



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 LA
DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN ADULTOS MAYORES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Mirna Ruiz Ramos

TUTOR PRINCIPAL:
DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

COMITÉ TUTORAL:
DRA. TERESA IMELDA FORTUOL VAN DER GOES
DR. LUIS ALBERTO VARGAS GUADARRAMA



MÉXICO D.F

OCTUBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de febrero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **RUIZ RAMOS MIRNA** con número de cuenta **85285482** con la tesis titulada "**Efectividad de la administración del alfa-tocoferol y el ácido ascórbico sobre la densidad mineral ósea en adultos mayores.**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ:**

Presidente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Vocal: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DR. LUIS ALBERTO VARGAS GUADARRAMA
Suplente: DRA. TERESA IMELDA FORTUOL VAN DER GOES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de Octubre de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

RECONOCIMIENTOS

PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE RECIBIÓ EL
APOYO

DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM
EL PROGRAMA DE BECAS PARA ESTUDIOS DE POSGRADO DEL
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT)
CON NÚMERO DE REGISTRO 93235 Y LA DIRECCIÓN GENERAL
DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) UNAM, PROYECTO PAPIIT
IN303009.

COMITÉ TUTORAL

DRA. TERESA IMELDA FORTUOL VAN DER GOES

DR. LUIS ALBERTO VARGAS GUADARRAMA

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN

LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA, UNAM

SI AMAS A DIOS

- ◆ Si amas a Dios, en ninguna parte has de sentirte extranjero, porque Él estará en todas las regiones, en lo más dulce de todos los paisajes, en el límite indeciso de todos los horizontes.
- ◆ Si amas a Dios, en ninguna parte estarás triste, porque, a pesar de la diaria tragedia Él llena de júbilo el Universo.
- ◆ Si amas a Dios, no tendrás miedo de nada ni de nadie, porque nada puedes perder y todas las fuerzas del cosmos, serían impotentes para quitarte tu heredad.
- ◆ Si amas a Dios, ya tienes alta ocupación para todos los instantes, porque no habrá acto que no ejecutes en su nombre, ni el más humilde ni el más elevado.
- ◆ Si amas a Dios, ya no querrás investigar los enigmas, porque lo llevas a Él, que es la clave y resolución de todos.
- ◆ Si amas a Dios, ya no podrás establecer con angustia una diferencia entre la vida y la muerte, porque en Él estás y Él permanece incólume a través de todos los cambios.

Amado Nervo

AGRADECIMIENTOS

Con cariño y respeto a

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez

Porque sus enseñanzas no solo me han ayudado a crecer como profesionalista sino también como persona.

Dra. Teresa I. Fortuol Van Der Goes

Dr. Luis Alberto Vargas Guadarrama

Porque me brindaron su experiencia, conocimientos y ayuda hasta el último momento del proceso.

Dr. Mario Altamirano Lozano

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Dra. Rebeca López Marure

Por sus atinados comentarios que enriquecieron este trabajo.

Un sincero agradecimiento a mis profesores

Mtra. María de la Luz Martínez Maldonado

Dra. Esther Casanueva y López

Dr. Juan Carlos Vázquez Lira

Dr. Armando Cervantes Sandoval

Por compartir sus conocimientos y experiencias con un gran compromiso e interés.

A los integrantes de la Unidad de Investigación en Gerontología
Por creer en mí a pesar de los fracasos e insistir que lo intentara siempre una vez
más.

A todos los alumnos... Silvia, Dulce, Ale, Abigail, Nancy, Miguel, Venecia, Lidia,
Christian, Fernando, Manuel, Taide, Jorge C, Ana, Jenny, Vicky, Gie Bele,
Jonathan, Elia, Brenda, José Luis.....

Porque ser los guerreros invencibles de todas las batallas.

A todos los que me guiaron en el complicado camino de la parte administrativa
Por su paciencia infinita.

A toda mi familia

Por tolerar valientemente todas mis locuras, mi estrés, mi prisa y mis enojos

A todos mis amigos

Por soportar serenamente mi ausencia

A todos los viejos

Por permitirme aprender más sobre el envejecimiento

ÍNDICE

Índice de cuadros y figuras

Abreviaturas

I.	Resumen	1
II.	Abstract	2
III.	Introducción	3
IV.	Marco teórico	5
	IV.1. Metabolismo y remodelado óseo	5
	IV.2. Influencia del envejecimiento sobre el metabolismo óseo	16
	IV.3. Osteoporosis	25
	IV.3.1. Clasificación	25
	IV.3.2. Epidemiología	25
	IV.3.3. Diagnóstico y tratamiento	27
	IV.3.4. Factores de riesgo	28
	IV.4. Estrés oxidante	30
	IV.4.1 Fuentes endógenas y exógenas de radicales libres	31
	IV.4.2 Daño a biomoléculas	35
	V.5. Sistema antioxidante	37
	IV.5.1. Vitaminas antioxidantes	42
	IV.6. Relación del estrés oxidante con la densidad mineral ósea	43
	V.7. Efecto de la administración del ácido ascórbico y el alfa-tocoferol sobre la densidad mineral ósea	46
V.	Planteamiento del problema	53
VI.	Hipótesis	54
VII.	Objetivos	54
VIII.	Material y métodos	55
IX.	Resultados	65
	IX.1 Prevalencia de osteoporosis	65
	IX.2 Relación del estrés oxidante con la DMO	65
	IX.3 Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre el EOx	66
	IX.4 Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre la DMO	66

X. Discusión	76
X.1 Diagnóstico y prevalencia de osteoporosis	77
X.2 Relación del estrés oxidante con la DMO	78
X.3 Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre el EOx	79
X.4 Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre la DMO	80
X. Conclusiones	82
XI. Perspectivas	83
XII. Referencias bibliográficas	84
XIII. Anexos	96
Anexo 1. Consentimiento informado	98
Anexo 2. Productos de la investigación	103

Ruiz-Ramos M, Vargas LA, Fortoul Van der Goes TI, Cervantes-Sandoval A, Mendoza-Nunez VM. Supplementation of ascorbic acid and alpha-tocopherol is useful to preventing bone loss linked to oxidative stress in elderly. J Nutr Health Aging. 2010; 14(6): 467-72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro IV.1	Factores que regulan el metabolismo óseo.	7
Cuadro IV.2	Marcadores biológicos de carga alostática.	19
Cuadro IV.3	Clasificación etiológica de la osteoporosis.	26
Cuadro IV.4	Complejos de transferencia de electrones existentes en la matriz interna de la mitocondria.	34
Cuadro IV.5	Estudios relativos al efecto de las vitaminas D, A, K y té verde sobre la densidad mineral ósea.	49
Cuadro IV.6	Estudios relativos al efecto de las vitaminas C y E sobre la densidad mineral ósea.	51
Cuadro VIII.1	Operacionalización de variables.	57
Cuadro IX.1	Características de la población de estudio por diagnóstico.	67
Cuadro IX.2	Parámetros bioquímicos y marcadores de EOx por diagnóstico.	68
Cuadro IX.3	Relación de la densidad mineral ósea de columna con los marcadores EOx.	69
Cuadro IX.4	Frecuencia de los marcadores biológicos de EOx de la población de estudio por diagnóstico.	70
Cuadro IX.5	Parámetros bioquímicos pre- y post-intervención de la población de estudio por tratamiento.	71
Cuadro IX.6	Marcadores de EOx pre- y post-intervención de la población de estudio por tratamiento.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura IV.1	Ciclo del remodelado óseo.	10
Figura IV.2	Diferenciación y activación de los osteoclastos.	12
Figura IV.3	Maduración del osteoblasto a partir de células del estroma.	15
Figura IV.4	Sistemas fisiológicos y bioquímicos que intervienen en el metabolismo óseo.	17
Figura IV.5	Factores que modifican el metabolismo óseo durante el proceso de envejecimiento.	22
Figura IV.6	Producción de RL por la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria.	32
Figura IV.7	Daño de la membrana celular por RL.	36
Figura IV.8	Sistema antioxidante y sus tres niveles de defensa.	40
Figura IV.10	Estructura química del alfa-tocoferol.	43
Figura IV.11	Remodelación ósea y EOx	45
Figura VIII.1.	Diagrama del seguimiento de los pacientes durante el estudio.	56
Figura IX.1	Cambios en porcentaje en los niveles plasmáticos de LPO en la población de estudio post-intervención.	73
Figura IX.2	Cambios en porcentaje de la capacidad antioxidante total en la población de estudio post-intervención.	74
Figura IX.3	Cambios en porcentaje de la DMO de columna y de cadera en la población de estudio post-intervención.	75

ABREVIATURAS

ABTS	2,2-ácido-di(etilbenzotiazolin sulfonato)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BHT	Butiril hidroxitolueno
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas
CAT	Capacidad antioxidante total
CSFM	Factor estimulante de colonias de macrófagos
DE	Desviación estándar
DHEA-s	Sulfato dehidroepiandrosterona
DMO	Densidad mineral ósea
DXA	Absorciometría dual de rayos X
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EOx	Estrés oxidante
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GH	Hormona de crecimiento
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HT	Hormonas tiroideas
IC _{95%}	Intervalo de confianza al 95%

IFN- γ	Interferón γ
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico 1
IGF-II	Factor de crecimiento insulínico 2
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
Km	Constante de velocidad de reacción
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPO	Lipoperóxidos
MDA	Malondialdehído
NADH	Nicotin-adenin dinucleótido reducido
NADP	Nicotin-adenin dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotin-adenin dinucleótido fosfato reducido
NO	Óxido nítrico
NOF	National Osteoporosis Foundation
NOS	Oxido nítrico sintetasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE	Prostaglandinas
PTH	Hormona paratiroidea
RL	Radicales libres
RM	Razón de momios

SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TGF	Factor de crecimiento y de transformación
TMP	Tetrametoxipropano
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
URO	Unidad de remodelado óseo
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

I. RESUMEN

Antecedentes: La osteoporosis es un trastorno esquelético generalizado, caracterizado por la reducción de la masa ósea y un deterioro en su calidad, provocando un aumento en la fragilidad del hueso y un mayor riesgo de fracturas, especialmente en muñeca, columna vertebral, fémur y cadera. Estudios recientes sugieren que existe una asociación entre la osteoporosis y el estrés oxidante (EOx), por lo que se infiere que la administración crónica de antioxidantes vitamínicos puede tener un efecto positivo sobre la densidad mineral ósea (DMO). Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la efectividad de la administración del alfa tocoferol y el ácido ascórbico sobre el EOx y la DMO en adultos mayores.

Objetivo: Determinar la efectividad del alfa tocoferol y el ácido ascórbico sobre la reducción del EOx y el aumento en la DMO en adultos mayores.

Método: Se llevó a cabo un estudio cuasi-experimental, doble ciego en 116 adultos mayores, sanos con enfermedades crónicas controladas sin ingesta de antioxidantes o de hormonales de reemplazo. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado. La muestra fue dividida de manera aleatoria en cuatro grupos: i) grupo control, ii) grupo placebo, iii) Tx1 (500 mg de vitamina C con 400 UI de vitamina E) y iv) Tx2 (1000 mg de ácido ascórbico con 400 UI de alfa tocoferol). A todos los participantes se les realizó una evaluación pre y post-intervención a los 12 meses, se les midió la DMO de columna y cadera, los marcadores de EOx: lipoperóxidos (LPO), enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) y la capacidad antioxidante total (CAT). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 15.0., se calcularon medidas descriptivas (promedio y desviación estándar) y, como pruebas de comparación, el análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) con la prueba de Dunnet como post-hoc. Para todas las pruebas se consideró un valor de $p < 0.05$ como significancia estadística.

Resultados: Los resultados mostraron una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de LPO ($r = -0.217$, $p = 0.014$), así como una correlación positiva de la capacidad antioxidante total ($r = 0.293$, $p = 0.001$) y la enzima SOD ($r = 0.184$, $p = 0.026$) con la DMO de columna. Después del tratamiento la DMO de cadera presentó un incremento estadísticamente significativo en el grupo con el Tx2 en comparación con los demás grupos ($p < 0.05$).

