(68)	15(60)	16(64)	19(76)	15(60)	17(68)	20(80)
SED +	17(68)	18 (72)	18(72)						
Urbana									
ICC \geq 0.9	8(36)	9(41)	10(45)	11(50)	10(45)	12(55)	7(32)	10(45)	10(45)
TAS \geq 140	7(32)	7(32)	6(27)	5(23)	6(27)	6(27)	4(24)	5(8)	5(24)
TAD \geq 85	11(50)	6(27)	10(45)	5(23)	7(32)	6(27)	7(32)	7(32)	8(36)
HDL \leq 44	5(23)	6(27)	8(36)	3(14)	6(27)	6(27)	8(36)	7(32)	5(24)
COL \leq 217	7(32)	6(27)	6(27)	6(27)	6(27)	6(27)	5(23)	6(27)	6(27)
IMC \geq 27	18(82)	18(82)	14(64)	17(77)	19(86)	11(50)	16(73)	18(82)	10(45)
SED +	19(86)	20(91)	19(86)						

Los datos se presentan en frecuencia y porcentaje. ICC= Índice cintura cadera; TAS= Tensión arterial sistólica; TAD= Tensión arterial diastólica; HDL= Lipoproteínas de alta densidad; COL= colesterol; IMC= Índice de masa corporal; SED= Sendarismo. Tx0= Placebo; Tx1= (500mg de vitamina C y 400UI de vitamina E); Tx2= (1000mg de vitamina C y 400UI de vitamina E).

XIV.4 Valores Extremos

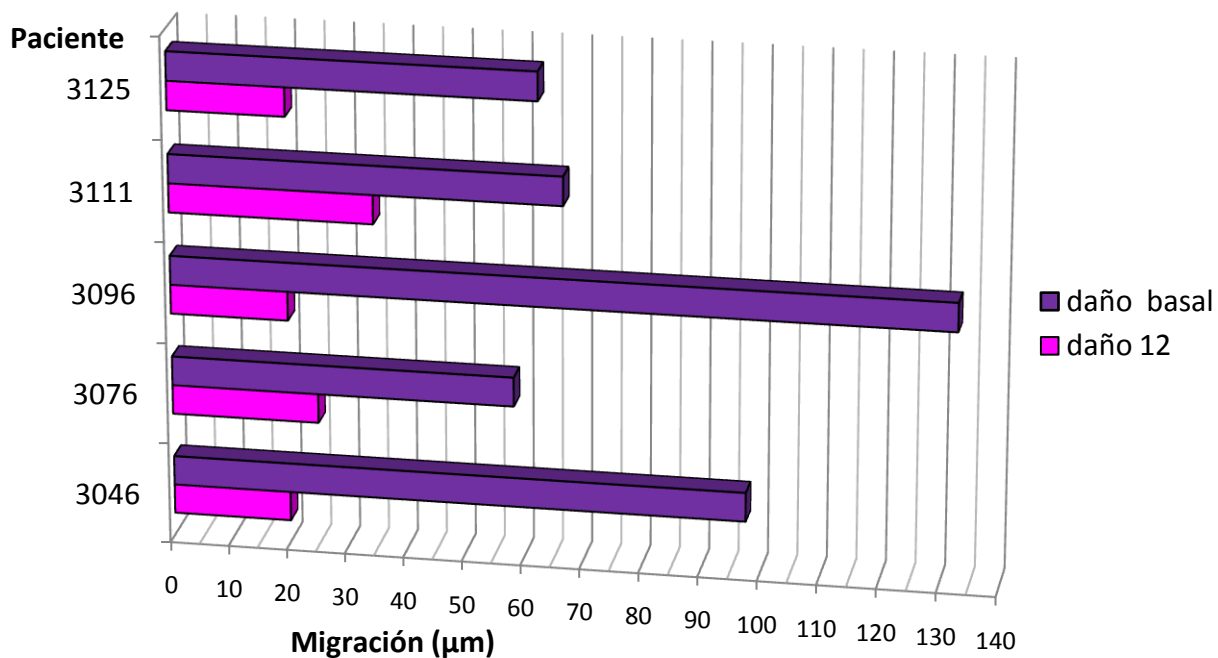


Figura A4.1. Pacientes de la zona rural que mejoraron o disminuyeron los valores promedio de migración del daño al ADN basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3046	Fem	2	69	87	205	54	28.69	0.92	150	87	90.028	92.24	16.89	68.79
3076	Mas	2	89	85	151	49	23.81	0.92	120	77	27.037	44.64	18.93	20.12.
3096	Mas	1	71	77	239	64	27.5	1.03	137	83	21.19	41.75	38.57	16.58
3111	Fem	2	60	91	151	62	33.58	0.93	123	80	35.898	57.14	49.96	23.99
3125	Fem	1	66	98	229	69	26.66	0.86	123	73	87.415	16.42	32.00	33.27

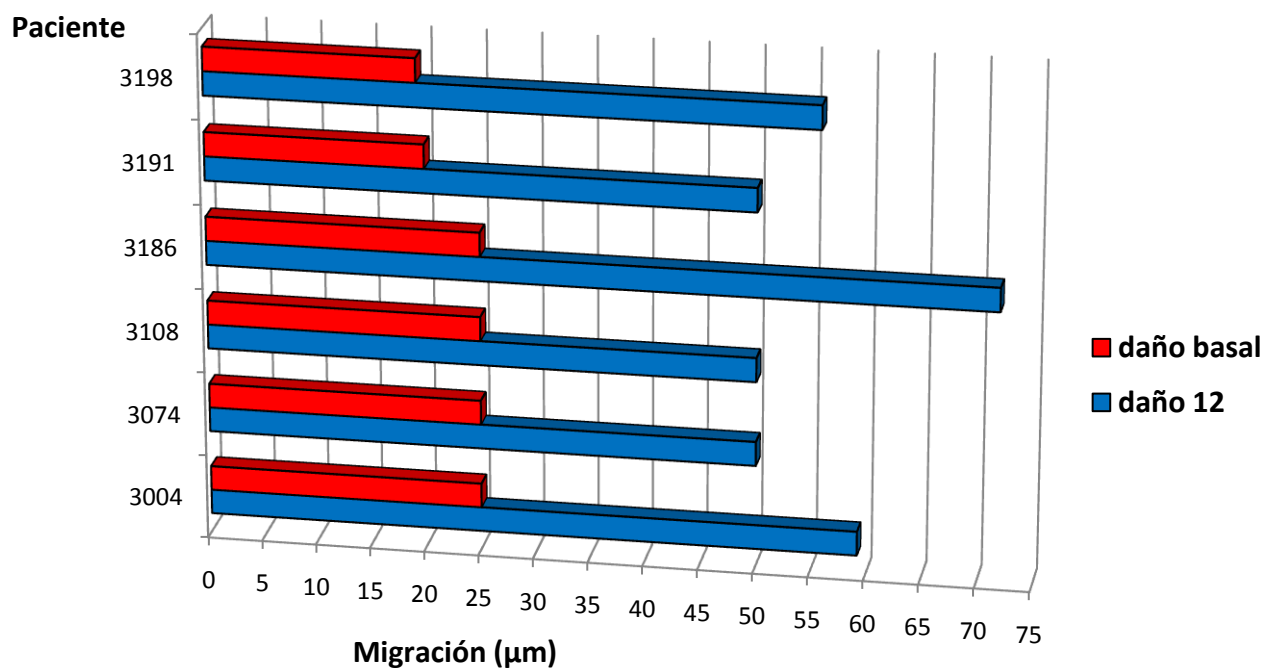


Figura A4.2. Pacientes de la zona rural que no mejoraron o que aumentaron los valores promedio de migración del daño al ADN basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3004	Fem	2	82	84	268	65	26.91	0.92	157	80	72.42	40.61	14.57	133.32
3074	Fem	1	60	84	260	58	36.5	0.91	120	80	76.453	20.62	18.9	45.14
3108	Mas	1	65	89	199	67	26.92	1.03	130	77	34.307	38.4	21.62	30.79
3186	Fem	2	60	74	198	51	25.57	0.85	143	87	95.935	54.07	22.14	31.8
3191	Fem	1	60	79	268	42	24.62	0.85	120	77	56.062	90.74	67.87	44.35
3198	Fem	2	74	86	239	69	29.45	0.81	123	80	59.413	137.51	32.33	22

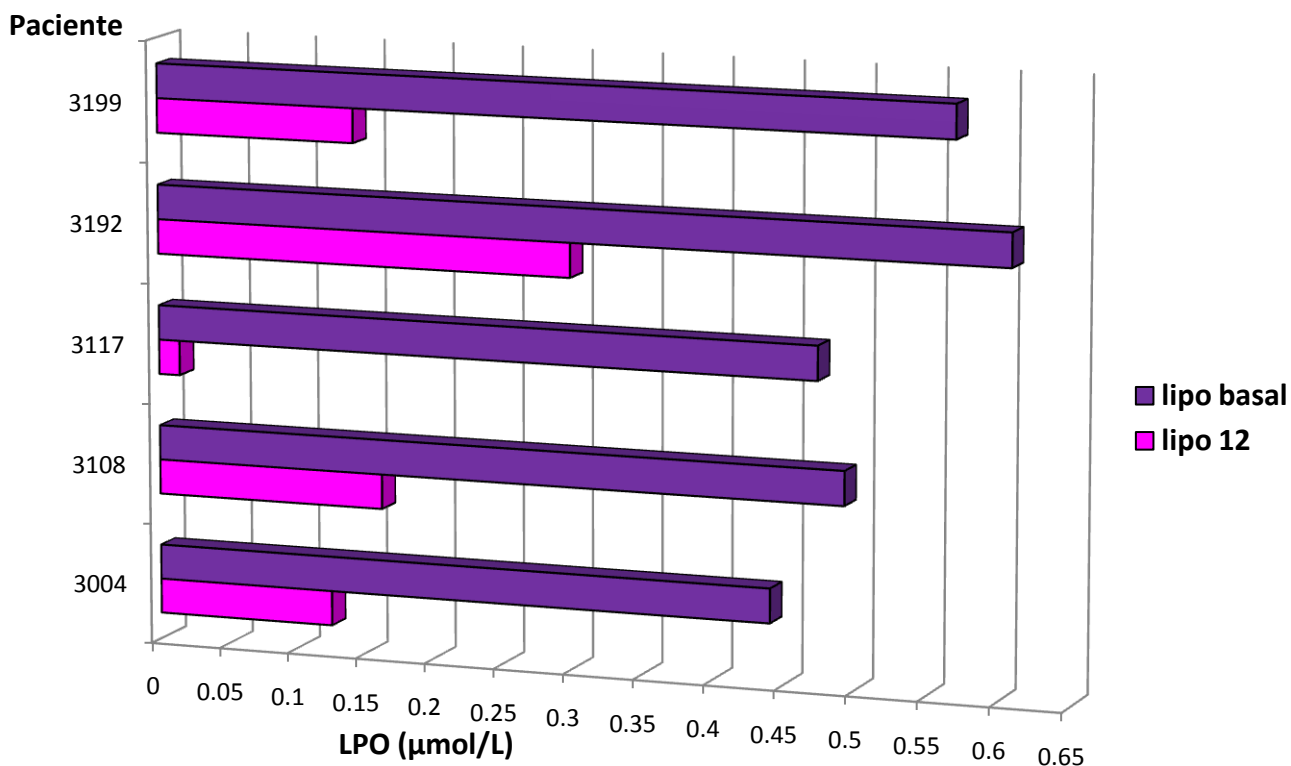


Figura A4.3. Pacientes de la zona rural que mejoraron o disminuyeron los valores promedio de lipoperoxidación basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3004	Fem	2	82	84	268	65	26.91	0.92	157	80	72.42	40.61	14.57	133.32
3108	Mas	1	65	89	199	67	26.92	1.03	130	77	34.307	38.4	21.62	30.79
3117	Fem	2	60	80	267	60	30.85	0.98	123	83	81.338	53.68	31.07	37.42
3192	Fem	1	60	101	208	51	24.69	0.85	117	80	44.077	42.43	29.74	24.71
3199	Fem	1	60	84	249	49	36.58	1	127	77	65.718	36.98	28.91	26.00