Conclusiones: Nuestros hallazgos sugieren que la administración de vitaminas antioxidantes tiene un efecto positivo sobre el EOx y la DMO, por lo que podrían ser un coadyuvante para la prevención y tratamiento de la osteoporosis.

I. ABSTRACT

Background: Osteoporosis, is a generalized skeletal disorder characterized by bone mass reduction and deterioration in bone-mass quality, causing an increase in bone fragility and a greater risk of fractures especially in the wrist, spine, femur and hip. Several studies have suggested that there is a relationship between bone mineral density (BMD) and oxidative stress (OxS), so it appears that chronic administration of antioxidant vitamins may have a positive effect on bone mineral density (BMD). Therefore, in this study was evaluated the usefulness' administration of alpha tocopherol and ascorbic acid on the OxS and BMD in older adults.

Objective: To determine the effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol on oxidative stress and bone mineral density (BMD) in elderly people.

Methods: A double-blind, controlled quasi-experimental assay was carried out in a sample of 116 elderly healthy subjects or with controlled chronic disease, and without antioxidant intake or hormone replacement. The subjects agreed to participate in the study after giving their informed consent. The sample was randomly distributed into four groups i) control group, ii) placebo group, iii) Tx1 (500 mg vitamin C with 400 UI of vitamin E, and iv) Tx2 1,000 mg of ascorbic acid and 400 IU of alphatocopherol. All participants underwent pre-and post-intervention evaluation at 12 months was measured in spine and hip BMD, markers of OxS: of lipoperoxides (LPO), antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutation peroxidase (GPx) and total antioxidant status (TAS). Data were analyzed by standard statistical software SPSS 15.0; descriptive statistics are analyzed (means \pm standard deviation (SD)). Results were analyzed using analysis of variance for repeated measures (ANOVA) and Dunnett test post hoc. A p value < 0.05 was considered significant.

Results: We found a negative correlation between plasma levels LPO ($r = -0.217$, $p = 0.014$), as well as positive correlation TAS ($r = 0.293$, $p = 0.001$) and enzyme and SOD ($r = 0.184$, $p = 0.026$) with hip-BMD. On the other hand, the hip BMD showed a statistically significant increase in the group with Tx2 compared with the others groups ($p < 0.05$).

Conclusions: Our findings suggest that that administration of antioxidant vitamins have a positive effect on the OxS and BMD, and could be useful in preventing or aiding in the treatment of age-related osteoporosis.

III. INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido metabólicamente activo que continuamente se está remodelando mediante dos procesos opuestos, que en condiciones normales se encuentran acoplados; la formación y la resorción; el equilibrio entre ellos es regulado por medio de la acción de varios sistemas hormonales y mediadores locales. Existen varios factores que pueden romper el equilibrio entre la resorción y la formación del hueso, dando como resultado cambios en su estructura y calidad; uno de ellos es el proceso de envejecimiento.

En este sentido, es importante señalar que bajo el enfoque del ciclo vital humano el envejecimiento se inicia a partir de la quinta década de la vida, época durante la cual los cambios biológicos son evidentes, entre los que podemos destacar la disminución en la producción de hormonas sexuales, incremento en la generación de radicales libres (RL) y cambios en el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, lo cual repercute en la densidad mineral ósea (DMO).

Aún no se conocen con precisión los mecanismos moleculares que conducen al envejecimiento, y se han planteado numerosas hipótesis al respecto, siendo una de las más plausibles la teoría de los RL, que propone la acumulación de daño oxidativo en órganos y sistemas a causa de procesos bioquímicos donde interviene el oxígeno, dando como resultado biomoléculas oxidadas que se acumulan y propician el envejecimiento.

Al respecto, el organismo cuenta con un mecanismo homeostático para prevenir el ataque y la consecuente oxidación de los componentes celulares, denominado sistema antioxidante. Cuando este sistema no es eficiente y se incrementa la formación de RL, se genera un desequilibrio entre antioxidantes/oxidantes que provoca el efecto conocido como estrés oxidante (EOx). Estudios recientes han demostrado que la mayoría de los procesos patológicos que ocurren durante el envejecimiento, como son infarto agudo al miocardio, diabetes mellitus, aterosclerosis, artritis reumatoide, cataratas, cáncer, demencia de Alzheimer y osteoporosis, entre otros, se asocian con el EOx.

En este sentido, la osteoporosis es una de las enfermedades crónico-degenerativas de mayor prevalencia durante el envejecimiento. Se caracteriza por una reducción del tejido óseo (masa ósea) y deterioro de su calidad, que provoca un aumento en la fragilidad del hueso y un mayor riesgo de fractura. Esta patología es la causa de hasta un 75% de fracturas en mayores de 50 años; los

sitios más comunes en que se presentan fracturas son las vértebras, la cadera y el extremo distal del radio.

Así mismo, se sabe que los principales factores de riesgo para la osteoporosis son la ingestión inadecuada de calcio y fósforo, la deficiencia de vitamina D, la deficiencia de estrógenos después de la menopausia, el consumo crónico de algunos medicamentos (por ejemplo, corticoesteroides), la inactividad física, el tabaquismo y el consumo excesivo de bebidas alcohólicas; y es por ello que la mayoría de las investigaciones sobre osteoporosis se encuentran encaminadas a dilucidar los mecanismos endocrinos y degenerativos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que existe una asociación entre la osteoporosis y el EOx, la cual ha sido escasamente abordada. Por tal motivo, la finalidad de este estudio fue evaluar la efectividad de la administración del alfa tocoferol y del ácido ascórbico sobre el EOx y la DMO en adultos mayores sanos y con osteopenia, con el fin de disponer de información científica que permita sustentar programas de promoción de la salud e intervención comunitaria, enmarcados en estilos de vida antioxidantes que disminuyan la incidencia de la osteoporosis y sus complicaciones en la población gerontológica.

IV. MARCO TEÓRICO

Actualmente se ha demostrado el vínculo etiológico y fisiopatológico del EOx con más de 100 enfermedades crónico-degenerativas, entre las que destacan la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la osteoporosis y el cáncer, entre otras, las cuales se presentan con mayor frecuencia en los adultos mayores.¹⁻⁴

En este sentido, la osteoporosis es una de las enfermedades con mayor prevalencia durante el envejecimiento; se presenta en más del 20% de los mayores de 50 años, y es la causa de hasta un 75% de fracturas, principalmente en las mujeres y en los mayores de 70 años.⁵⁻⁶ Por esa razón, es necesario el estudio de los principales factores de riesgo de este problema de salud, entre los que se ha señalado el EOx, con el fin de disponer del conocimiento científico que permita proponer programas de intervención en adultos mayores que aún no presentan osteoporosis, pero tienen un alto riesgo, evitando con ello las fracturas y el deterioro en la calidad de vida de estos sujetos.⁷

Tomando como base lo antes mencionado y con el fin de fundamentar la presente investigación, se presentará información teórica sobre: metabolismo y remodelado óseo, influencia del envejecimiento sobre el metabolismo óseo, osteoporosis, factores de riesgo, EOx, relación de la DMO con el EOx, sistema antioxidante, vitaminas antioxidantes y efecto de la administración de vitaminas antioxidantes sobre la DMO.

IV.1. Metabolismo y remodelado óseo

El tejido óseo actúa como soporte de los tejidos blandos del organismo, permite la locomoción y desempeña un papel vital en la homeostasis del calcio, se forma y reemplaza de forma constante a través de la interacción compleja entre minerales (calcio, fósforo y magnesio), hormonas (sexuales, tiroideas y paratiroideas) y células especializadas. Es importante señalar que es un tejido conjuntivo con múltiples acciones sobre el cuerpo, tales como mantener el peso corporal, proteger órganos internos, almacenar minerales, albergar al sistema hematopoyético y multiplicar la fuerza de los músculos que mueven el esqueleto. Sus propiedades dependen de su estructura química y de su organización biológica. El organismo requiere que sea un tejido rígido, a la vez que ligero, capaz de resistir la tracción muscular, resistente, flexible y con una elevada elasticidad. Las propiedades del hueso provienen de su organización extracelular,

que consiste en una fase inorgánica mineral, que ocupa dos tercios de su peso, pequeñas cantidades de agua y una porción orgánica que constituye la matriz ósea.^{5-6, 8-9}

En este sentido, la matriz ósea está constituida por proteínas, siendo las principales las proteínas colágenas y las no colágenas. El 90% de ésta se encuentra formada por las proteínas colágenas tipo I, III y V. El restante 10% lo constituyen las proteínas no colágenas exógenas y endógenas. Dentro de las proteínas exógenas se encuentran la albúmina y la glucoproteína α 2-HS, mientras que en el grupo de las proteínas no colágenas endógenas se encuentran los proteoglicanos, proteínas gamma (γ) carboxiladas y proteínas glucosiladas.⁹

El hueso continuamente se está remodelando por medio de la formación y la resorción del tejido óseo. Los osteoblastos son responsables de la formación, los osteoclastos de la resorción y los osteocitos del mantenimiento. En condiciones normales la resorción y la formación se coordinan con fina exactitud, siendo la primera mucho más rápida que la segunda. La resorción tiene una duración aproximada de dos a tres semanas, mientras que la formación puede tardar hasta tres meses. Para que la sincronización entre estos dos procesos sea perfecta se requiere de la acción de varios sistemas hormonales y factores locales (cuadro IV.1), que van a regular la diferenciación, el reclutamiento y las funciones de los osteoblastos y los osteoclastos.¹⁰⁻¹²

Los mecanismos bioquímicos que mantienen el equilibrio entre la formación y la resorción no se conocen por completo; no obstante, estudios recientes han demostrado que se encuentran involucradas varias vías metabólicas, las cuales actúan en forma de retroalimentación; así mismo, que la estimulación o inhibición de las células involucradas depende de varios factores locales, de la comunicación célula-célula y de la comunicación célula-matriz extracelular.¹²⁻¹³

Cuadro IV.1. Factores que regulan el metabolismo óseo.⁸

Sistemas hormonales	Factores locales
Hormona paratiroidea (PTH)	Factor de crecimiento insulínico I y II (IGF)
Calcitonina	Factor de crecimiento y transformación (TGF)
1,25 dihidroxi-vitamina D	Factor derivado de plaquetas (PDGF)
Insulina	Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
Cortisol	Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)
Hormonas sexuales	Citocinas: Interleucina 1, 6 y 11 (IL), factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-M) y factor de necrosis tumoral α (TNF α)
Hormonas tiroideas (HT)	Óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGE)
Hormona de crecimiento (GH)	Proteínas morfogenéticas óseas (BMP) RANKL y osteoprotegerina (OPG)

En términos de la comunicación celular entre los osteoclastos y los osteoblastos, se puede referir al remodelado óseo como un ciclo que ocurre en tres fases: la fase de resorción o iniciación, la fase de transición y la fase de formación o terminación (figura IV.1). La comunicación entre células es opuesta en las fases de iniciación y transición; en la iniciación, ésta va a ser a partir de los osteoblastos a los precursores de los osteoclastos y, en la transición, a partir de los osteoclastos a los precursores de los osteoblastos.

- La fase de iniciación incluye el reclutamiento de las células precursoras de los osteoclastos, la diferenciación y activación de los osteoclastos y la resorción ósea. Esta fase en el hueso humano tiene una duración aproximada de tres semanas.
- La fase de transición es el periodo en el que se da la inhibición de la resorción, la apoptosis de los osteoclastos y el reclutamiento y diferenciación de los osteoblastos.
- Finalmente, la fase de terminación incluye la formación de hueso nuevo (osteoides), la mineralización y la entrada en reposo del tejido. Durante esta fase la diferenciación osteoclástica se encuentra inhibida. La fase de terminación es mucho más larga que la de iniciación; aproximadamente de tres meses.¹⁴

Regulación de la resorción ósea (fase de iniciación)

La interacción entre las células osteoblásticas y las osteoclásticas ocurre en una estructura temporal multicelular llamada “unidad de remodelado óseo” (URO), en la que intervienen varios factores locales que regulan el proceso: cada URO está organizada en tiempo y espacio y la vida media es de 6 a 9 meses.¹⁵⁻¹⁶

Esta fase se inicia con la atracción de un grupo de osteoclastos que reaccionan a las señales transmitidas por los osteocitos, los cuales se forman cuando el tejido mineralizado envuelve completamente al osteoblasto. Los osteocitos se conectan entre sí a través de proyecciones citoplasmáticas, generando una vasta red de conexiones célula a célula. Se ha señalado que estas células son capaces de registrar campos eléctricos o corrientes de líquidos producidos por las deformaciones o por el estímulo mecánico (estrés), provocado en el hueso. Los posibles mediadores de la respuesta al estrés óseo son las prostaglandinas y el NO; los osteoblastos y osteoclastos responden a estos mediadores con diferentes reacciones metabólicas.¹⁵⁻¹⁷

En investigaciones recientes se ha observado una correlación entre la muerte o daño a los osteocitos con un aumento en la osteoclastogénesis, la resorción y el daño a la matriz ósea.¹⁸⁻²⁰

Los osteoclastos son células multinucleadas grandes. Su característica morfológica más significativa es su abigarrado contorno con un sistema complejo de proyecciones digitiformes que participan en la resorción de la matriz ósea calcificada. Estas células actúan en grupos sobre la superficie del hueso liberando enzimas y proteinasas, como la catepsina K, que van a degradar a las proteínas y disolver la matriz orgánica e inorgánica del hueso y el cartílago calcificado. Estas células se mueven rápidamente sobre la superficie mientras excavan a una profundidad de 50 a 60 μm , produciendo las lagunas de Howship, dejando la superficie desnuda, con fibras colágenas visibles en el fondo de las lagunas. La matriz degradada se incorpora al osteoclasto por endocitosis a través del borde en contacto con la laguna de resorción y es transportada al extremo celular contrario, donde se libera a través de la membrana.¹⁵

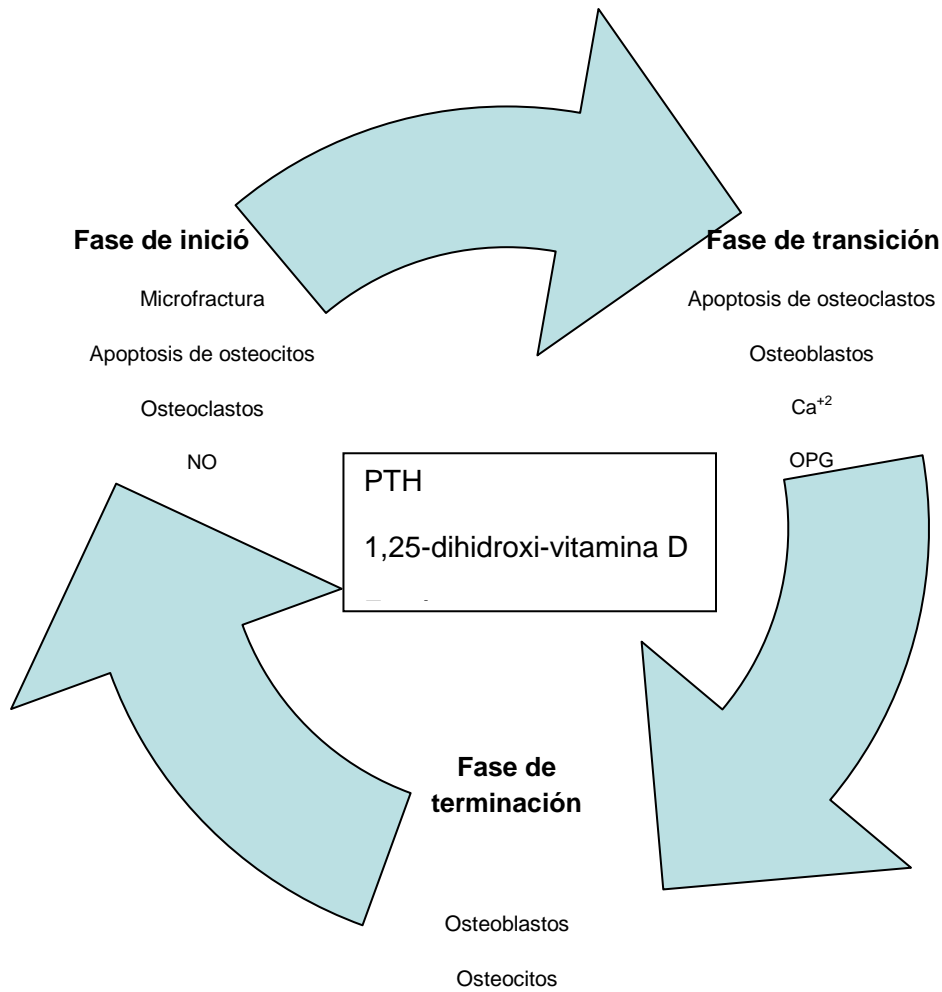


Figura IV.1. Ciclo del remodelado óseo. De acuerdo con la comunicación celular entre los osteocitos, osteoclastos y osteoblastos, el remodelado óseo se puede clasificar en tres fases: iniciación, transición y terminación. En cada una de estas fases actúan varios factores locales y hormonales.

Los osteoclastos proceden de precursores de la hematopoyesis, de la línea monocito-macrofágica, los cuales son activadas por células del estroma, de la línea osteoblástica, que expresan el ligando del activador del receptor del $\text{NF}\kappa\beta$ (RANKL), el cual es necesario para que ocurra la activación. Éste, tras unirse a su receptor (RANK) en los preosteoclastos, aumenta la diferenciación y actividad de los osteoclastos, a la vez que disminuye la apoptosis de éstas células. A la interacción del RANKL-RANK se opone la OPG al unirse al ligando RANKL, impidiendo de esta forma la maduración de los preosteoclastos a osteoclastos (figura IV.2.).²¹

En este complejo proceso también se requiere la presencia del CSF-M, que puede ser sintetizado por los osteoblastos y se liga al receptor c-fms, para incrementar la duplicación de los osteoclastos. El papel de las citocinas en este proceso sigue siendo controvertido, mientras que la IL1, la IL-6, el $\text{TNF}\alpha$ y la PGE2 parecen incrementar la actividad osteoclástica, el $\text{TGF}\beta$ reduce la pérdida de masa ósea al provocar un aumento en la apoptosis de los osteoclastos.²²⁻²³

Las hormonas que intervienen en la estimulación de la resorción ósea no actúan directamente sobre los precursores del osteoclasto, sino sobre las células del estroma-osteoblásticas, la PTH, la 1,25 dihidroxi-vitamina D las HT incrementan la expresión del RANKL en este tipo celular; además, en algunos casos inhiben la síntesis de la OPG, lo que provoca un incremento significativo de la resorción ósea.²³

Los estrógenos actúan de manera indirecta a través de la regulación de diferentes mediadores. Se menciona que en el sistema RANKL-RANK intervienen incrementando los niveles de la OPG, efecto que se potencia con su papel como supresores en la síntesis de las citocinas IL-1, IL-6 y $\text{TNF}\alpha$, así como del PGE2 y del GM-CSF, frenando de esta manera la diferenciación y activación de los preosteoclastos. Los estrógenos también incrementan la apoptosis de los osteoclastos ya maduros de manera directa y a través de la síntesis del $\text{TGF}\beta$.²⁴

Otra hormona que influye sobre la resorción ósea es la calcitonina, inhibiendo de forma transitoria la actividad osteoclástica, por medio de un fenómeno rápido de la regulación de los receptores de estas células.¹⁶

Durante el proceso de resorción se producen erosiones en el hueso esponjoso, así como un aumento de porosidad en el hueso cortical. Si el fenómeno se repite varias veces en el mismo sitio, puede llegar a provocar fragilidad ósea por la disminución de la densidad mineral, además como se señaló, el proceso de

formación ósea requiere más tiempo que el de resorción; por lo que si el recambio óseo está muy acelerado, se compromete la mineralización con un incremento de la fragilidad del hueso.²⁵

Fase de transición

Esta fase es crítica para el acoplamiento entre la resorción, la estimulación de los precursores de los osteoblastos, por los osteoclastos y la activación de la formación de hueso en las lagunas de Howship. Mientras la formación ósea comienza a activarse, la resorción se detiene y comienza la apoptosis de los osteoclastos inducida por el alto contenido extracelular de calcio liberado del hueso durante la resorción. Durante esta fase, 7 a 10 días, la cavidad se rellena de un material pobre en colágeno y rico en proteoglicanos, glicoproteínas y fosfatasa ácida.¹⁴

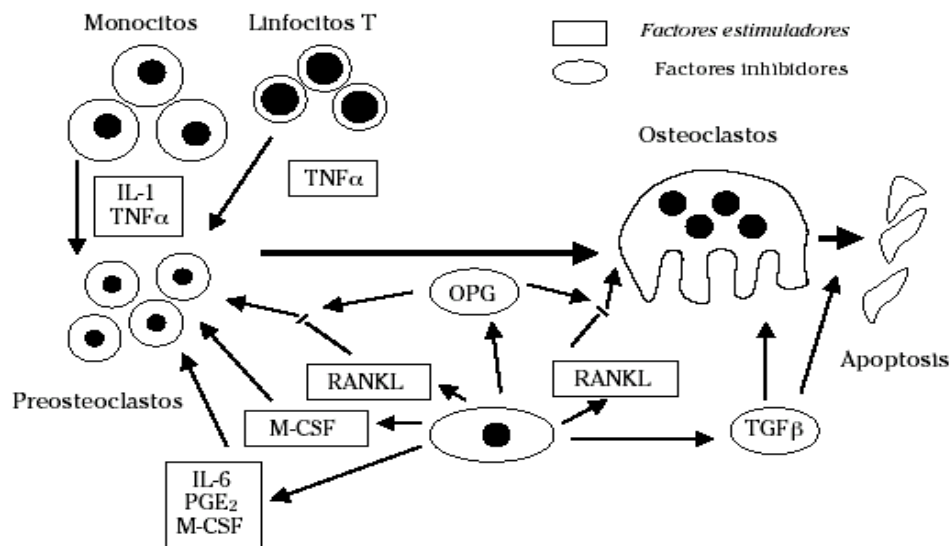


Figura IV.2. Diferenciación y activación de los osteoclastos (tomado de Lafita 2003).²⁶

La activación de los osteoblastos por los osteoclastos es un paso crítico en el acoplamiento de la resorción y la formación ósea, la cual podría ocurrir sin el

contacto célula-célula. Durante la resorción ósea los osteoclastos pueden liberar algunos factores de crecimiento como el TGB- β , proteínas morfogenéticas y el IGF-II, los cuales activan la formación de hueso. Diferentes líneas de investigación sugieren que la actividad de los osteoclastos en la resorción es indispensable para que ocurra el acoplamiento entre la resorción y la formación ósea, que los osteoblastos pueden reconocer los componentes de los pozos de resorción aun en ausencia de los osteoclastos e inducir la formación de hueso.²⁷⁻²⁸

Regulación de la formación ósea (fase de terminación)

Las células implicadas en la formación del hueso y responsables de las síntesis de la matriz ósea son los osteoblastos, que juegan un papel importante en la activación de los osteoclastos y producen las principales proteínas involucradas en la formación de hueso como el colágeno tipo I, los glicosaminoglicanos, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, vitronectina y trombospondina. Además, expresan la fosfatasa alcalina y regulan la concentración de calcio y fosfato, que son fundamentales para el proceso de deposición de hidroxiapatita durante la mineralización.²⁹

Una vez que los osteoblastos han completado la osteogénesis, una parte de éstos se incluyen en la matriz ósea y se transforman en osteocitos o permanecen en la superficie como células de revestimiento. Los restantes sufren apoptosis bajo la influencia de las citocinas y factores de crecimiento que se encuentran en el microambiente.¹⁵