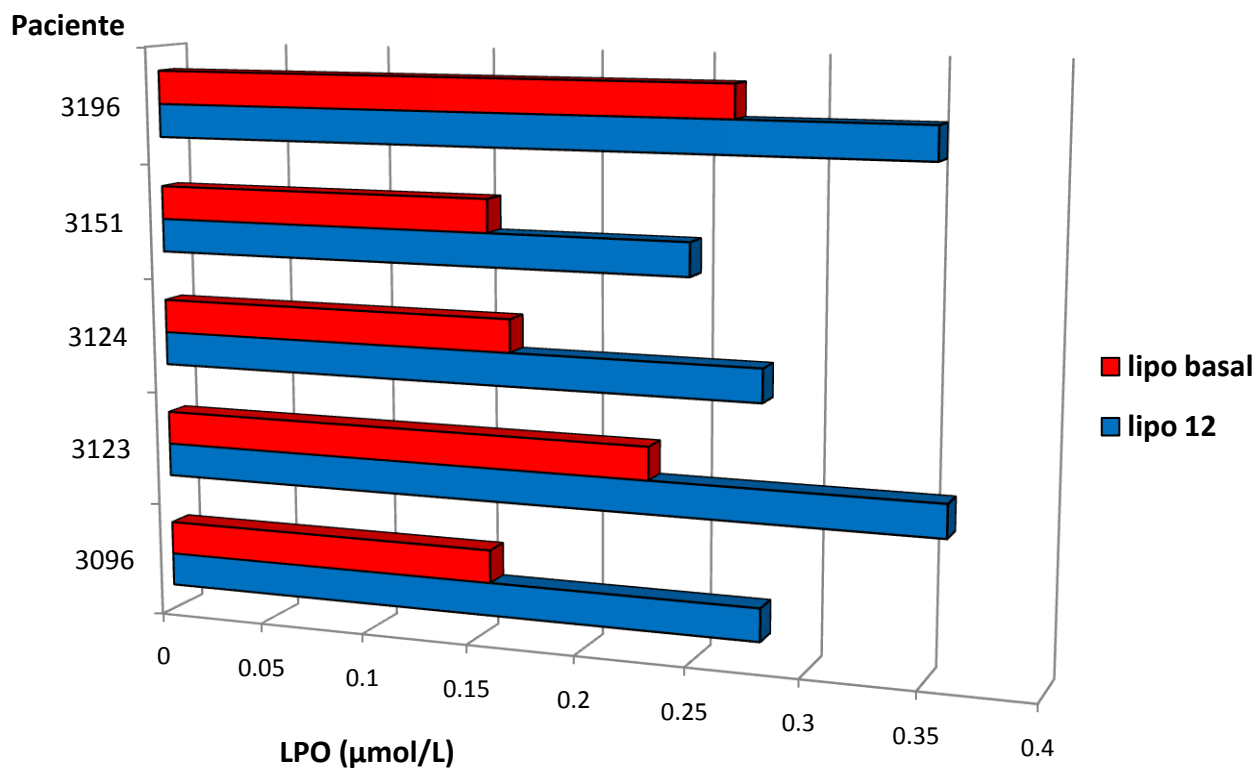


Figura A4.4. Pacientes de la zona rural que no mejoraron o aumentaron los valores promedio de lipoperoxidación basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3096	Mas	1	71	77	239	64	27.5	1.03	137	83	21.19	41.75	38.57	16.58
3123	Mas	1	60	83	125	35	28.86	0.95	123	87	43.509	52.7	29.79	37.93
3124	Fem	1	60	83	207	71	29.81	0.94	120	80	71.852	38.45	28.09	29.64
3151	Mas	1	60	98	290	63	28.6	0.95	123	87	29.536	43.79	30.83	29.64
3196	Fem	2	60	75	239	72	29.87	0.86	123	83	95.254	113.94	21.79	22.25

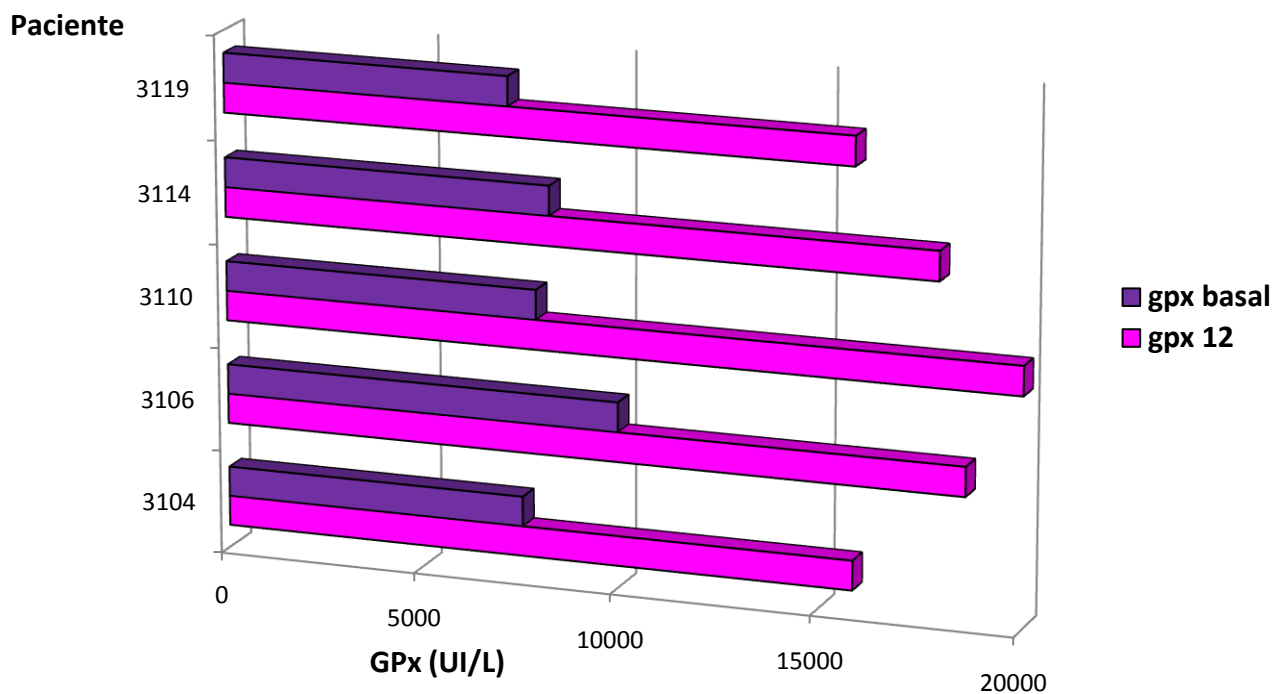


Figura A4.5. Pacientes de la zona rural que mejoraron en los valores promedio en la actividad de la enzima GPx basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3104	Fem	2	71	82	187	35	30.41	0.89	123	83	12.61	44.93	24.06	63.08
3106	Fem	2	74	83	223	35	28.37	1.08	117	73	14.2	64.13	23.11	56.31
3110	Mas	2	60	75	137	35	27.52	1.04	123	80	10.79	54.3	16.81	29.74
3114	Fem	2	69	81	199	35	30.97	1.02	123	73	108.999	72.82	28.85	28.85
3119	Fem	2	56	89	182	35	35.21	0.88	123	87	53.96	38.11	37.91	30.16

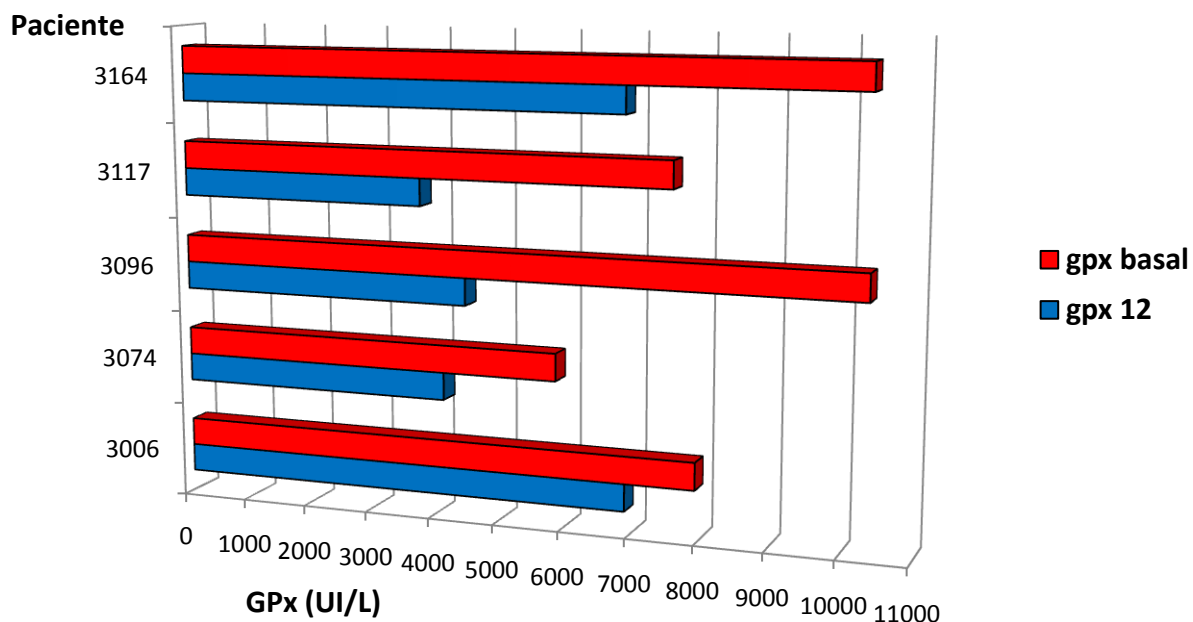


Figura A4.6. Pacientes de la zona rural que no mejoraron o disminuyeron los valores promedio en la actividad de la enzima GPx basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3006	Fem	1	86	78	212	73	21.3	0.82	140	80	23.742	33.68	17.05	73.75
3074	Fem	1	51	84	260	58	36.53	0.91	120	80	76.453	20.62	18.9	45.14
3096	Mas	1	71	77	239	64	27.5	1.03	137	83	21.19	41.75	38.57	16.58
3117	Fem	2	56	80	267	60	30.85	0.98	123	83	81.338	53.68	31.07	37.42
3164	Mas	2	60	83	193	45	27.76	0.97	120	80	49.643	294.17	32.54	37.19