Los osteoblastos proceden de las células del estroma que han sufrido un proceso de diferenciación mediante la interacción de factores locales, citocinas y la expresión de factores de transcripción específicos. Estas células pueden madurar hacia osteoblastos, adipocitos, condrocitos o células musculares, dependiendo del estímulo que reciban. Por ejemplo, la diferenciación de los mioblastos está controlada por la expresión del factor de transcripción MyoD, mientras que la diferenciación de los adipocitos se encuentra controlada por el factor de transcripción PPAR (figura IV.3).^{15, 30-31}

Los mecanismos involucrados en la diferenciación de los osteoblastos no se conocen con claridad. Estudios realizados con modelos animales han puesto en evidencia que los factores necesarios para que se dé este proceso son Runx2 y Osx y, además, también se encuentran involucrados en la calcificación del hueso *in vivo*. Runx2 tiene un papel dual, ya que es capaz de controlar la diferenciación de los condrocitos y los osteoblastos, para la diferenciación de los osteoblastos

Runx2 actúa junto con otros factores, siendo uno de los más conocidos el Osx, que es inducido por las BMP. Runx2 y Osx posiblemente actúan juntos para la integración de varias señales, a través de diferentes vías metabólicas para regular la diferenciación y la actividad de los osteoblastos.^{15,31}

Durante la maduración de los osteoblastos, las células precursoras segregan diferentes factores de crecimiento que actúan como modificadores funcionales y agentes mitógenos. Las BMP desempeñan la función de inducir la diferenciación de las células osteoblásticas, especialmente las BMP 2 y 4, las cuales inducen la expresión del factor de transcripción Cbfa 1, que, a su vez, dirige la diferenciación de los osteoblastos y la expresión de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea, colágeno 1 y la calcificación de la matriz extracelular. En la diferenciación de los osteoblastos también se han implicado factores de crecimiento que incluyen el TGF β , PDGF, IGF y FGF, así como los péptidos activina, inhibina y amilina.³¹⁻³²

En relación con las hormonas que participan en la maduración de los osteoblastos, la GH, sus mediadores como el IGF, la 1-25 dihidroxivitamina D y las hormonas sexuales, tienen un papel relevante. La GH aumenta la producción del IGF-1 y de la 1-25 dihidroxivitamina D. Respecto del IGF, se ha observado que cuando éste disminuye se presenta una pérdida de densidad mineral ósea, mientras que la 1-25 dihidroxivitamina D estimula directamente las células osteoblásticas, aumentando la síntesis de la osteocalcina, además aumenta la unión del IGF-1 a su receptor osteoblástico y aumenta la síntesis de proteínas ligadoras del IGF. Así mismo, se ha demostrado que las hormonas sexuales ejercen efectos reguladores tanto en la maduración de los osteoclastos como en la de los osteoblastos, siendo ésta dependiente de la producción y acción de las citocinas, los estrógenos inhiben la síntesis de la IL-1 y 6. Aumentan la síntesis y secreción de calcitonina y 1-25 dihidroxivitamina D, así como la expresión del IGF-1 y del TGF β .³³⁻³⁴

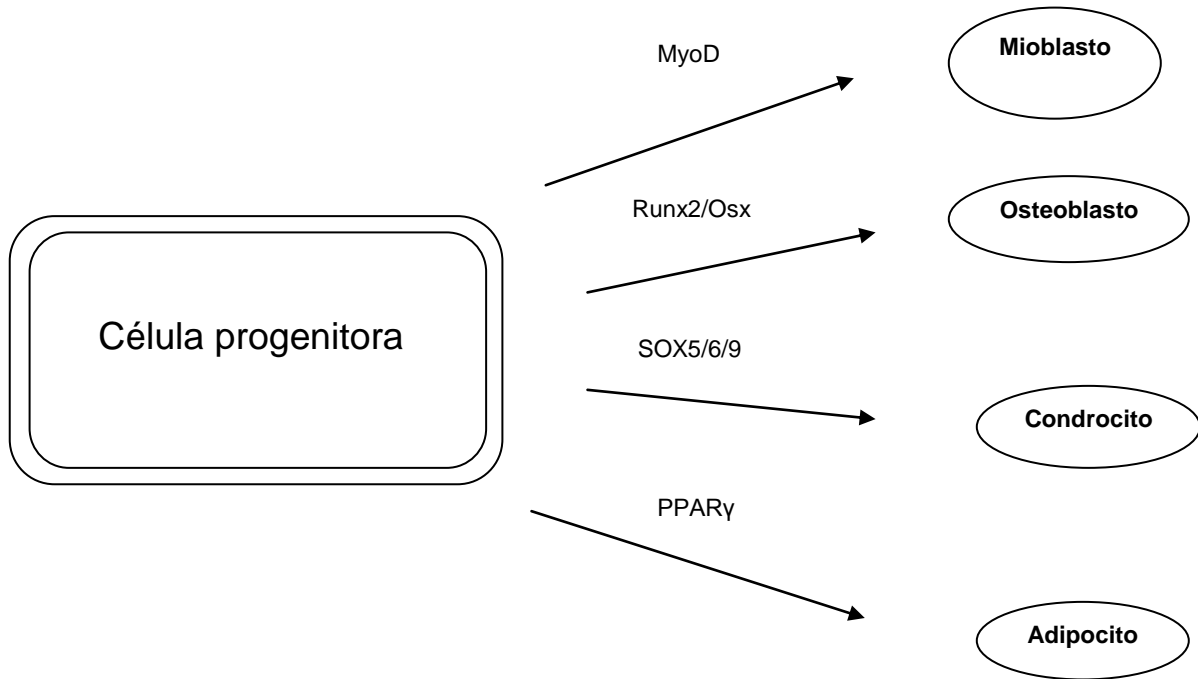


Figura IV. 3. Maduración del osteoblasto a partir de células del estroma. La célula progenitora pluripotencial origina diferentes líneas celulares; cada ruta de diferenciación está regulada por diferentes factores de transcripción.

Es importante señalar que el remodelado óseo es un proceso que se encuentra controlado por sistemas hormonales, factores locales y la estimulación mecánica (figura IV.4); además, está sujeto a la influencia de una serie de factores que pueden provocar un incremento, una disminución o la inactividad de los osteoclastos y los osteoblastos. Algunos de estos factores son enfermedades metabólicas, inactividad física, intervenciones terapéuticas y el envejecimiento, entre otras.³⁵

IV.2. Influencia del envejecimiento sobre el metabolismo óseo

El envejecimiento es un proceso universal, presente en todas las especies, el cual es considerado un fenómeno biológico intrínseco modificable por factores ambientales; sin embargo, no es posible precisar su inicio, ya que no existen marcadores biológicos específicos que así lo establezcan. Se ha señalado que este proceso realmente se inicia alrededor de los 45 años de edad, cuando el organismo alcanza su grado total de madurez y la acción del tiempo comienza a producir modificaciones morfológicas y fisiológicas en el individuo. No obstante, por consenso internacional se ha establecido el inicio de la vejez a partir de los 65 años en países desarrollados y, después de los 60 años, en países en desarrollo.³⁶⁻³⁸

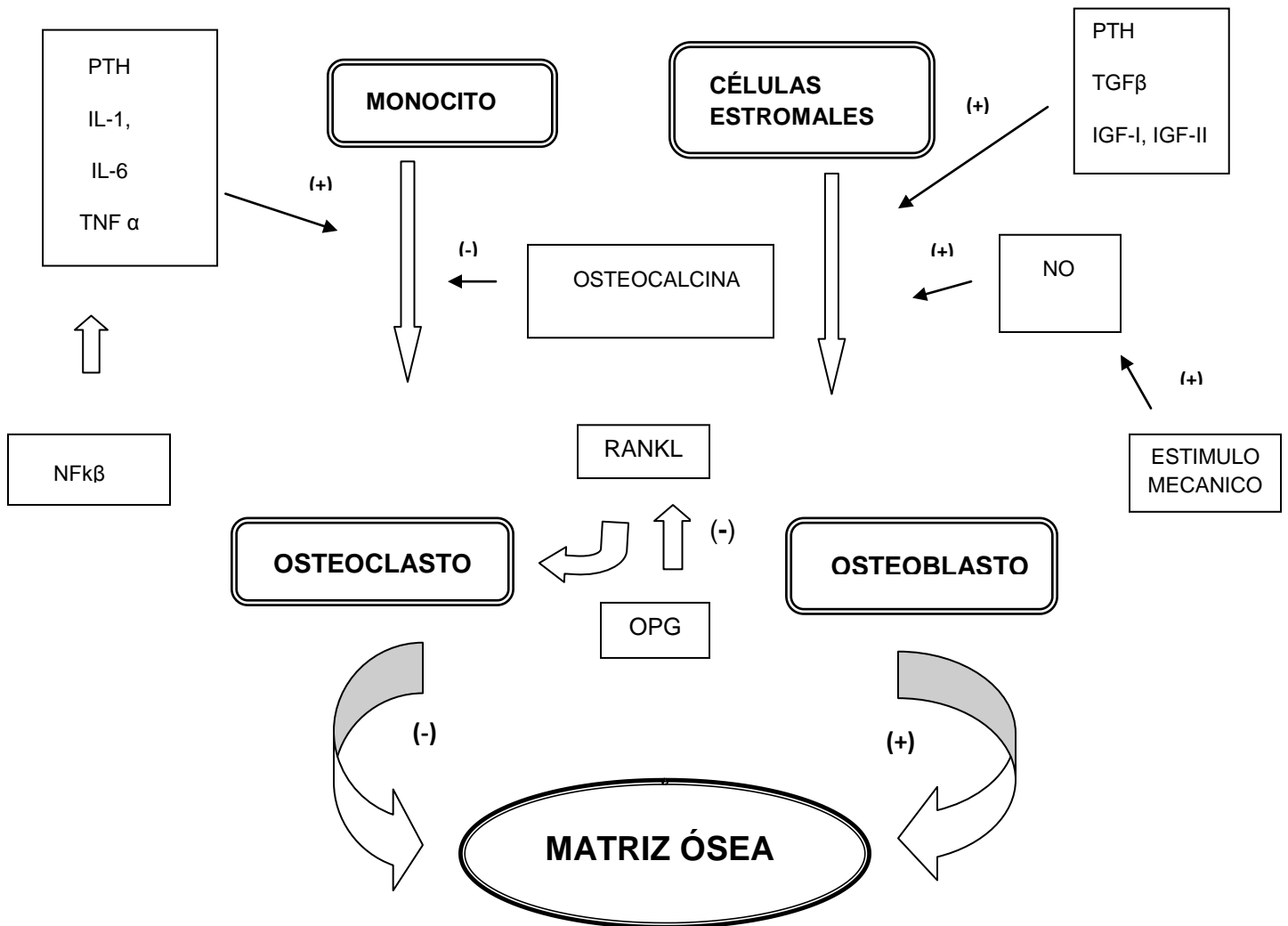


Figura IV.4. Sistemas fisiológicos y bioquímicos que intervienen en el metabolismo óseo. La regulación del metabolismo óseo requiere de la acción de varios sistemas hormonales y factores locales. La unión del ligando RANKL a su receptor RANK promueve la diferenciación de los osteoclastos. Este proceso es inhibido por la OPG, lo que favorece la apoptosis de los osteoclastos.

Durante la vejez ocurren pérdidas biológicas, psicológicas y sociales que afectan y cambian progresiva o súbitamente el estilo de vida de las personas. Entre las modificaciones biológicas que se producen en el envejecimiento se encuentran reducción de la masa muscular, orgánica y esquelética, disminución del gasto cardíaco, la fuerza muscular, el flujo sanguíneo renal, la visión, la audición, el sentido del gusto y otras.