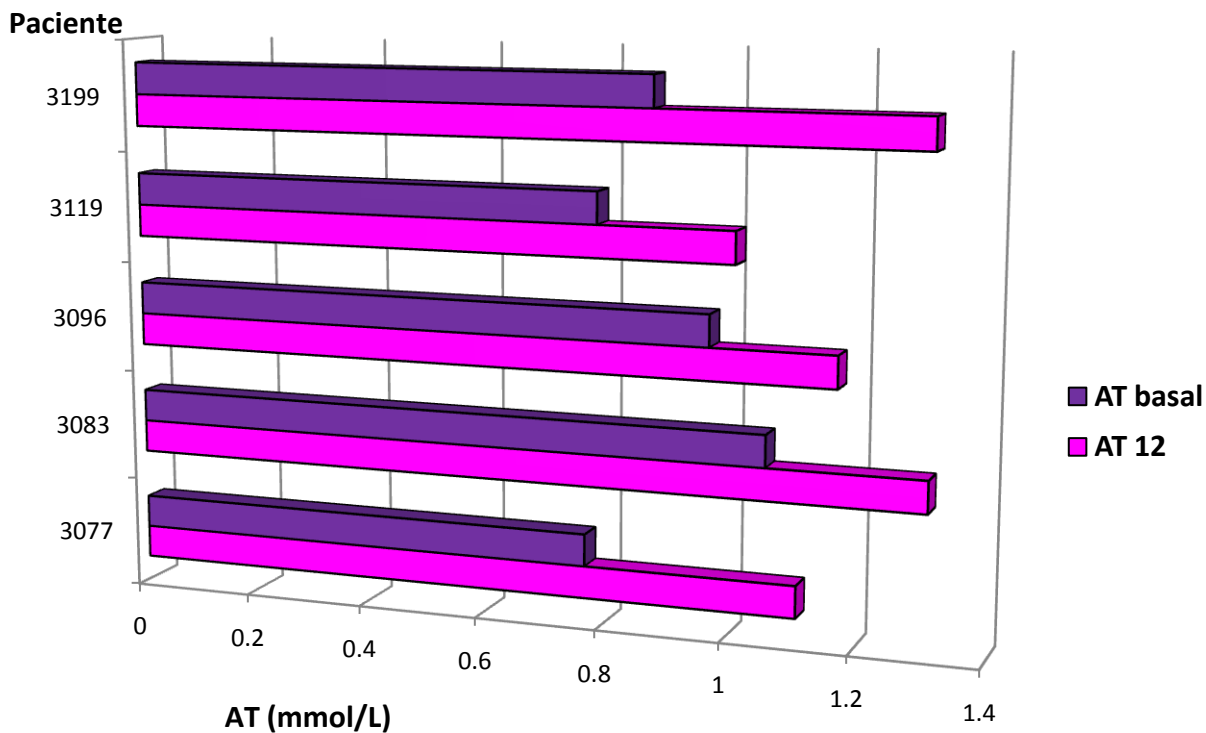


Figura A4.7. Pacientes de la zona rural que mejoraron en los valores promedio de la actividad antioxidante total basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3077	Fem	1	74	89	271	58	34.15	0.9	130	87	34.534	59.98	30.41	63.71
3083	Mas	1	60	100	255	42	30.33	1.02	120	80	77.475	30.05	35.3	38.84
3096	Mas	1	71	77	239	64	27.5	1.03	137	83	21.19	41.75	38.57	16.58
3119	Fem	2	56	89	182	35	35.21	0.88	123	87	53.96	38.11	37.91	30.16
3199	Fem	1	60	84	249	49	36.58	1	127	77	65.718	36.98	28.91	26.00

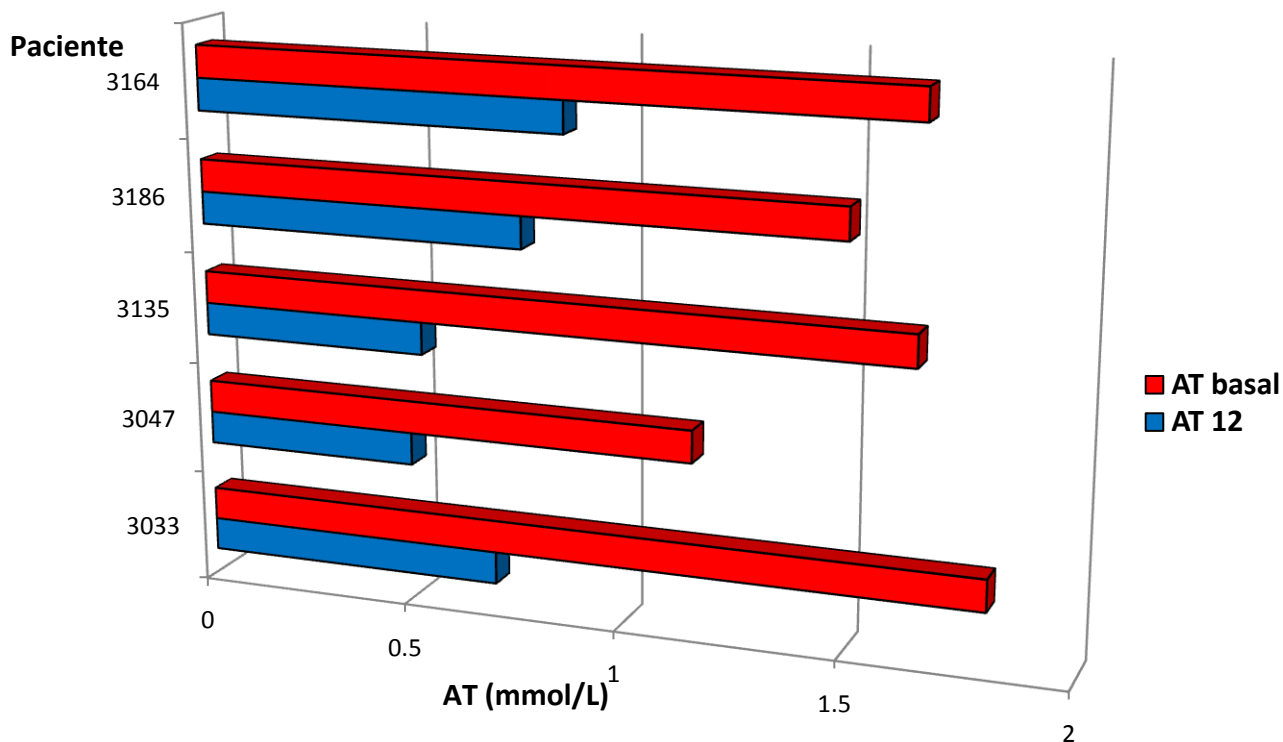


Figura A.4.8. Pacientes de la zona rural que no mejoraron en los valores promedio de la actividad antioxidante total basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
3033	Fem	1	78	80	268	58	31.08	0.95	127	83	55.55	48.6	52.75	81.89
3047	Fem	1	68	83	205	44	31.41	0.85	137	90	34.875	75.94	21.45	45.22
3135	Fem	2	74	87	192	45	32.08	0.82	133	83	33.853	24.99	17.41	20.27
3186	Fem	2	60	74	198	51	25.57	0.85	143	87	95.935	54.07	22.14	31.8
3164	Mas	2	60	83	193	45	27.76	0.97	120	80	49.643	294.17	32.54	37.19

Paciente

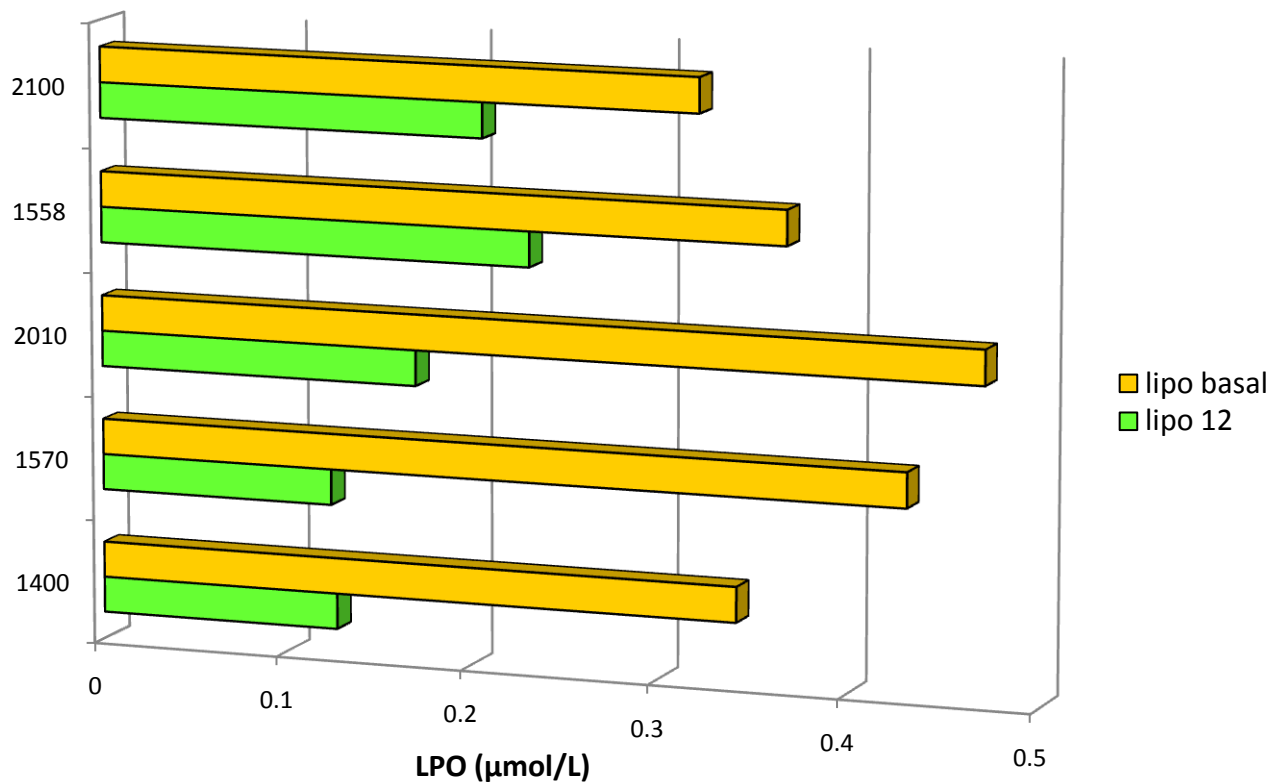


Figura A4.9. Pacientes de la zona urbana que mejoraron en los valores promedio de lipoperoxidación basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
1400	Fem	1	75	92	187	54	32.36	0.83	150	87	90.028	92.24	16.89	68.79
1570	Fem	1	59	101	173	53	30.57	0.86	120	77	27.037	44.64	18.93	20.12.
2010	Fem	1	60	110	257	55	36.04	0.84	137	83	21.19	41.75	38.57	16.58
1558	Fem	2	57	88	257	63	26.3	0.82	123	80	35.898	57.14	49.96	23.99
2100	Fem	2	67	96	220	60	29.95	0.8	123	73	87.415	16.42	32	33.27