Dentro de las alteraciones producidas a nivel celular se encuentran: inclusiones intracelulares, invaginación de la membrana nuclear, acumulación del pigmento lipofuscina y disminución del número de ribosomas y mitocondrias.³⁹⁻⁴¹

Es evidente que durante el proceso de envejecimiento se presenta una atrofia de todos los órganos y sistemas, provocando una disminución de las funciones fisiológicas y una mayor vulnerabilidad a padecimientos infecciosos, metabólicos, autoinmunes, respiratorios y osteoarticulares, entre otros; sin embargo, el organismo como respuesta tendrá que hacer uso de una serie de mecanismos que le permitan mantener la homeostasis y con ello asegurar la supervivencia. A esta respuesta adaptativa se le conoce como alostasis, y fueron Sterling y Eyer (1988) quienes introducen este término, explicando que el organismo ante las demandas o retos, tanto endógenos como exógenos de la vida diaria, responde de manera activa para mantener la homeostasis y, así, adaptarse.⁴²⁻⁴³

En este sentido, McEwen (2000) estableció que cuando los mecanismos de la respuesta adaptativa (alostasis) ocurren en forma repetida, intensa, prolongada o de manera deficiente, se propicia una carga alostática (allostatic load), haciendo menos eficiente el proceso y favoreciendo la aparición de enfermedades infecciosas y crónico-degenerativas. Así mismo, se ha señalado que la acumulación de la carga alostática es la causante del declive que se presenta durante el envejecimiento, siendo los principales mediadores en la respuesta y adaptación del organismo ante los retos de la vida diaria el sistema neuroendocrino, el nervioso autónomo y el inmunológico. La medida de la carga alostática se basa en 10 marcadores biológicos (cuadro IV.2); algunos de ellos vinculados con el EOx, cuya alteración provoca una disminución en la respuesta homeostática y con ello incrementa el riesgo de padecer enfermedades como diabetes mellitus, hipertensión, arteroesclerosis, obesidad, enfermedades cardiovasculares, cáncer y osteoporosis, entre otras.⁴⁴⁻⁴⁵

Cuadro IV.2. Marcadores biológicos de carga alostática.

1	Niveles de cortisol en orina de 12 horas
2	Niveles de norepinefrina en orina de 12 horas
3	Niveles de epinefrina en orina de 12 horas
4	Niveles de sulfato dehidroepiandrosterona (DHEA-S) en suero
5	Presión sanguínea sistólica
6	Presión sanguínea diastólica
7	Razón de la circunferencia cintura/cadera
8	Lipoproteína de alta densidad (HDL-colesterol) en suero
9	Razón colesterol total/HDL-colesterol
10	Niveles sanguíneos de hemoglobina glicosilada

Por otro lado, el tejido óseo, al igual que el resto de los tejidos del organismo, pasa por un proceso de crecimiento y desarrollo desde la vida intrauterina hasta la edad adulta. Éste es un proceso dinámico en el que se encuentran implicados los procesos de modelado (control del crecimiento y morfología del hueso) y remodelado (equilibrio entre resorción y formación).

La pérdida de tejido óseo en el humano ha sido reportada desde hace ya varios años, y se consideraba que ésta era parte del proceso normal del envejecimiento. Se mencionaba que en esta etapa se presentaba un desequilibrio entre la resorción y la formación a favor de la primera y que los responsables de ello eran la PTH y la deficiencia de calcio y fósforo en el anciano. Después se detectó que estos procesos se encuentran regulados por diferentes hormonas y varios factores locales y que se requiere de todos para que el remodelado óseo se lleve a cabo de manera normal.⁴⁶⁻⁴⁷

Hoy se sabe que la pérdida ósea asociada a la edad, efectivamente, resulta del desequilibrio entre las fases de formación y de resorción ósea. En condiciones normales la máxima masa ósea o pico de masa ósea se alcanza hacia los 30 años de edad. De los 30 a los 40 años el balance óseo es igual a 0 y la masa ósea suele permanecer estable. A partir de los 40 años, en ambos sexos, y como consecuencia de la instauración progresiva de un balance negativo, existe una pérdida gradual de masa ósea que se considera fisiológica. En el varón, esta pérdida anual se produce a una velocidad constante del 0,5%, mientras que en la mujer la pérdida ósea se acelera durante los primeros años de la menopausia hasta alcanzar un 2-4% anual; posteriormente, disminuye para estabilizarse de nuevo en una pérdida del 0,5% anual. De esta manera, el perfil de la pérdida ósea varía según el sexo, y la mujer presenta pérdida ósea “fisiológica” superior a la del varón. Al inicio de la octava década de la vida, la masa ósea de los varones se ha reducido en un 20% y la de las mujeres en un 30%.⁴⁸

Se considera que la pérdida de masa ósea, asociada al envejecimiento, se produce de forma progresiva, debido a que el volumen óseo sustituido en cada unidad de remodelado se desequilibra y se pierde una pequeña cantidad de hueso que, a lo largo del tiempo, da lugar a alteraciones estructurales, tales como adelgazamiento cortical, porosidad cortical, adelgazamiento trabecular y pérdida de conectividad.⁴⁹⁻⁵⁰

Como consecuencia del envejecimiento, el metabolismo óseo se encuentra enlentecido. Se ha demostrado que con la edad disminuye el espesor de las unidades de remodelado y se reduce la duración de la fase de activación

osteoblástica. También disminuye la capacidad de los osteoblastos para multiplicarse y promover nuevo hueso. En el hueso del anciano los osteoblastos no serían capaces de sintetizar matriz suficiente para rellenar las lagunas de resorción. Esto podría ser debido, tanto a una disminución del número de osteoblastos como a un déficit de mediadores locales o a un defecto en las señales de acoplamiento entre formación y resorción. La cantidad de tejido óseo resorbido también disminuye lentamente con la edad, pero menos que la cantidad de hueso formado.⁵¹

De acuerdo con las investigaciones realizadas sobre este tema, entre los factores implicados en la pérdida ósea que se observa en los ancianos se encuentran (figura IV.5):

- La deficiencia de calcio
- La deficiencia de vitamina D
- El déficit hormonal
- El cambio cualitativo y geométrico en la forma del hueso
- El proceso inflamatorio crónico que se da en el envejecimiento

Deficiencia de calcio en el adulto mayor

El mecanismo por el que los ancianos continúan perdiendo tejido óseo está probablemente relacionado con un déficit de calcio, lo que produce un hiperparatiroidismo secundario. En el envejecimiento, los cambios que se presentan, tanto en la mucosa intestinal como en el riñón, van a provocar una disminución en la absorción del calcio con un aumento en la excreción, lo que a su vez estimula la producción de PTH, que es un potente estimulador de la resorción ósea cuando está elevada de una forma persistente. En la génesis de la hipocalcemia desempeñan también un papel, aunque menos relevante, las carencias nutricionales de los ancianos.⁵¹

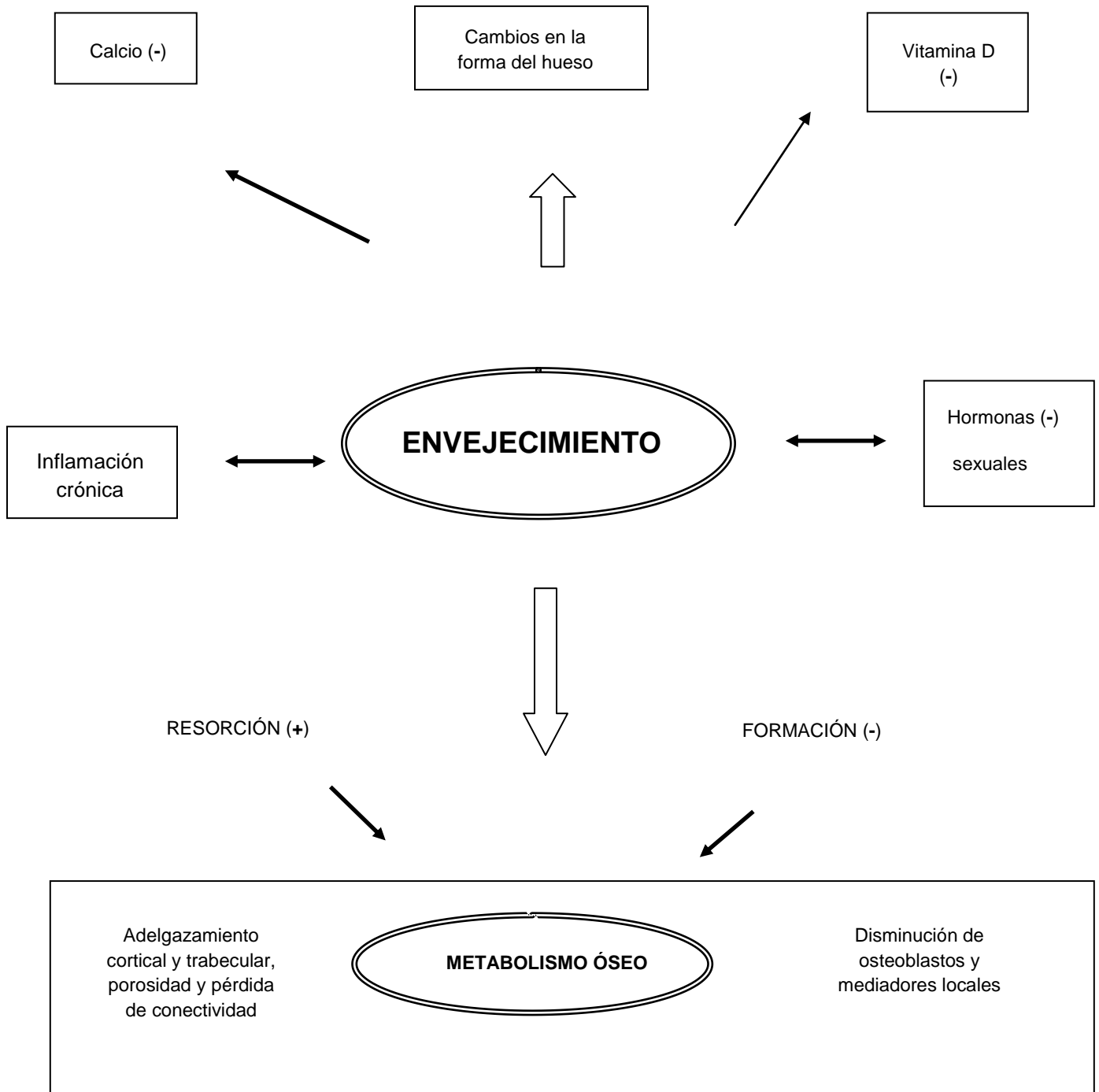


Figura IV.5. Factores que modifican el metabolismo óseo durante el proceso de envejecimiento. La disminución de calcio, vitamina D y hormonas sexuales, así como el proceso inflamatorio crónico que cursan los adultos mayores, provocan un aumento en la resorción ósea y una disminución en el proceso de formación de hueso en los ancianos.

Deficiencia de vitamina D

La deficiencia de vitamina D en el anciano se presenta principalmente por la disminución en la capacidad de la piel de sintetizar vitamina D, que surge con el envejecimiento. Esta hipovitaminosis D favorece el aumento secundario de la actividad paratiroidea, promoviendo la resorción ósea cortical, lo cual repercute en la densidad mineral ósea caracterizada por una disminución del grosor de la cortical y a un aumento del remodelado óseo.⁵²

Déficit hormonal

Por otro lado, con relación al déficit hormonal, se sabe que tanto los estrógenos como los andrógenos, aunque actúan de forma indirecta en el metabolismo óseo, juegan un papel importante en la maduración de las células óseas. Los estrógenos inhiben la síntesis de las IL-1 y 6, ejercen una acción opositora sobre los efectos de la PTH, aumentan la síntesis y la secreción de calcitonina y de 1-25 dihidroxivitamina D e incrementan la absorción de calcio. A nivel osteoblástico aumentan la expresión del IGF1 y del TGF β , disminuyendo de esta manera el remodelado óseo. La disminución de estas hormonas se asocia con un incremento en el número de los sitios de activación, con profundización de las cavidades de resorción.³³

Durante el envejecimiento en la mujer, la disminución estrogénica es el principal factor en la pérdida de masa ósea, en las fases iniciales de la menopausia se activa el remodelado con un aumento de factores locales como la IL-6 o el TNF- α , un aumento del número de unidades de remodelado óseo y una rápida pérdida ósea, lo que se conoce como remodelado transitorio. Una vez que se alcanza un estado de equilibrio se mantiene un balance óseo negativo. El aumento de las unidades de remodelado y la mayor profundidad de las lagunas de resorción producen una pérdida en la conectividad trabecular. La disminución estrogénica se acompaña de un aumento de la vida media de los osteoclastos con un descenso en la de los osteoblastos, por lo que se forma menos hueso nuevo.⁵³⁻⁵⁵

En el caso de los varones, los andrógenos son determinantes para la maduración ósea y en la obtención del pico de masa ósea, contribuyen de forma directa en los procesos de formación ósea. El envejecimiento se acompaña de una disminución de los valores de testosterona libre y total, aunque se tienen datos de que la deficiencia de testosterona se relaciona con una disminución de calcitonina en plasma, menor absorción intestinal de calcio y valores bajos de 1-25 dihidroxivitamina D en suero. Se conoce muy poco acerca de los efectos

fisiopatológicos en el tejido óseo. El déficit de estrógenos también realiza un papel importante en la pérdida ósea que se observa en el varón.⁵⁶⁻⁵⁸

Cambio cualitativo y geométrico en la forma del tejido óseo

El tejido óseo está formado por hueso compacto y hueso trabecular. El compacto provee una cubierta densa alrededor de todos los huesos que proporciona soporte para la red trabecular interna y, al mismo tiempo, contiene la médula ósea. El hueso trabecular consiste en una red de placas, columnas y travesaños cuyos diámetros varían de 40 a 400 μm . La resistencia ósea está determinada por varios factores como el espesor cortical, el tamaño óseo, la densidad ósea trabecular y la arquitectura. Todos estos factores cambian con la edad, lo cual es causa del desequilibrio en el remodelado óseo.⁸

Durante el envejecimiento se producen cambios cualitativos en el tejido óseo, caracterizados por alteraciones de la microarquitectura del hueso cortical y trabecular. Estos cambios son más evidentes en la mujer que en el varón, porque estos alcanzan un pico de masa ósea más alto y no presentan una pérdida ósea acelerada en la adultez.⁵⁹

Se ha demostrado que con el envejecimiento se propicia deformación en el hueso, inducida por las cargas mecánicas, alterando su estructura, aunque sin causar cambios significativos en la densidad mineral. No obstante, la pérdida de la microarquitectura ósea normal es un factor de fragilidad. En este sentido, si el sistema que controla esta respuesta falla se presenta pérdida de hueso, originando la osteoporosis senil o tipo 2.⁶⁰⁻⁶¹

Proceso inflamatorio y envejecimiento

Los humanos, a lo largo de su vida, están expuestos a constantes cargas antigénicas, lo cual, aunado al déficit del sistema inmunológico (principalmente del timo), que se presenta durante el proceso de envejecimiento, propician un incremento de las citocinas pro-inflamatorias, generando un proceso inflamatorio crónico asintomático y sistémico, denominado inflammaging, que puede causar daño al organismo y potenciarse si se presenta alguna enfermedad.⁶³ Además, durante el proceso de envejecimiento se presenta estrés oxidativo, el cual activa al sistema inmunológico, provocando la liberación de más citocinas, que a su vez van a estimular la producción de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), generando un ambiente oxidativo e inflamatorio. Al respecto, se sabe que las citocinas pro-inflamatorias juegan un papel crítico en el remodelado

óseo; por ejemplo, las IL-1 y 6 y el TNF α activan la resorción ósea; por lo tanto, un estado de inflamación crónica va a favorecer la pérdida de masa ósea.⁶²⁻⁶³

IV.3. Osteoporosis

La osteoporosis es un trastorno esquelético generalizado, caracterizado por la reducción del tejido óseo (masa ósea) y deterioro de su calidad, que provoca un aumento en la fragilidad del hueso y mayor riesgo de fractura.⁶⁴⁻⁶⁵

IV.3.1. Clasificación de la osteoporosis

La clasificación de la osteoporosis depende de que exista un alto o bajo remodelado óseo y de la presencia de alguna enfermedad. En este sentido, la clasificación tradicional de la osteoporosis es primaria o secundaria.

Dentro de la osteoporosis primaria podemos distinguir la tipo I o posmenopáusica y la tipo II o también llamada senil (cuadro IV.3).⁶⁶

La osteoporosis también se subdivide en primaria cuando el origen es inherente al hueso y secundaria cuando es consecuencia de otro proceso fisiopatológico. En este sentido, en el varón la osteoporosis es de tipo secundaria en el 30-60% de los casos, siendo las causas más frecuentes el hipogonadismo, el tratamiento corticoideo y el alcoholismo. En las mujeres es frecuente la osteoporosis por hipertiroidismo, hipoestrogenemia, tratamiento corticoideo y anticonvulsivante.⁶⁷

IV.3.2. Epidemiología

La prevalencia de la osteoporosis varía ampliamente en el mundo. Se ha reportado una magnitud del 16 al 30%. Según las estimaciones de la NOF (National Osteoporosis Foundation), en 2002 el 20% de las mujeres blancas estadounidenses tenían osteoporosis, lo que supone 7,8 millones de personas de la población general; además, 21,8 millones de mujeres tenían baja DMO en fémur proximal.⁶⁷

Cuadro IV.3. Clasificación etiológica de la osteoporosis.⁶⁶

Osteoporosis tipo I	Osteoporosis tipo II
50-75 años	75 años
Alto recambio	Bajo recambio
Debida a falta de estímulo estrogénico	Deficiencia crónica en la ingesta de calcio
Mujeres/varones: 6/1	Mujeres/varones: 2/1
Hueso trabecular	Trabecular y cortical
Pérdida ósea anual: 2 a 3% de la masa ósea total en los 6 a 10 primeros años tras la menopausia	Fracturas cuello femoral, húmero y pelvis
Fracturas vertebrales	

Aunque la prevalencia es significativamente mayor en población blanca, ya que la mitad de todas las fracturas de cadera a nivel mundial ocurren en el norte de Europa y Estados Unidos de América, se estima que para el 2050 el mayor incremento de fracturas de cadera por osteoporosis ocurrirá en América Latina.⁶⁸⁻

⁶⁹

Así mismo, en México, Delezè *et al.* (1997) encontraron una frecuencia del 19.5% con un mayor predominio en las mujeres y en los mayores de 70 años, señalando que la densidad mineral ósea de los mexicanos en términos generales es menor que la de los europeos y norteamericanos.⁷⁰⁻⁷¹

IV.3.3. Diagnóstico y tratamiento

La medición más comúnmente utilizada para diagnosticar la osteoporosis se basa en la evaluación de la DMO, que es determinada principalmente por el contenido mineral del hueso en un área conocida.

Se han desarrollado diferentes técnicas para evaluar la DMO en múltiples sitios del esqueleto, incluyendo el antebrazo, talón, tibia, rótula, falanges de los dedos, cadera y columna; pero las mediciones de la DMO en columna y cadera han mostrado correlacionar fuertemente con el riesgo de fracturas.⁷²⁻⁷³

Bajo el término de densitometría se incluyen varias técnicas diagnósticas que permiten cuantificar con exactitud la DMO, siendo la más utilizada la absorciometría por doble emisión de rayos X (DXA).⁶⁹

El diagnóstico de la osteoporosis se basa en los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). De acuerdo con ellos, la osteoporosis se define como un valor de DMO igual o inferior a $-2,5$ DE en relación con la media de la población adulta sana ($\leq -2,5$, en la escala T) y osteopenia cuando los valores se encuentran entre -1 y $-2,5$ DE. Estos criterios son aplicables a mujeres posmenopáusicas y al varón de más de 65 años, y se refieren a los valores de DMO obtenidos mediante DXA en cualquiera de las siguientes localizaciones esqueléticas: columna lumbar, fémur proximal (cuello, trocánter o fémur total) y antebrazo (1/3 distal del radio, también llamado 33% radio).⁷⁴⁻⁷⁵

La cuantificación de la masa ósea es la base diagnóstica de la osteoporosis, y la densitometría ósea es la mejor técnica disponible de medición de masa ósea y uno de los predictores más fiables en la estimación del riesgo de fractura. Así, el riesgo relativo de sufrir una fractura se incrementa aproximadamente al doble por cada descenso de una DE de la DMO.⁶⁹

Respecto del tratamiento, es importante mencionar que debido al impacto que tiene esta enfermedad, principalmente en los adultos mayores, es necesario implementar una serie de medidas preventivas durante las etapas tempranas de la vida, para procurar influir sobre la adquisición del pico de masa ósea, así como desarrollar estrategias para abordar a aquellas personas que aún no tienen osteoporosis, pero sí un alto riesgo de desarrollarla.

Dentro del tratamiento farmacológico recomendado para la osteoporosis, se encuentran los siguientes medicamentos:

- Suplementos de calcio
- Vitamina D o análogos de la vitamina D
- Estrógenos
- Progestinas
- Andrógenos
- Tibolona
- Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos
- Calcitonina
- Bifosfonatos
- Agentes anabólicos

IV.3.4. Factores de riesgo de la osteoporosis

La osteoporosis es de origen multifactorial; hasta un 46-62% de la densidad ósea es atribuible a factores genéticos. Son predictores de baja densidad ósea el sexo femenino, la edad avanzada y la raza blanca.

La incidencia de la osteoporosis disminuye entre los negros africanos y los japoneses. Algunos genes que intervienen en la masa ósea son los que regulan el receptor para la vitamina D, los colágenos tipo I y II, el factor de crecimiento B1 y el receptor estrogénico. La edad es un factor de riesgo independiente para desarrollar osteoporosis, pero está muy relacionada con la menopausia en la mujer. En el hombre, la edad es un factor de riesgo más específico y de hecho, en edades por encima de los 70 años tiende a igualarse la proporción mujer/varón, pasando a ser 2/1.

Aunque la densidad de masa ósea es el mejor predictor individual de la osteoporosis, varios estudios han demostrado que un factor de riesgo para fractura secundaria a la osteoporosis es haber padecido una previa por fragilidad.

Los adultos con historia de fractura previa por fragilidad, independientemente de su localización, tienen aumentado en un 50-100% el riesgo de presentar otra fractura de otro tipo. También los antecedentes de familiares de primer grado con fractura suponen un mayor riesgo de padecer osteoporosis.⁷⁶⁻⁷⁸

Por otro lado, la ingesta de calcio en la dieta es necesaria para un metabolismo óseo normal. El calcio se absorbe con dificultad en el intestino, no llegando al 30% de lo ingerido en adultos. Por ello, se precisan 1,100 mg/día de calcio para absorber 200 mg, al considerar la presencia de vegetales y la menor absorción que se produce con la edad.