Paciente

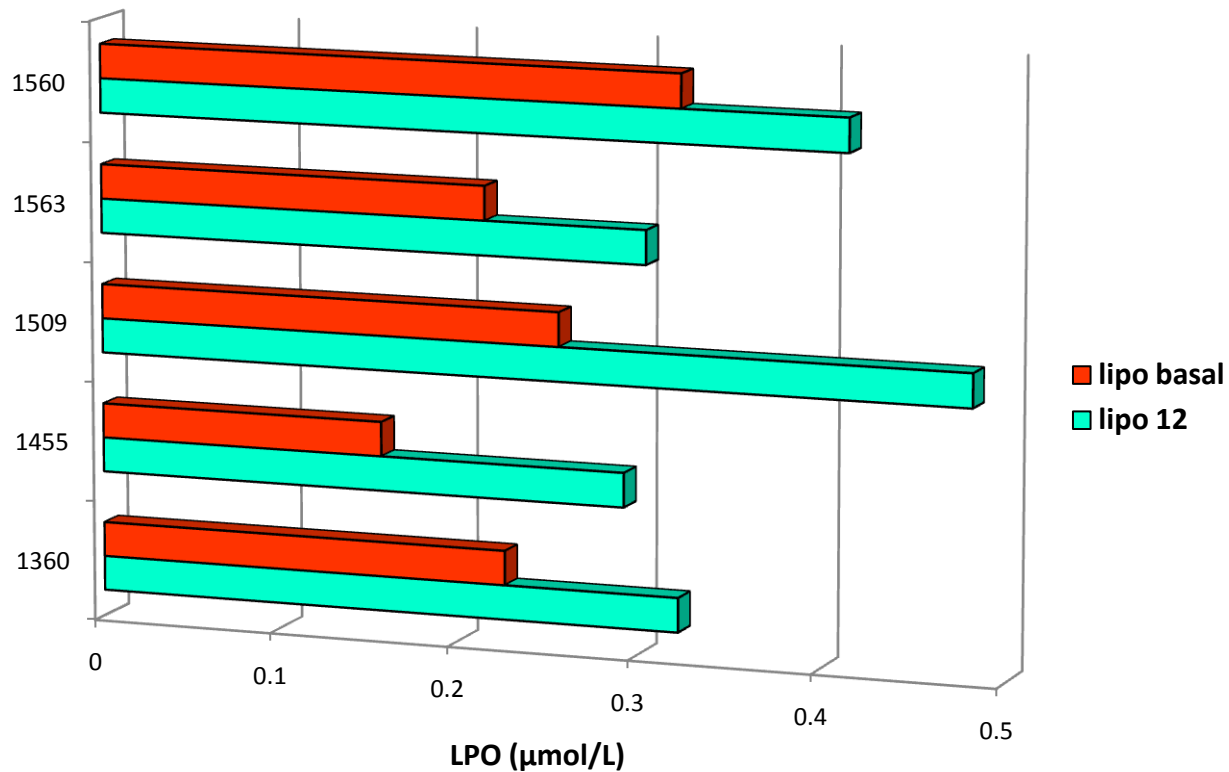


Figura A4.10. Pacientes de la zona urbana que no mejoraron en los valores promedio de lipoperoxidación basal y después de doce meses de intervención antioxidante.

Sujeto	sexo	inter	edad	gluc 12	coles 12	hdl 12	imc 12	icc 12	tas 12	tad 12	vit c basal	vit c 12	vit e basal	vit e 12
1360	Fem	1	60	94	225	42	37.22	0.77	135	87	102.24	98.72	21.68	26.6
1455	Fem	1	68	96	249	45	34.1	1.03	120	77	48.337	73.9	40.5	23.65
1509	Mas	1	77	107	235	30	28.46	0.95	130	75	42.146	60.61	19	25.63
1563	Fem	1	61	96	224	51	28.97	0.97	113	77	26.128	89.29	19.84	27.01
1560	Fem	2	73	102	235	70	26.58	0.87	133	77	34.591	83.27	4.22	24.96

High Dosage of Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol Is Not Useful for Diminishing Oxidative Stress and DNA Damage in Healthy Elderly Adults

Raquel Retana-Ugalde^a Esther Casanueva^c Mario Altamirano-Lozano^b
Cristina González-Torres^d Víctor Manuel Mendoza-Núñez^a

^aUnidad de Investigación en Gerontología, and ^bUnidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, ^cInstituto Nacional de Perinatología, and ^dUniversidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

Key Words

Antioxidant supplementation · Ascorbic acid ·
Alpha-tocopherol · Elderly · Oxidative stress · DNA damage

Abstract

Aim: To determine the useful dosage of ascorbic acid and alpha-tocopherol against oxidative stress and DNA damage in the elderly. **Methods:** A double-blind controlled clinical assay carried out in a sample of 66 healthy subjects divided into three age-paired random groups with 22 subjects in each group. Group A received placebo and group B was administered 500 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol, whereas group C received 1,000 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol for a 6-month period. The following measurements were performed before and after the 6-month treatment period: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); total antioxidant status (TAS); superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) and DNA damage by comet assay. **Results:** After 6 months, group B subjects exhibited an increase in SOD and GPx enzyme levels; however, this was not statistically significant ($p > 0.05$). Likewise, TBARS and TAS concentrations remained unchanged ($p > 0.05$). In addition, in group C the decrease in TBARS and increase in SOD, GPx, and TAS were not statistically significant ($p > 0.05$). Similarly, average DNA migration showed no significant differences with high-dosage ascor-

bic acid and alpha-tocopherol. **Conclusion:** These findings suggest that administration of 1,000 mg of ascorbic acid plus 400 IU of alpha-tocopherol for 6 months is not useful for diminishing oxidative stress and DNA damage in healthy elderly adults.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

Oxidative stress (OxS) is defined as the imbalance between the concentration of high oxidative potential molecules known as free radicals (FR) and antioxidant systems, whose imbalance induces FR damage. This transitory biological phenomenon occurs as part of normal cellular metabolism and is compensated by the efficient action of antioxidant systems, although pro-oxidant factors such as smoking, alcoholism, malnutrition, inadequate alimentation, psychological stress, environmental contamination, extenuating exercise, and insomnia constitute risk factors that favor this process and damage the biomolecules [1–3].

Thus, alternatives have been proposed for diminishing or even preventing OxS, and among these, administration of antioxidant vitamins (A, C and E) is prominent. In this respect, it has been reported that simultaneous administration of ascorbic acid (vitamin C) and alpha-

tocopherol (vitamin E) can prevent the appearance and/or complications of aging-associated diseases [4] by the synergic effects of both vitamins in which vitamin C regenerates the antioxidant capacity of the altered vitamin E that now prevents the lipoperoxidation process [5]. However, the precise dose useful for administration of ascorbic acid and alpha-tocopherol to diminish OxS and DNA damage during this process has not yet been determined.

Although there is some evidence of the beneficial role of the combined administration of ascorbic acid and alpha-tocopherol on OxS, scientific knowledge concerning their effective doses is not fully confirmed [6]. In this regard, different concentrations of 250 mg of vitamin C and 100 mg of vitamin E administered twice daily have been attempted to diminish DNA oxidative damage. Daily ingestion of 1,000 mg of vitamin C in combination with 800 IU of vitamin E is recommended for reducing lipoperoxide (LPO) levels. Nonetheless, exact parameters for recommendation of the effective dose of both vitamins are controversial [6, 7].

Therefore, the objective of the present study was to determine the dose of ascorbic acid and alpha-tocopherol required for diminishing oxidative stress and DNA damage in healthy elderly adults residing in Mexico City.

Subjects and Methods

Subjects and Design

After receiving previous informed consent, a double-blind controlled clinical assay was carried out in 66 healthy elderly adults who were randomly distributed into three groups (groups A, B and C) with 22 persons in each group. The investigation protocol was approved by the Ethics Committee of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Zaragoza Campus.

Group A received a placebo with a pharmaceuticals presentation similar to that of the treatment, whereas the elderly adults of group B were administered 500 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol. At the same time, group C received 1,000 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol. All these persons ingested the treatment daily during 6 months. Average age for each group was 66 ± 9 years (group A), 67 ± 6 years (group B), and 67 ± 6 years (group C). All these elderly adults were residents of Mexico City during the past 10 years.

Plasma TBARS

The TBARS assay was prepared as described by Jentzsch et al. [8]. In the TBARS assay, one molecule of malondialdehyde reacts with two molecules of thiobarbituric acid (TBA) and thereby produces a pink pigment with absorption peak at 535 nm. Amplification of peroxidation during the assay is prevented by the addition of the chain-breaking antioxidant, butyryl hydroxy toluene (BHT).

Total Antioxidant Status (TAS)

Antioxidant quantification was done using 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) radical formation kinetics (Randox Laboratories, Ltd., Crumlin, UK). The antioxidants present in plasma suppressed the bluish-green staining of the ABTS⁺ cation, which was proportional to the antioxidant concentration level. The kinetics was measured at 600 nm.

Red Blood Cell Superoxide Dismutase (SOD)

The method uses xantine and xantine oxidase (XOD) to generate superoxide radicals, which react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to form a red formazan dye. SOD activity was measured by degree of inhibition of the reaction (Randox Laboratories Ltd.). The kinetics was measured at 505 nm.

Red Blood Cell Glutathione Peroxidase (GPx)

In the presence of glutathione reductase and NADPH, the oxidation of glutathione (GSH) by cumene hydroperoxide is catalyzed by GPx. Oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted into the reduced form with a subsequent oxidation of NADPH to NADP⁺. Decrease in absorbance is measured at 340 nm (Randox Laboratories, Ltd.).

Alkaline Unicellular Electrophoresis (SCGE)

The alkaline unicellular electrophoresis assay using blood samples was done as described by Singh et al. [9]. A small volume (10 μ l) of cells was mixed in 75 μ l of 0.5% of agarose with low melting point, and the mixture was maintained at 37°C; 75 μ l of this mixture was then pipetted onto a slide coated with 180 μ l regular agarose and was immediately covered with a coverglass to make a microgel on the slide.

After lysis at 4°C for 1 h, slides were placed on the horizontal electrophoresis unit. The DNA was allowed to unwind for 20 min in an electrophoresis running buffer solution (300 mM NaOH and 1 mM Na₂ EDTA, pH 13). Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA.

DNA migration was analyzed on a $\times 20$ magnification on a Nikon Optiphot-2 microscope (Nikon, Japan) with fluorescence attachments (excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter of 590 nm), and extent of migration (i.e. image length, both head and tail of the comet) was measured with a scaled ocular. To evaluate DNA migration, 100 cells were scored for each person. The migration was calculated by taking the difference between length and diameter.

Measurement of Plasma Vitamin Concentrations

Vitamin C

Plasma ascorbic acid was stabilized immediately with equal amounts of 10% (w:v) meta-phosphoric acid. The precipitate was removed by centrifugation at 3,000 rpm for 10 min (4°C) and the protein-free supernatant was collected and stored at -80°C in amber vials before being analyzed. The concentration of ascorbic acid was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection [10].

Vitamin E

Vitamin E was analyzed by HPLC with an ultraviolet detector at 280 nm; it was measured in hexane extracts of EDTA-anticoagulated blood plasma [11].

Table 1. Biochemical characteristics of the elderly preintervention and after 6 months with antioxidant supplement

	Group A (n = 22)		Group B (n = 22)		Group C (n = 22)	
	baseline	6 months	baseline	6 months	baseline	6 months
Age, years	66 ± 9		67 ± 6		67 ± 6	
Glucose, mg/dl	103 ± 5	96 ± 3	99 ± 3	96 ± 2	102 ± 3	100 ± 3
Urea, mg/dl	35 ± 2	39 ± 1	35 ± 2	39 ± 1	36 ± 2	40 ± 1
Creatinine, mg/dl	0.8 ± 0.03	1.0 ± 0.04	0.9 ± 0.05	0.9 ± 0.04	0.9 ± 0.05	0.9 ± 0.04
Urate, mg/dl	4.4 ± 0.2	5.2 ± 0.3	4.8 ± 0.4	5.4 ± 0.2	4.5 ± 0.3	5.3 ± 0.4
Cholesterol, mg/dl	211 ± 9	221 ± 9	208 ± 7	216 ± 8	211 ± 6	216 ± 8
Triglycerides, mg/dl	178 ± 12	161 ± 20	174 ± 15	156 ± 18	187 ± 22	176 ± 20
HDL, mg/dl	59 ± 3	56 ± 3	54 ± 3	51 ± 4	55 ± 3	54 ± 2
Albumin, g/dl	4.5 ± 0.1	4.8 ± 0.07	4.4 ± 0.09	4.7 ± 0.04	4.7 ± 0.08	4.8 ± 0.07
Hemoglobin, g/dl						
Females	14.4 ± 0.2	13.0 ± 0.9	14.7 ± 0.3	14.6 ± 0.3	14.7 ± 0.3	14.6 ± 0.3
Males	16.4 ± 1.0	15.6 ± 0.5	16.0 ± 0.7	15.5 ± 0.5	15.6 ± 0.4	16.1 ± 0.2
Hematocrit, %						
Females	44.5 ± 0.6	43.2 ± 0.6	44.6 ± 1.0	44.4 ± 0.9	44.8 ± 1.0	44.6 ± 1.0
Males	50.3 ± 3.0	47.5 ± 1.6	49.2 ± 2.0	47.5 ± 1.9	48.0 ± 0.6	49.0 ± 1.2
Total leukocytes/mm ³	5,674 ± 243	5,465 ± 265	5,772 ± 196	5,631 ± 324	6,510 ± 296	5,842 ± 301

Values are means ± SE; ANOVA $p > 0.05$. Group A (placebo), group B (500 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E), group C (1,000 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E).

Assays Variation Coefficient

The intra- and interassay coefficients of variation were less than 5% in all the determinations. The within-run precision for the markers were as follows: DNA damage by comet assay 5.2%; LPO by TBARS assay 4.6%; red blood cell SOD activity with commercial kit Randox Laboratories 3.8%; red blood cell GPx activity with commercial kit Randox Laboratories 6%; TAS activity with commercial kit Randox Laboratories 4.3%; concentration of vitamins C and E in plasma measured by HPLC 5.6 and 6.3%, respectively.

Statistical Analysis

Data were processed by standard statistical software SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Descriptive statistics are analyzed by means ± SE. Results were analyzed using analysis of variance (ANOVA). $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Biochemical Characteristics

The biochemical characteristics of all three study groups remained within reference values prior to and after the 6 treatment months (table 1).

Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol Concentrations

By comparing average ascorbic-acid concentration of elderly adults estimated before and after the 6 treatment

Table 2. Mean values ± SE of plasma vitamin C and vitamin E in the elderly preintervention and after 6 months with antioxidant supplement

	Baseline	6 months
Ascorbic acid, μM		
Group A	42.4 ± 4.5	51.1 ± 5.3
Group B	47.1 ± 5.1	80.7 ± 6.3* (+71%)
Group C	40.3 ± 3.1	82.4 ± 10* (+104%)
Alpha-tocopherol, μM		
Group A	25.8 ± 2.1	23.5 ± 1.5
Group B	27.9 ± 2.7	32.3 ± 2.2 (+16%)
Group C	26.2 ± 3.3	31.6 ± 2.9 (+20%)

Values are means ± SE. * ANOVA $p < 0.01$.

Group A (placebo); group B (500 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E); group C (1,000 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E).

months, we observed, on the one hand, a significant increase in group B (baseline, 47.1 ± 5.1; 6 months, 80.7 ± 6.3; $p < 0.01$) as well as in group C (baseline, 40.3 ± 3.1; 6 months, 82.4 ± 10; $p < 0.001$). On the other hand, alpha-tocopherol levels in plasma showed no statistically significant increases in groups B and C; likewise, in group

Table 3. Mean values \pm SE of plasma TBARS, total antioxidant status, and activity of antioxidant enzymes (SOD and GPX) before and after supplementation

	Baseline	6 months
Plasma TBARS, μM		
Group A	0.31 \pm 0.022	0.27 \pm 0.021
Group B	0.30 \pm 0.015	0.27 \pm 0.018
Group C	0.31 \pm 0.011	0.26 \pm 0.018
Total antioxidant status (TAS), mM		
Group A	0.85 \pm 0.032	0.82 \pm 0.018
Group B	0.85 \pm 0.031	0.90 \pm 0.027
Group C	0.84 \pm 0.033	0.93 \pm 0.027
Superoxide dismutase (SOD), U/l		
Group A	166.8 \pm 1.6	172.4 \pm 2.2
Group B	165.9 \pm 2.5	171.8 \pm 1.7
Group C	167.4 \pm 2.1	173.0 \pm 1.3
Glutathione peroxidase (GPx), U/l		
Group A	5,832 \pm 510	6,773 \pm 481
Group B	5,502 \pm 413	7,407 \pm 664
Group C	6,004 \pm 529	8,262 \pm 519

Values are means \pm SE. ANOVA $p > 0.05$.

Group A (placebo); group B (500 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E); group C (1,000 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E).

A (placebo) a decrease in the concentration of this vitamin was found, although this difference was not statistically significant ($p > 0.05$) (table 2).

Treatment Type-Related TBARS, TAS, SOD, and GPx

On evaluating TBARS levels, we found that after their 6-month treatment, elderly adults in group C who were administered 1,000 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E showed lower concentrations (0.31 \pm 0.011 vs. 0.26 \pm 0.018). Nevertheless, this difference was not statistically significant ($p > 0.05$). Similarly, TAS did not exhibit a significant increase (0.84 \pm 0.15 vs. 0.93 \pm 0.13; $p > 0.05$) (table 3). With respect to SOD and GPx activity, neither enzyme demonstrated a statistically significant increase ($p > 0.05$) after 6 treatment months in both groups B and C (table 3).

Damage-Associated DNA

After 6 months of intervention, we observed DNA damage decreases from 45–41% and 50–45% in groups B and C, respectively, and an increase from 45–59% in group A. However, these differences were not statistically significant in any of the three groups (table 4).

Table 4. Elderly with DNA damage preintervention and after 6 months with antioxidant supplement

DNA damage	Baseline	6 months
Positive (%)		
Group A	10 (45)	13 (59)
Group B	10 (45)	9 (41)
Group C	11 (50)	10 (45)
Negative (%)		
Group A	12 (55)	9 (41)
Group B	12 (55)	13 (59)
Group C	11 (50)	12 (55)

χ^2 test $p > 0.05$ (baseline vs. 6 months after supplementation). The data indicate number of subjects with and without DNA damage.

Group A (placebo); group B (500 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E); group C (1,000 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E).

Similarly, on analyzing average damaged DNA migration with respect to treatment type, we found that this migration within group A showed a trend to increase only after 6 months of treatment. Again, this difference was not statistically significant (33.74 \pm 3.2 vs. 40.89 \pm 5.4 μm ; $p = 0.18$); nonetheless, average migrations in treatment groups B and C before and after treatment were similar (group B, 31.03 \pm 2.6 vs. 30.33 \pm 3.0 μm , and group C, 34.98 \pm 2.9 μm vs. 33.89 \pm 3.3 μm) (fig. 1).

Discussion

It has been noted that chronic administration of antioxidant vitamins has not provided any consistent biologic benefit [6]. The results of this study show that serum levels of ascorbic acid significantly increase after 6 months of treatment, with an increase of 71% when subjects are administered daily doses of 500 mg, and with an increase of 104% with daily doses of 1,000 mg, the latter in agreement with reports on ascorbic acid bioavailability, as well as the relationship between oral doses and relatively smaller increases in plasma concentration from dose concentrations. It was shown that bioavailability of ascorbic acid is not linear, and that without this process it follows a sigmoidal curve [12, 13].

In our study, the effect of ascorbic acid on OxS was not evident. As a result, TBARS concentration showed no statistically significant decrease, nor did TAS, SOD, and

GPX activity exhibit significant changes with respect to the treatments of groups B and C. In this regard, these results could be linked with the pro-oxidant effect of ascorbic acid reported in several studies [14, 15].

In the present study, we administered 400 IU of alpha-tocopherol daily, considering that this dose is the most frequently prescribed for prevention and treatment of chronic-degenerative diseases [16]. Nevertheless, we found no significant changes after 6 months of ingestion of 400 IU, solely observing increases of 16 and 20% in groups B and C, respectively. In this study, it was demonstrated that absorption of vitamin E is only slightly effective, with a reported range of 20–40%, in addition to the fact that the presence of biliary salts is necessary for the formation of micelles that permit their absorption. Thus, plasmatic concentrations obtained in this study are in agreement with those reported by Huang et al. [17].