El control de la absorción del calcio se ejerce por la vitamina D, que tiene una relación directa con la densidad ósea. La menor exposición solar ocasiona menos capacidad de la piel para sintetizar la provitamina D y alteración de la hidroxilación en el hígado y el riñón, con lo que se aumenta la reabsorción ósea. La dieta rica en fosfatos, por su interferencia en la absorción intestinal del calcio y el aumento de secreción de la hormona paratiroidea (PTH), aumenta el riesgo de la osteoporosis. El consumo elevado de proteínas ocasiona un incremento de la excreción urinaria de calcio, favoreciendo la aparición de la osteoporosis. El incremento del consumo de sodio se acompaña de un aumento en la excreción renal de calcio, por lo que las mujeres posmenopáusicas que ingieran 1000 mg de calcio diario no deben superar los 2000 mg de sodio.⁷⁹⁻⁸⁰

La inactividad física y el hábito sedentario aceleran la pérdida de masa ósea al anular los estímulos que influyen en el crecimiento y la remodelación ósea, con lo que predisponen a la osteoporosis. Una persona inmovilizada puede perder hasta el 40% de su masa ósea en un año. Algunos datos indican que los ejercicios de resistencia y “gran impacto” son los que poseen mayor beneficio. Las actividades aeróbicas de soporte de pesos también favorecen los mecanismos de carga que sostienen la masa ósea.⁸¹⁻⁸³

Las mujeres con un IMC bajo ($< 19 \text{ kg/m}^2$), o peso inferior a 58 kg tienen menor DMO, debido a que la menor carga mecánica sobre el hueso produce un menor efecto osteoblástico, y a que la carencia de panículo adiposo implica un menor depósito de estrógenos y, por tanto, una menor inhibición de la actividad osteoclástica.⁸⁴

El consumo crónico de alcohol tiene efecto depresor sobre la proliferación de los osteoblastos e interfiere en la absorción intestinal del calcio, además de asociarse con un proceso global de malnutrición. En cambio, el consumo moderado de

alcohol (200 ml semanales para mujeres y 400 ml para varones) se asocia con mayor osificación y reducción del riesgo de fracturas de cuello de fémur.⁸⁵

Las personas fumadoras (más de un paquete de cigarrillos/día) tienen una menor densidad mineral ósea y una mayor velocidad de pérdida ósea. La forma en que actúa el tabaquismo se desconoce, pero se cree que produce inducción de las enzimas hepáticas que metabolizan a los estrógenos y de esta forma disminuyen los efectos protectores de los estrógenos sobre el hueso en la prevención de fracturas.⁸⁶⁻⁸⁷

La cafeína aumenta la eliminación urinaria de calcio, y su consumo excesivo favorece la osteoporosis. La cafeína produce un balance negativo a través de una pérdida urinaria mayor de calcio, pero es limitada la información sobre la influencia de la ingesta de cafeína sobre la masa ósea, ya que los resultados son controversiales.⁸⁷⁻⁸⁸

Como ya se mencionó, la pérdida ósea asociada a la edad resulta del desequilibrio entre las fases de formación y de resorción ósea.

Se considera que la pérdida ósea asociada con el envejecimiento se produce de forma progresiva, debido a que la cantidad de hueso formado en cada ciclo de remodelado es insuficiente para reemplazar el hueso reabsorbido.

Por otro lado, es importante señalar que la mayoría de las investigaciones sobre la osteoporosis se encuentran encaminadas a dilucidar los mecanismos endócrinos y degenerativos; sin embargo, estudios recientes han demostrado que existe una asociación entre la osteoporosis y el EOx.

IV.4. Estrés oxidante

La utilización del oxígeno en los organismos aerobios debe ser un mecanismo eficiente para la obtención de energía en forma de ATP, pero durante este proceso se generan como subproductos los radicales libres (RL), moléculas altamente reactivas capaces de dañar a las biomoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN. Como consecuencia de este ataque ocurre la acumulación de moléculas oxidadas que van a provocar un deterioro y envejecimiento celular, cuyo proceso ha sido denominado la paradoja del oxígeno.^{1,89}

Los RL se pueden formar en el interior de las células como producto de la actividad fisiológica normal. En este sentido, el oxígeno (O₂) 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}).⁹⁰

IV.4.1. Fuentes endógenas y exógenas de radicales libres

Existen diferentes vías por las que un individuo puede exponerse a la acción de los distintos RL; esto puede ser de forma endógena y/o exógena. De forma endógena, a través de los que se generan en el metabolismo normal y, de forma exógena, por diferentes agentes que tienen la habilidad de generar RL en el organismo.

Producción intracelular de RL

A causa de su extrema reactividad, anteriormente no se consideraba posible la existencia natural de los RL en los organismos vivos. Fue hasta hace poco que se reconoció que los radicales derivados del oxígeno se forman en los seres vivos, incluyendo a los humanos como producto de la actividad fisiológica normal, y que éstos representan un papel fundamental en la homeostasis del organismo. 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 la síntesis de prostaglandinas.⁹⁰⁻⁹¹ Algunos de los mecanismos por los que se pueden generar los RL se describen a continuación:

- Auto-oxidación de moléculas pequeñas. Una gran variedad de componentes celulares solubles son capaces de sufrir reacciones de óxido-reducción en ambientes acuosos neutros, convirtiéndose en RL. Ejemplo de estos compuestos son los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas.⁹²⁻⁹³
- Por medio de reacciones con enzimas y proteínas. Numerosas enzimas generan RL durante su ciclo catalítico. La más estudiada es la xantina oxidasa; ésta genera $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 ; las concentraciones de estos radicales dependen del pH del medio, de la concentración de O_2 y la concentración del sustrato.⁹²⁻⁹³
- Por el transporte de electrones. Este mecanismo se lleva a cabo en la mitocondria, a la cual se le considera la principal fuente de RL (figura IV.6),

debido a que en ésta se consume entre el 85% y el 90% del oxígeno que la célula necesita para la producción del ATP.⁹⁴ Para poder explicar el transporte o cadena de electrones se reconocen cuatro complejos fundamentales, los cuales se encuentran constituidos a su vez por diferentes subunidades (cuadro IV.4). Cada uno de estos cumple una función específica para que se lleve a cabo el transporte de electrones, los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) captan las moléculas NADH y FADH₂ provenientes del metabolismo, las cuales contienen a los electrones y los envían a través de una serie de reacciones a la ubiquinona. Ésta, 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. 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.⁹⁵⁻⁹⁶

Por otro lado, se ha demostrado que la mayoría del H₂O₂ mitocondrial es derivado de la reducción del oxígeno. La reducción del O₂ a H₂O por el citocromo C envuelve la transferencia de cuatro electrones con intermediarios no radicales; el O₂^{•-} es generado en grandes cantidades por la mitocondria en la membrana interna que es altamente reducida.^{94, 97}

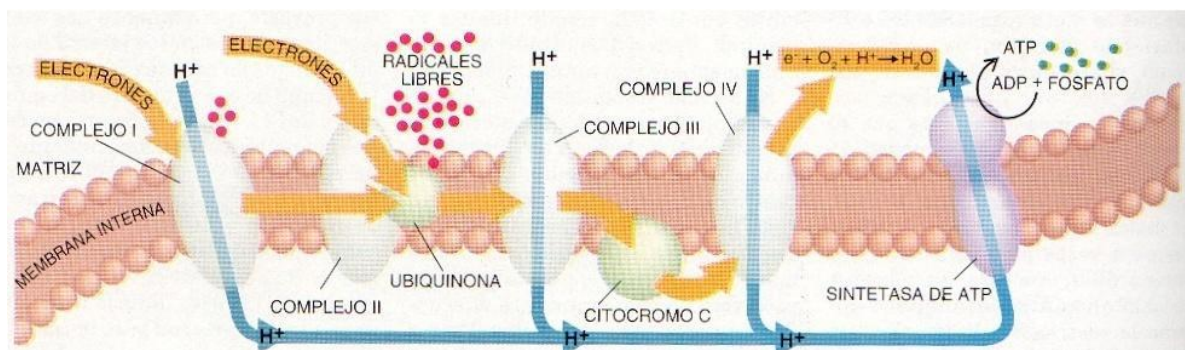


Figura IV.6. Producción de RL por la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria. Tomado de Weindruch (1998).⁹⁷

- Transporte de electrones en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico. Los RL que se forman en la mitocondria y llegan a escapar de ésta inician una serie de reacciones en el citosol, en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico, que van a provocar la formación de nuevos RL y un daño considerable en estos organelos.⁹⁴⁻⁹⁵
- Peroxisomas. Son fuentes celulares de H_2O_2 , pero no se ha visto que generen $O_2^{\bullet-}$. Algunos ejemplos de enzimas de este organelo son la D-aminoácido oxidasa, la urato oxidasa y la L- α hidroxiaácido oxidasa. Se calcula que la proporción de H_2O_2 peroxisomal que puede difundirse al citoplasma es alrededor del 2%.^{90,98-99}
- Estallido respiratorio. Cuando el organismo es atacado por microorganismos patógenos, se activa un mecanismo de defensa que tiene como objetivo eliminar estos microorganismos. Para ello, el organismo cuenta con las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y eosinófilos). La eliminación comienza con la fagocitosis y, simultáneamente, se desencadenan el estallido respiratorio (consumo de O_2) y la degranulación (liberación del contenido de los gránulos citoplásmicos a la vacuola fagocítica). El estallido respiratorio es una serie de reacciones metabólicas caracterizadas por un acelerado consumo de O_2 por los fagocitos y tiene como finalidad la muerte del microorganismo ingerido por medio de los RL.¹⁰⁰⁻¹⁰¹

Cuadro IV.4. Complejos de transferencia de electrones existentes en la matriz interna de la mitocondria.⁹⁹

Complejo	Subunidades	Función
Complejo I (NADH-biquinona reductasa)	Constituido con 10-12 subunidades, entre ellas NADH* deshidrogenasa	Primer sitio donde los H ⁺ son transportados fuera de la matriz mitocondrial
Complejo II (succinato-ubiquinona reductasa)	Conformado por 7-8 subunidades, entre ellas FAD, tres centros de fierro no hemo y una molécula de citocromo b	Con la transferencia de H ⁺ y electrones a la ubiquinona, se forma el ubiquinol, el cual difunde a la membrana para transferir sus electrones al complejo III
Complejo III (ubiquinol-citocromo reductasa)	Contiene 11 subunidades como son 2 citocromos b y los citocromos c y c ₁ , así como proteínas con 2-fierros y 2-azufres	El citocromo c se desplaza en el espacio intermembranal y transfiere electrones del citocromo c ₁ al citocromo a del complejo IV
Complejo IV (citocromo oxidasa)	Compuesto por 13 subunidades, incluye citocromo a y a ₃	Tres unidades tienen actividad catalítica, tanto en la reducción del O ₂ como en el transporte del H ⁺ ; las otras subunidades tiene función reguladora

* Es el primer donador de electrones del sistema.

Generación de RL por agentes externos

Por otro lado, entre los agentes externos al organismo que pueden generar RL tenemos a los agentes antineoplásicos como la adriamicina, daunorubicina, que tienen la capacidad de reducir el oxígeno a $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y HO^{\cdot} , algunos medicamentos como los anestésicos y antibióticos, las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) y agentes del medio ambiente como la contaminación, los pesticidas, el humo de los cigarrillos, etc.^{94,102}

IV.4.2. Daño a biomoléculas

Durante el metabolismo celular se producen una gran cantidad de RL y peróxidos, los cuales pueden escapar del sitio de formación y atacar a los componentes celulares, siendo los lípidos, las proteínas y el ADN los principales blancos de ataque de estas especies reactivas.