A synergic effect of alpha-tocopherol plus ascorbic acid on diminution of lipid oxidation and a consequent OxS decrease has been demonstrated [6, 18]. Nevertheless, in this study we did not observe a significant decrease ($p > 0.05$) of TBARS in group C (1,000 mg of vitamin C plus 400 IU of vitamin E). This result is opposite to that reported by McCall and Frei [6], in which administration of 1,000 mg of vitamin C and 800 IU of vitamin E significantly diminished lipoperoxidation levels and to that reported by Butterfield et al. [18], in which 1,000 mg of vitamin C and 400 IU of vitamin E prevented lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer disease. In addition, several studies have reported a pro-oxidant effect of alpha-tocopherol [19–21].

It has been demonstrated recently in two meta-analysis studies that high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality; nevertheless, vitamin C probably exerts no effect on mortality [22, 23]. Although the mechanism of the negative effect of antioxidant supplements on mortality is not known, it has been proposed that eliminating free radicals from our organisms could interfere with certain essential defensive mechanisms such as apoptosis, phagocytosis, and detoxification [22].

Thus, high-dosage prescription of vitamin E for prevention and/or control of chronic-degenerative diseases during aging is not justified because it is potentially hazardous and its efficacy is uncertain.

Some studies have shown that stressful environments provoke a wearing down of TAS and that, therefore, a greater dose of antioxidants is required [24, 25]. Likewise, it has been reported that lower doses of the previously mentioned vitamins exert no significant effect on TAS [26].

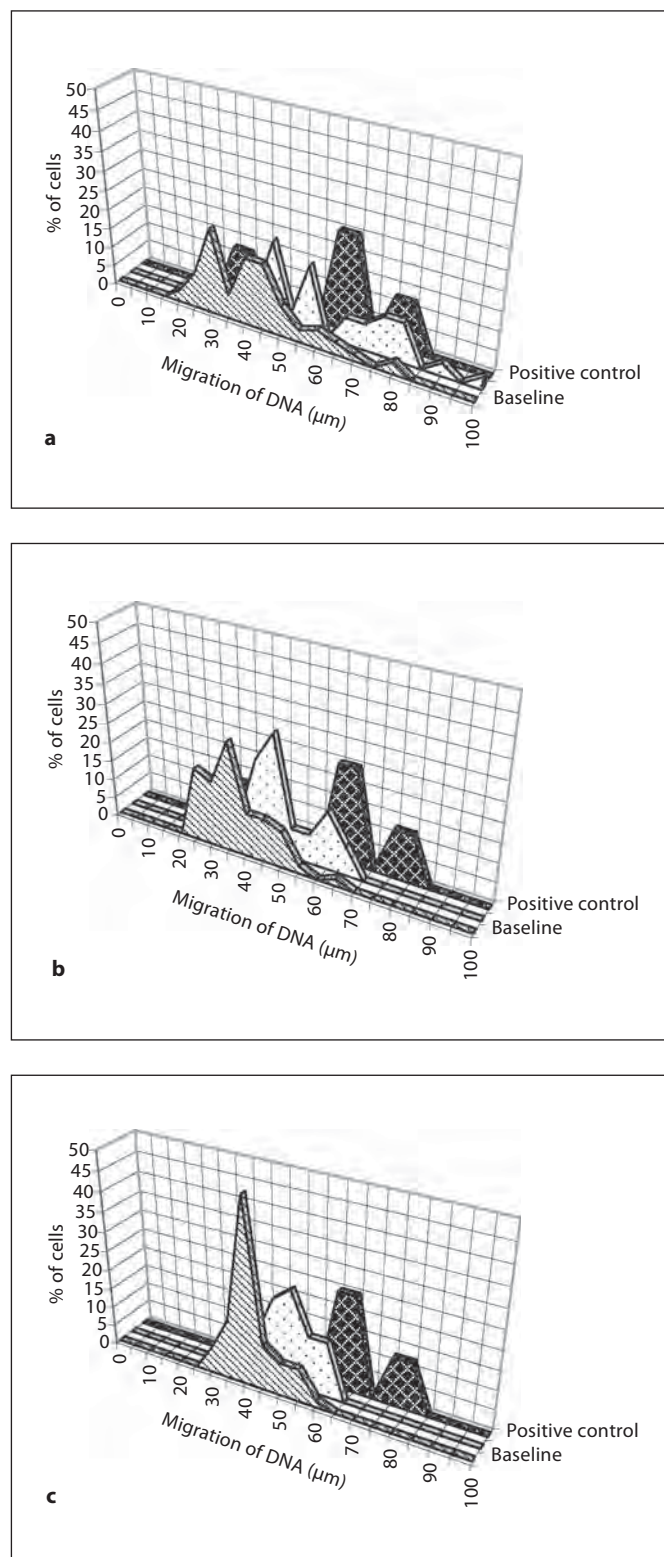


Fig. 1. **a** Trend to increase the DNA migration of cells after 6 months of treatment in the placebo group. **b, c** Both groups of antioxidant treatment do not exhibit differences in DNA migration of cells after 6 months with them.

In this respect, the behavior of this marker after 6 months of treatment exhibited no significant changes in either group (B and C). Therefore, the results of our study showed that high doses could not be useful for improving TAS and for counterarresting OxS in elderly adults residing in urban areas such as Mexico City for avoiding or deferring the presence of chronic-degenerative diseases.

Concerning SOD and GPx enzymatic activities, these are considered the primary defense of biomolecules against oxidative damage. These become activated when the organism is confronted with stressful situations [27]. In this study, the enzymatic activities of SOD and GPx were not observed to increase significantly after 6 months of intervention with treatments in groups B and C, contrary to that reported by some authors, who observed that an antioxidant supplement can regulate and increase the activity of both enzymes [28, 29]. In this regard, the potential pro-oxidant effect of vitamins C and E could explain our results, because elderly persons residing in Mexico City are highly exposed to environmental pollution, which increases OxS [30].

With respect to DNA damage, it has been reported that this increases with aging and TAS diminution [31,

32]. Thus, the consumption has been proposed of antioxidant vitamins, which have shown their usefulness in *in vitro* studies for protecting DNA from oxidative damage [33]. In the case of studies in humans, results have been inconsistent [6, 34]. Our data showed no statistically significant differences ($p > 0.05$) in DNA damage in elderly adults with or without antioxidant treatment. This is consistent with the low effect of vitamins C and E on OxS.

Concerning total mean DNA damage migration in the three groups after 6 months of treatment, a trend toward increased DNA damage in group A (placebo treatment) was observed without statistically significant differences. Similarly, groups administered antioxidants maintained mean total migration. These results suggest that antioxidant treatment may not have a preventive effect against DNA damage.

Acknowledgements

This study was supported by grants DGAPA, UNAM PAPIIT IN310305 and CONACyT 176579.

References

- Ji LL: Exercise at old age: Does it increase or alleviate oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 2001;928:236–247.
- Panda K, Chattopadhyay R, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB: Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 2000;29:115–124.
- Cederbaum AI: Introduction—serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1524–1526.
- Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA: Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:367–381.
- Rock CL, Jacob RA, Bowen PE: Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and carotenoids. *J Am Diet Assoc* 1996;96:693–702.
- McCall MR, Frei B: Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med* 1999;26:1034–1053.
- Cheng T, Zhu Z, Masuda S, Morcos NC: Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. *J Nutr Biochem* 2001;12:388–395.
- Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK: Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251–256.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–191.
- Lee W, Hamernyk P, Hutchinson M, Raisys VA, Labbe RF: Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid-chromatographic assay. *Clin Chem* 1982;28:2165–2169.
- Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL: Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 1979;32:2143–2149.
- Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y: Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* 1999;281:1415–1423.
- Padayatty SJ, Daruwala R, Wang Y, Eck PK, Song J, Koh SW, Levine M: Vitamin C: from molecular actions to optimum intake; in Cardenas E, Packer L (eds): *Handbook of Antioxidants*. New York, Marcel Dekker, 2002, pp 117–145.
- Ashidate K, Kawamura M, Tohda H, Miyazaki S, Hayashi H, Teramoto T, Hirata Y: Ascorbic acid augments cytotoxicity induced by oxidized low-density lipoprotein. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:7–12.
- Martin BD, Schoenhard JA, Hwang JM, Sugden KD: Ascorbate is a pro-oxidant in chromium-treated human lung cells. *Mutat Res* 2006;610:74–84.
- Traber MG: Vitamin E Bioavailability, biokinetics, and metabolism; in Cardenas E, Packer L (eds): *Handbook of Antioxidants*. New York, Marcel Dekker, 2002, pp 99–108.
- Huang HY, Appel LJ, Croft KD, Miller ER 3rd, Mori TA, Puddey IB: Effects of vitamin C and vitamin E on *in vivo* lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2002;76:549–555.
- Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V: Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2002;13:444–461.
- Weinberg RB, Vander Werken BS, Anderson RA, Stegner JE, Thomas MJ: Pro-oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1029–1033.

- 20 Winterbone MS, Sampson MJ, Saha S, Hughes JC, Hughes DA: Pro-oxidant effect of alpha-tocopherol in patients with type 2 diabetes after an oral glucose tolerance test: a randomised controlled trial. *Cardiovasc Diabetol* 2007;6:8. Available From: <http://www.cardiab.com/content/6/1/8>.
- 21 Pearson P, Lewis SA, Britton J, Young IS, Fogarty A: The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo. *Bio-Drugs* 2006;20:271–273.
- 22 Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C: Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007;297:842–857.
- 23 Miller ER III, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E: Meta-analysis: high dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005;142:37–46.
- 24 Bendich A: Physiological role of antioxidants in the immune system. *J Dairy Sci* 1993;76:2789–2794.
- 25 Barnett YA, King CM: An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 1995;338:115–128.
- 26 Nelson JL, Bernstein PS, Schmidt MC, Von Tress MS, Askew EW: Dietary Modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels and markers of oxidative stress in older humans. *J Nutr* 2003;133:3117–3123.
- 27 Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P: Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997;43:562–568.
- 28 De Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I: Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Gen* 1996;5:283–292.
- 29 Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yilmaz T, Sahap Kukner A: Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res* 2005;75:71–80.
- 30 Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Ruiz-Ramos M, Muñoz-Sánchez JL, Vargas-Guadarrama LA, Mendoza-Núñez VM: Efficient antioxidant capacity against lipid peroxide levels in healthy elderly of Mexico City. *Environ Res* 2005;97:322–327.
- 31 Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrell CH, Schneider EL: Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991;256:1–6.
- 32 Mendoza-Núñez VM, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Vargas-Guadarrama LA, Altamirano-Lozano MA: Total antioxidant levels, gender, and age as risk factors for DNA damage in lymphocytes of the elderly. *Mech Age Dev* 2001;122:835–847.
- 33 Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J: Antioxidant vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 2001;491:1–7.
- 34 Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR: Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996;56:1291–1295.

ORIGINAL ARTICLE

Influence of the placebo effect on oxidative stress in healthy older adults of Mexico City

R. Retana-Ugalde* MD, L. A. Vargas† PhD, M. Altamirano-Lozano‡ PhD and V. M. Mendoza-Núñez* PhD

*Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F., †Instituto de Investigaciones Antropológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F. and ‡Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico

SUMMARY

Background: The placebo effect has been widely recognized in the randomized clinical trials; nevertheless, this effect has not been evaluated in terms of antioxidant therapy on oxidative stress (OxS).

Objective: The objective of this study was to determine the influence of the placebo effect on OxS in healthy older adults of Mexico City.

Methods: We carried out a double-blind controlled clinical assay with the participation of 75 healthy older adults residents for the past 10 years of Mexico City; randomly distributed into three groups of 25 subjects each after previous informed consent; control group not received any treatment, placebo group received a placebo with a pharmaceutical presentation similar to that of the treatment, whereas treatment group were administered 1000 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol. All subjects ingested the treatment daily according to study group for 12 months. We measured before and after 12 months of treatment, lipoperoxides levels (LPO), erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and total plasma antioxidant status with Randox Laboratories Ltd kits. The concentration of ascorbic acid and alpha-tocopherol were measured using high-performance liquid chromatography.

Results: The placebo group subjects showed a statistically significant decrease in LPO concentration, in the same way as the treatment group subjects ($P < 0.01$), both in comparison with a control group.

Conclusion: Our findings suggest that the placebo has a significant effect on OxS.

Keywords: antioxidants, glutathione peroxidase, older adults, oxidative stress, placebo, superoxide dismutase

INTRODUCTION

The placebo effect is widely recognized and forms the basis for placebo-controlled randomized clinical trials. The relation mind–body has a significant impact on both physiological and physiopathologic mechanisms, and consequently the health of the subject. For this reason, the placebo effect has been a subject of discussion in diverse forums. One focus is to identify the psychosomatic mechanisms for placebo-induced therapeutic effects (1, 2).

Experimental data currently support two general theories: conditioning and expectancy. The first proposes that bodily changes occur when the subject is exposed to stimulus that has been linked in the past to active processes that produce the change; the second proposes that the bodily changes occur to the extent that the subject expects them to (treatment) (1, 3).

Likewise, the most interesting research has focused on three pathways: (i) endorphins and catecholamines; (ii) cortisol; and (iii) psychoneuroimmunology. All are capable of altering

Received 7 April 2008, Accepted 10 January 2009

Correspondence: V. M. Mendoza-Núñez. Batalla 5 de mayo s/n, esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, 09230 México, D.F., México. Tel.: +52 55 5623-0721; fax: +52 55 5773 6330; e-mail: mendovic@servidor.unam.mx

bodily symptoms, and all are known to be connected intimately with an individual's emotional and cognitive state (1, 4).

On the other hand, chronic psychosocial stress may increase oxidative stress (OxS) and contribute to the aetiology of chronic-degenerative diseases, and ageing through free-radical mechanisms. In this sense, the transcendental meditation programme has been shown to decrease lipid peroxide levels (LPO) (5), a possible mechanism for the placebo effect. Also, some authors indicate that 30% of subjects respond to placebos when they use pharmaceutical similar forms to a particular treatment (1, 2, 6). For this reason, in this study we investigated the influence of placebo on OxS in a randomized controlled trial and compared it with the effect of antioxidant vitamins in older people.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and design

A double-blind controlled clinical trial was undertaken with the participation of 75 healthy older adults, who each provided signed informed consent. The subjects were randomly assigned to three groups of 25 subjects each (treatment, placebo and control groups). With a sample size of 25 per group, a significance level 5% and a difference in clinical interest of 20% relative to control, the power of the study was 77%.

Treatment and placebo groups received two chewing tablets containing active vitamin C (500 mg/tablet) or corresponding placebo (sugar compressible, cellulose, povidone, magnesium stearate, orange flavour and yellow no. 6), and soft gels capsules containing active vitamin E (400 IU DL- α -tocopheryl acetate/capsule) or a corresponding placebo (soybean oil). All subjects ingested the treatment daily according to study group during 12 months. Average age for each group was 65 ± 8 years (control group), 67 ± 8 years (placebo group) and 65 ± 10 years (treatment group), all residents in Mexico City for the past 10 years.

We had the same personal contact with the three groups. All groups had a monthly meeting with the research team. In this meeting, the subjects were informed about life-style conducive to successful ageing. Likewise, the placebo and treatment groups

were informed about antioxidant effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol.

We measured the following in all participants: LPO levels; superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity, before and after therapeutic intervention. The investigation protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Zaragoza Campus.

Blood and biochemical analyses

Haemoglobin levels were measured by the cyanomethaemoglobin reaction procedure (cut-off points: males, 12.17–17.26 g/dL, females, 11.48–16.25 g/dL). Hematocrit levels were assessed by the microhematocrit procedure (cut-off points: males, 38–52%, females, 36–51%). Leucocyte count was done by the Neubauer chamber procedure (cut-off points: 3500–10650/mm³).

Glucose, urea, creatinine, urate, albumin, cholesterol, triglycerides and HDL concentration levels were determined using an Eclipse autoanalyser (Merck, Mexico). Specifically, glucose levels were measured by the glucose oxidase method (cut-off points: 63–120 mg/dL), urea levels were measured by the Berthelot urease method (cut-off points: 9.5–47 mg/dL), creatinine levels by the Jaffe method without deproteinization (cut-off points: males, 0.3–1.5 mg/dL; females, 0.3–1.3 mg/dL) and urate levels by the uricase colorimetric method (cut-off points: males, 2.9–8.88 mg/dL; females, 2.5–8.7 mg/dL). Albumin levels were measured with the bromocresol green technique (3.23–4.03 g/dL).

Cholesterol was analysed using the CHOD-PAP technique (cut-off points: 168–200 mg/dL), triglycerides by the GPO-Trinder technique (cut-off points: 89–190 mg/dL), whereas HDL were assessed using the same technique for cholesterol after precipitation of low and very low lipoproteins, using a phosphotungstic acid/magnesium chloride solution (cut-off points: 42–77 mg/dL).

All reagents employed in biochemical tests were obtained from Randox Laboratories Ltd (Crumlin Co, Antrim, UK). Cut-off points for reference values were determined at the Gerontologic Clinical Research Laboratory of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Zaragoza Campus, in Mexico City (7).

Plasma TBARS

We used the TBARS assay. It was performed as described by Jentzsch *et al.* (1996) (8). In the TBARS assay, one molecule of malondialdehyde reacts with two molecules of thiobarbituric acid (TBA) with production of a pink pigment with absorption at 535 nm. Amplification of peroxidation during the assay is prevented by the addition of the chain-breaking antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT).

Plasma (400 μ L) or MDA standard (0.2–4 μ mol/L) prepared by hydrolysis of 1,1,3,3-tetra-methoxypropane (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) was mixed with 400 μ L orthophosphoric acid (0.2 mol/L) (Sigma Chemical Co) and 50 μ L BHT (2 mmol/L) (Sigma Chemical Co) in 12 \times 72-mm tubes. Then, we added 50 μ L TBA reagent (0.11 mol/L in 0.1 mol/L NaOH) (Fluka Chem, Buchs, Switzerland) and mixed the contents, subsequently, the contents were incubated at 90 °C for 45 min in a water bath. The tubes were put on ice to stop the reaction. TBARS were extracted once with 1000 μ L *n*-butanol (Sigma Chemical Co). The upper butanol phase was read at 535 and 572 nm to correct for baseline absorption in UV-spectrophotometer (Shimadzu, Columbia, MD, USA). MDA equivalents (TBARS) were calculated using the difference in absorption at two wavelengths and quantification was done with calibration curve.

Red blood cell SOD

The method employs xantine and xantine oxidase to generate superoxide radicals, which react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to form a red formazan dye. SOD activity was measured by degree of inhibition of the reaction (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) Kinetics was measured at 505 nm.

Red blood cell GPx

Glutathione peroxidase catalyses oxidation of glutathione (GSH) by cumene hydroperoxide, in presence of glutathione reductase and NADPH; oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted into the reduced form with concomitant oxidation of NADPH to NADP⁺. Decrease in absorbance at 340 nm is measured (Randox Laboratories).

Measurement of plasma vitamin concentrations

Ascorbic acid Plasma ascorbic acid was stabilized immediately with equal amount of 10% (w/v) meta-phosphoric acid. The precipitate was removed by centrifugation at 1620 g for 10 min (4 °C) and the supernatant was stored at –80 °C in amber vials. The concentration of ascorbic acid was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection (9).

Alpha-tocopherol Alpha-tocopherol was analysed by HPLC with ultraviolet detector at 280 nm. Samples were measurement in hexane extracts of EDTA-anticoagulant blood plasma (10).

Assays variation coefficient The intra- and inter-assay variation coefficients were less 5% in all the determinations. The within-run precision for the markers were as follows: LPO by TBARS assay 4.6%; red blood cell SOD activity with commercial kit Randox Laboratories 3.8%; red blood cell GPx activity with commercial kit Randox Laboratories 6%; concentration of vitamins C and E in plasma measured by HPLC 5.6% and 6.3% respectively.

Statistical analysis

Data were processed by use of standard statistical software SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Descriptive statistics are mean \pm standard error (SE). Results were analysed using ANOVA with repeated measure and *post hoc* Dunnett test. A *P*-value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Biochemical characteristics

Biochemical characteristics of the three study groups remained within reference values before and after the 12 months of treatment. (Table 1).

Ascorbic acid and alpha-tocopherol concentrations

If we compare the average ascorbic acid concentration evaluated before and after 12 months of treatment, we observe lower concentrations in the placebo group. Although there is not statistically significant difference with respect to the

Table 1. Biochemical characteristics of study participants before and post-treatment

	Control group		Placebo group		Treatment group	
	<i>n</i> = 25		<i>n</i> = 25		<i>n</i> = 25	
	Basal	Post-treatment	Basal	Post-treatment	Basal	Post-treatment
Age (years)	65 ± 1.3		67 ± 1.5		65 ± 2.2	
Glucose (mg/dL)	106 ± 7	106 ± 4	110 ± 7	89 ± 4	101 ± 8	85 ± 4
Urea (mg/dL)	27 ± 2	30 ± 1	33 ± 2	35 ± 1	31 ± 2	35 ± 1
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.04	0.9 ± 0.03	1.0 ± 0.04	0.9 ± 0.04	0.9 ± 0.04
Urate (mg/dL)	4.5 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.5 ± 0.3	4.4 ± 0.2	5.1 ± 0.3	4.2 ± 0.3
Cholesterol (mg/dL)	211 ± 8	198 ± 8	206 ± 8	196 ± 8	202 ± 8	205 ± 9
Triglycerides (mg/dL)	164 ± 13	165 ± 17	155 ± 13	140 ± 17	148 ± 14	176 ± 18
HDL (mg/dL)	51 ± 2	50 ± 2	49 ± 2	51 ± 2	53 ± 2	54 ± 2
Albumin (g/dL)	4.5 ± 0.09	4.3 ± 0.08	4.5 ± 0.09	4.7 ± 0.08	4.4 ± 0.09	4.7 ± 0.09
Haemoglobin (g/dL)						
Women	14.3 ± 0.3	14.9 ± 0.3	15.1 ± 0.3	14.5 ± 0.3	14.3 ± 0.3	14.4 ± 0.3
Men	15.9 ± 0.4	16.7 ± 0.4	16.6 ± 0.5	16.0 ± 0.4	15.6 ± 0.5	15.7 ± 0.5
Hematocrit (%)						
Women	45.6 ± 0.9	45.5 ± 0.9	46.6 ± 0.9	44.4 ± 0.9	44.2 ± 0.9	43.8 ± 0.9
Men	50.6 ± 1.3	50.7 ± 1.4	50.1 ± 1.3	49.4 ± 1.5	47.2 ± 1.6	49.4 ± 1.8
Total leucocytes/mm ³	6974 ± 286	5996 ± 261	6250 ± 290	6262 ± 266	6293 ± 311	6100 ± 285

Mean value ± SE (standard error) ANOVA with repeated measure and *pos hoc* Dunnett test.

control group. Regarding to the treatment group we found a significant higher concentration of ascorbic acid after 12 months of antioxidant treatment. The same behaviour was observed for alpha-tocopherol plasma levels (Table 2).

Table 2. Mean values ± SE of plasma vitamins C and E in older people preintervention and after 12 months of antioxidant supplement

	Baseline	Measure 12 months after
Ascorbic acid (μmol/L)		
Control group	51.0 ± 6.1	42.9 ± 10.1
Placebo group	51.1 ± 6.2	47.5 ± 10.3
Treatment group	50.8 ± 6.1	91.6 ± 10.1 (+80%) ^a
Alpha-tocopherol (μmol/L)		
Control group	28.2 ± 2.8	22.8 ± 4.7
Placebo group	31.4 ± 3.7	24.5 ± 6.2
Treatment group	26.6 ± 3.3	50.6 ± 5.5 (+90%) ^b

Mean value ± SE (standard error) ANOVA with repeated measure and *pos hoc* Dunnett test.

^aAscorbic acid: control group vs. treatment group, *P* < 0.05.

^bAlpha-tocopherol: control group vs. treatment group, *P* < 0.05.

Treatment type-related LPO, SOD and GPx

On evaluating LPO levels, we observed that after 12 months of treatment the older adults in placebo and treatment groups showed significantly lower concentrations (*P* < 0.01); however, the control group did not show changes. GPx activity was found to be significantly higher in treatment group vs. control group (*P* < 0.001). The placebo and control groups did not show any significant changes. The SOD activity showed no difference between groups (Table 3).

DISCUSSION

Randomized placebo-controlled clinical trials continue to be the standard by which researchers determine which treatments are effective. In this respect, it is recognized that the placebo does not possess a pharmacological effect *per se*, although it may exert a biological effect on the patient (3).

From the methodological point of view, the use of placebos in this type of study aims to obtain the same precision in clinical experiments as with laboratory studies (11, 12). Several studies have shown that

Table 3. Mean values \pm SE of LPO, SOD and GPx preintervention and after 12 months of antioxidant supplement

	Baseline	Measure 12 months after
Lipoperoxides (LPO) ($\mu\text{mol/L}$)		
Control group	0.29 \pm 0.03	0.31 \pm 0.02
Placebo group	0.29 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02 ^a
Treatment group	0.31 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02 ^a
Superoxide dismutase (SOD) (UI/L)		
Control group	169.1 \pm 1.0	170.9 \pm 0.9
Placebo group	170.4 \pm 1.2	173.4 \pm 1.1
Treatment group	170.5 \pm 1.2	171.5 \pm 1.2
Glutathione peroxidase (GPx) (UI/L)		
Control group	7891 \pm 390	7447 \pm 324
Placebo group	7495 \pm 524	8920 \pm 794
Treatment group	8263 \pm 454	12467 \pm 687 ^b

Mean value \pm SE (standard error) ANOVA with repeated measure and *post hoc* Dunnett test.

^aLPO: control group A vs. placebo group B, $P < 0.01$; control group vs. treatment group, $P < 0.05$.

^bGPx: control group vs. treatment group, $P < 0.001$.

vitamins C and E administered at different concentrations exert an antioxidant effect that prevents or reduces the formation of OxS and certain chronic-degenerative diseases, such as diabetes mellitus, cancer, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, cataracts and Alzheimer disease (13–17). Likewise, the synergetic effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid in reducing lipid-oxidation and leading to a consequential decrease of OxS has been demonstrated (18–20). Nevertheless, the placebo effect, which has not been evaluated in terms of antioxidant therapy on OxS, can exert a biological and therapeutic effect through conditioning and expectancy effects. In this study, we found a statistically significant decrease ($P < 0.01$) of LPO in both the placebo and treatment groups. The results of the treatment group are similar to those reported by other (21, 22). In the placebo group, LPO levels were 31% lower than in the control group, most likely through multiple factors. In this regard, administration of antioxidant therapy acts as a conditioning stimulus to exert a biochemical effect; thus, the administration of a pharmaceutical placebo induces a response similar to that seen with the treatment. This effect has been shown to involve various physiopathologic mechanisms (1, 3).

Within the framework of psychosomatic medicine, subjects given placebos without antioxidant vitamins have been reported to show sustained beneficial effect on LPO serum levels (23). Physical and mental relaxations produced by transcendental meditation have also been reported to significantly reduce LPO levels (5).

On the other hand, it has been observed that there is a positive correlation between psychological stress levels and cortisol and beta-endorphin levels; in this case, the placebo effect is capable of interacting with the neurobiochemical system and decreases LPO levels (24–26).

Superoxide dismutase and GPx antioxidant-enzyme activity, act as the primary defence against oxidative damage to allow the organism to withstand stressful situations (27). In this study, SOD enzymatic activity was maintained without significant changes in all three study groups; however, GPx activity increased significantly 12 months in the group administered vitamins, as has been reported by some authors (28–32).

In the placebo group, we observed a 19% increase in GPx but this difference was not statistically significant. Motivational and expectation effects of placebo have been reported to cause biochemical changes (33, 34).

CONCLUSION

Our findings suggest that the placebo effect is seen as changes in OxS. Therefore, we suggest that the antioxidant action of vitamins C and E may well be, at least partly, due to the placebo effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants DGAPA, UNAM PAPIIT IN310305 and CONACyT 176579.

REFERENCES

1. Brody H (2000) The placebo response. *Journal of Family Practice*, **49**, 649–654.
2. Ernst E, Resch KL (1995) Concept of true and perceived placebo effects. *British Medical Journal*, **311**, 551–553.
3. Wikinski S (2003) ¿Que sabemos acerca del mecanismo de acción del placebo? *Vertex*, **14**, 59–64.

4. Amanzio M, Benedetti F (1999) Neuropharmacological dissection of placebo analgesia: expectation-activated opioid systems versus conditioning-activated specific subsystem. *Journal of Neuroscience*, **19**, 484–494.
5. Schneider RH, Nidich SI, Salerno JW *et al.* (1998) Lower lipid peroxide levels in practitioners of transcendental meditation program. *Psychosomatic Medicine*, **60**, 38–41.
6. Macedo A, Farré M, Baños J-E (2003) Placebo effect and placebos: what are we talking about? Some conceptual and historical considerations. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **59**, 337–342.
7. Sánchez-Rodríguez M, Mendoza-Núñez VM, García-Sánchez A, González-González B, Rodríguez-Torres E, González-Obregón A (1998) Valores de referencia para una población de ancianos y adultos de la Ciudad de México. Parámetros bioquímicos y hematológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **32**, 812–821.
8. Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20**, 251–256.
9. Lee W, Hamernyk P, Hutchinson M, Raisys VA, Labbe RF (1982) Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid-chromatographic assay. *Clinical Chemistry*, **28**, 2165–2169.
10. Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL (1979) Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *American Journal of Clinical Nutrition*, **32**, 2143–2149.
11. Kaptchuk T (2001) The double-blind, randomized, placebo-controlled trial: gold standard or golden calf? *Journal of Clinical Epidemiology*, **54**, 541–549.
12. Vickers AJ, de Craen AJ (2000) Why use placebos in clinical trials? A narrative review of the methodological literature *Journal of Clinical Epidemiology*, **53**, 157–161.
13. Satchek JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB (2003) Effect of vitamin E and eccentric exercise on select biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radical Biology & Medicine*, **34**, 1575–1588.
14. Stampfer MJ, Rimm EB (1995) Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 1365S–1369S.
15. Bozkır A, Şimşek B, Güngör A, Torun M (1999) Ascorbic acid and uric acid levels in lung cancer patients. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **24**, 43–47.
16. George J, Nuttall SL, Kendall MJ (2001) Prostate cancer and antioxidants. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **26**, 231–233.
17. Cantuxti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2000) Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **18**, 367–381.
18. Hallfrisch J, Muller D, Singh V (1994) Vitamin A and E intakes and plasma concentrations of retinol, β -carotene, and α -tocopherol in men and women of Baltimore longitudinal study of aging. *American Journal of Clinical Nutrition*, **60**, 176–182.
19. Fletcher A, Breeze E, Shetty P (2003) Antioxidant vitamins and mortality in older persons: findings from the nutrition add-on study to the Medical Research Council Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78**, 999–1010.
20. Fairfield K, Fletcher R (2002) Vitamins for chronic disease prevention in adults. *The Journal of the American Medical Association*, **287**, 3116–3126.
21. McCall MR, Frei B (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology & Medicine*, **26**, 1034–1053.
22. Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V (2002) Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 444–461.
23. de Pascalis V, Chiaradia C, Carotenuto E (2002) The contribution of suggestibility and expectation to placebo analgesia phenomenon in an experimental setting. *Pain*, **96**, 393–402.
24. Johansen O, Brox J, Flaten MA (2003) Placebo and nocebo responses, cortisol, and circulating beta-endorphin. *Psychosomatic Medicine*, **65**, 786–790.
25. Sharma H, Sen S, Singh A, Bhardwaj NK, Kochupillai V, Singh N (2003) Sudarshan Kriya practitioners exhibit better antioxidant status and lower blood lactate levels. *Biological Psychology*, **63**, 281–291.
26. Scarpellini F, Sbracia M, Scarpellini L (1994) Psychological stress and lipoperoxidation in miscarriage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **709**, 210–213.
27. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P (1997) Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*, **43**, 562–568.
28. de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I (1996) Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Human Molecular Genetics*, **5**, 283–292.

29. Adachi T, Wang J, Wang XL (2000) Age-related change of plasma extracellular-superoxide dismutase. *Clinica Chimica Acta*, **290**, 169–178.
30. Husain K (2003) Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and antioxidants in plasma of rats. *Pathophysiology*, **10**, 47–56.
31. Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yilmaz T, Sahap Kukner A (2005) Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **75**, 71–80.
32. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V *et al.* (2004) Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **36**, 2065–2072.
33. Jensen MP, Karoly P (1991) Motivation and expectancy factors in symptom perception: a laboratory study of the placebo effect. *Psychosomatic Medicine*, **53**, 144–152.
34. Moyad MA (2002) The placebo effect and randomized trials: analysis of conventional medicine. *Urologic Clinics of North America*, **29**, 125–133.