Daño a lípidos

Todas las biomoléculas pueden ser atacadas por los RL, pero los lípidos son probablemente los más susceptibles. Al respecto, las membranas celulares son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son atacados por los RL oxidándolos.¹⁰³

La peroxidación de los lípidos de la membrana se inicia por la generación de las especies reactivas del oxígeno (EROs), como el radical hidroxilo, el cual es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de la cadena del ácido graso poli-insaturado, formando un radical de ácido graso. Este último puede sufrir un rearrreglo molecular y presentarse en la forma de dieno conjugado, que puede reaccionar con el oxígeno para formar el radical ácido graso peroxil, el cual es capaz de sustraer otro hidrógeno de los ácidos grasos, provocando una reacción en cadena que produce una mayor cantidad de RL, dañando así a las membranas celulares (figura IV.7).¹⁰³⁻¹⁰⁴

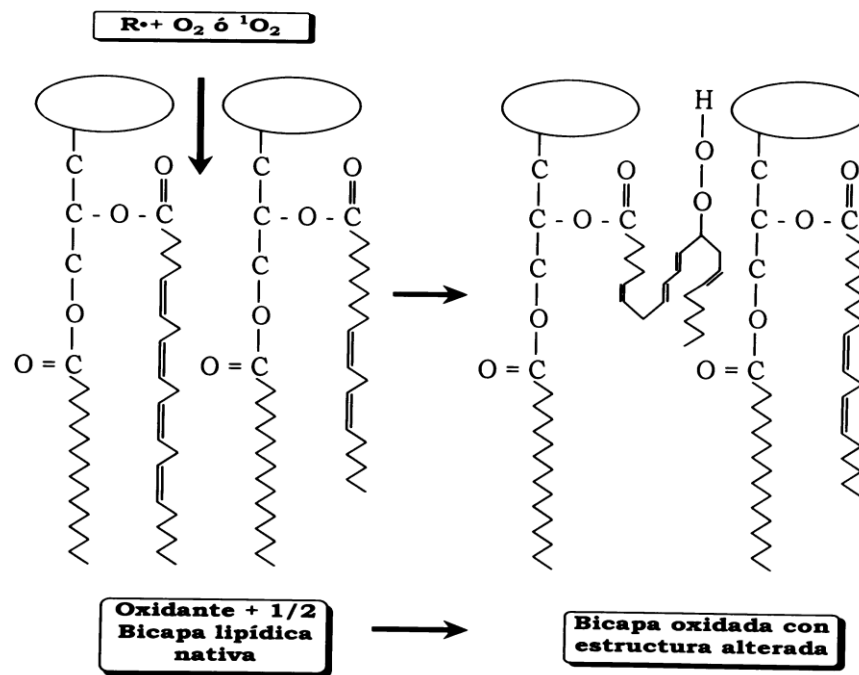


Figura IV.7. Daño de la membrana celular por RL. La oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados de la membrana va a provocar pérdida en la fluidez, aumento en la permeabilidad a los iones, alteración en la actividad de los receptores de membrana y, finalmente, la muerte celular.

Daño a proteínas

Por otro lado, aunque las proteínas son menos susceptibles al ataque de los RL, también resultan dañadas por éstos. Al ser oxidadas se fragmentan y se unen entre sí, dando lugar a entrecruzamientos que dan como resultado la pérdida de funcionalidad de la proteína. Se ha establecido que proteínas con residuos de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína son más susceptibles al daño por RL.

Daño al ADN

En relación con el ADN, los RL llegan a inducir en éste entrecruzamientos que pueden dar lugar a mutaciones, las cuales traen como consecuencia daño a genes y a sus productos. Ésto a su vez, induce a un mal funcionamiento de la célula, siendo éste el principio de la mayoría de los trastornos orgánicos degenerativos.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶

IV.5. Sistema antioxidante

Las reacciones de los RL van a provocar una propagación de reacciones, en donde el evento final va a ser el daño a proteínas, lípidos y ADN, lo cual a su vez puede conducir a la célula a la muerte.

La propagación de reacciones de los RL puede continuar indefinidamente o ser detenida por una variedad de moléculas que atrapan o neutralizan a los radicales. Estas moléculas son llamadas las defensas antioxidantes. Ellas se encargan de la supervivencia de los organismos expuestos a los RL, son esenciales para la integridad de la célula y su disminución puede provocar un desequilibrio entre oxidantes/antioxidantes.¹⁰⁷

Un antioxidante es una molécula química que retarda o previene la oxidación de un sustrato como los lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. El sistema antioxidante opera a diferentes niveles y, de acuerdo con estas características, se le ha clasificado como antioxidantes enzimáticos, antioxidantes no enzimáticos y las proteínas atraparoras de metales (figura IV.8).

Los antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos atrapan a los RL y los transforman en compuestos menos nocivos o los eliminan, evitando así que dañen a las biomoléculas celulares, mientras que las proteínas atraparoras de metales actúan transportando y almacenando a los iones metálicos para evitar la participación de éstos en la generación de RL.¹⁰⁸

Antioxidantes enzimáticos

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

Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD fue descubierta en 1968 por MacCord y Fridovich en Estados Unidos, como una enzima eritrocitaria capaz de remover catalíticamente el radical O_2^{\bullet}

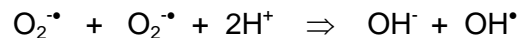
Existen tres diferentes formas de SOD:

- Cu/ Zn-SOD. Es una enzima muy estable y fácilmente aislada, encontrada en el citoplasma de la célula, posee un peso molecular de 32000 unidades,

contiene dos subunidades proteicas, así como un sitio activo que contiene al ión cobre, mientras que el ión zinc tiene la función de estabilizar a la enzima.

- Mn-SOD. Enzima encontrada en la mitocondria; contiene manganeso en su sitio activo, tiene un peso molecular de 40000 unidades, funciona mejor a pH 7, no es inhibida por cianuro, pero es más lábil al calor y sustancias químicas que la antes mencionada. Está formada por cuatro subunidades proteicas.
- Cu/ Zn SOD (ec). Es una molécula de alto peso molecular, de 135000 unidades, que se encuentra fuera de la célula. Tiene la capacidad de unirse a la heparina.

La función de SOD es dismutar el radical superóxido, convirtiéndolo a peróxido de hidrógeno, mediante una reacción redox en la que actúa el ión metálico presente en la enzima.

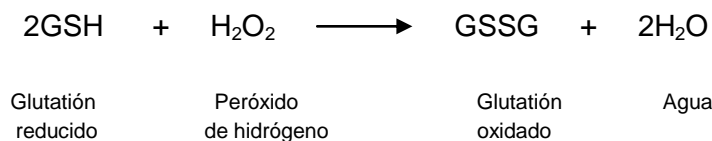


Las distintas formas de la SOD utilizan el mismo mecanismo protector, su diferente composición se debe a que han sido adaptadas de acuerdo con el tejido donde realizan su función.

Es importante resaltar que esta enzima es necesaria para la vida, ya que se han realizado estudios de ingeniería genética que han excluido al gen que codifica a esta enzima, encontrando que se produce una mutación de tipo letal.¹⁰⁹⁻¹¹³

Glutación peroxidasa

Por otro lado, la Gpx cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y H₂O₂, utilizando glutatión reducido como sustrato.



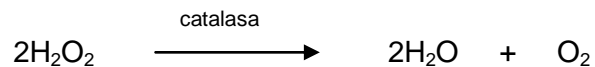
Esta enzima se encuentra en varias formas:

- GPx no selenio dependiente. Son isoenzimas de la glutatión -S- transferasa, que no utilizan H₂O₂, ni terbutilhidroperóxido como sustratos.
- GPx selenio dependientes. Son enzimas tetraméricas que se encuentran tanto en citoplasma como mitocondria. De estas existen a su vez cuatro tipos.

La actividad de la GPx se ha relacionado mucho con la de la catalasa; sin embargo, mientras la GPx es una enzima que se encuentra en citoplasma y matriz mitocondrial que metaboliza peróxidos orgánicos tan bien como H₂O₂, la catalasa es una enzima peroxisomal que sólo actúa sobre H₂O₂. Por otro lado, los niveles de GPx son más altos en la mayoría de las células. Además, su valor de Km (constante de velocidad de reacción) es menor; esto explica la importancia primaria de la GPx en la mayoría de los tejidos.^{110,113}

Catalasa

Con respecto a la catalasa, se sabe que es una enzima formada por cuatro subunidades proteicas unidas a un grupo hemo, se encuentra principalmente en los peroxisomas y actúa sobre el H₂O₂ liberado por la SOD.



Sin embargo, Cutler (1991) ha reportado una correlación negativa para esta enzima con el potencial de esperanza de vida en los organismos, lo que indica que no es determinante en la longevidad de los mamíferos.^{111,114}

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:

Vitamina A. Actúa eliminando al oxígeno singulete y a los peróxidos lipídicos, protegiendo a las membranas celulares.

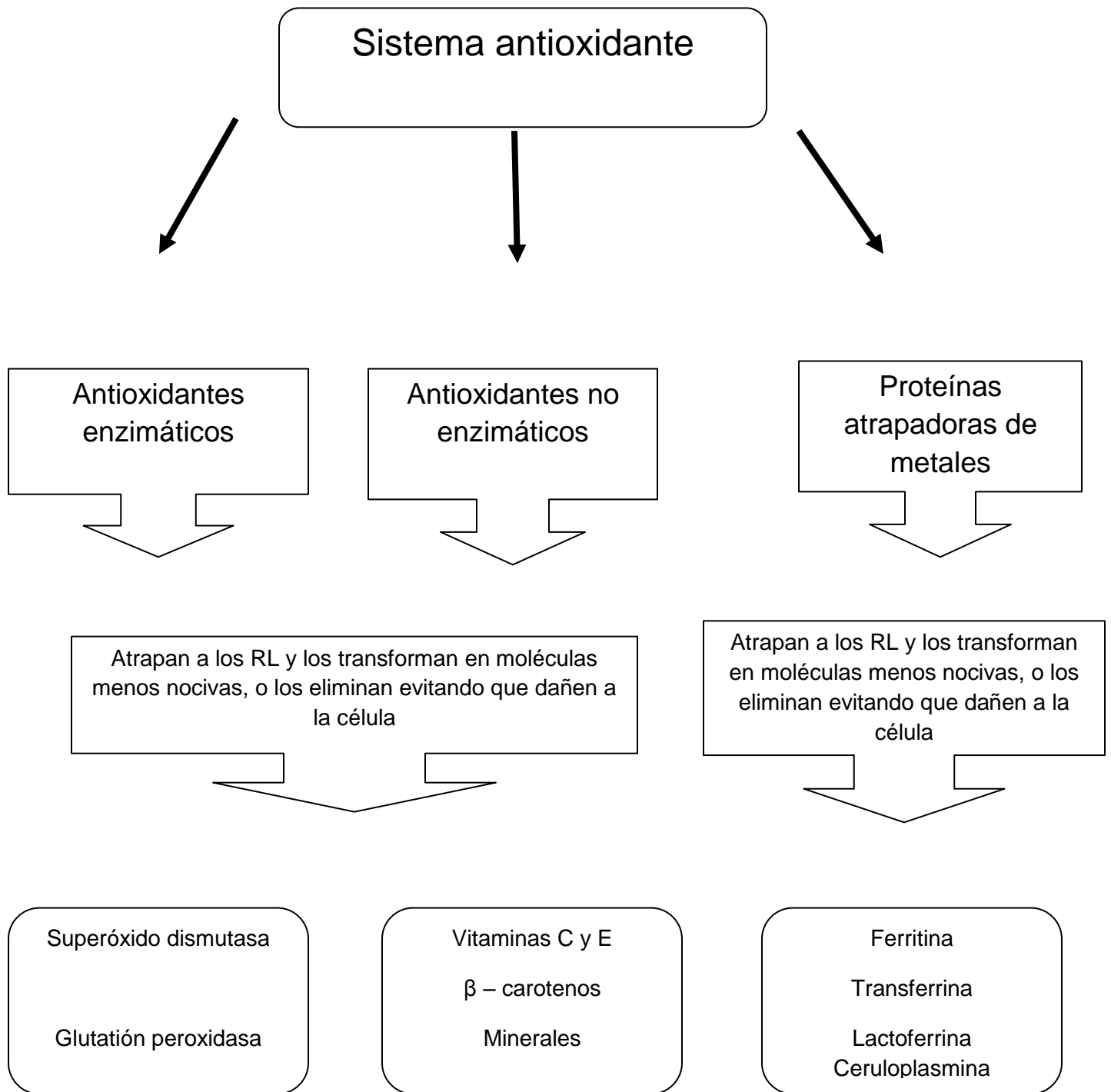


Figura IV.8. Sistema antioxidante y sus tres niveles de defensa.

Vitamina C. Es considerada el mayor antioxidante en el plasma, debido a que es capaz de reaccionar con el ión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el ión hidroperóxido ($HO_2^{\cdot -}$) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}).

Vitamina E.- Esta vitamina actúa rompiendo la cadena de reacciones que caracteriza a la lipoperoxidación al interceptar a los radicales peroxilos.

Selenio (minerales). Es el componente principal de la enzima glutatión peroxidasa. Es necesario tomarlo en la dieta 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.

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.¹¹⁵

Polifenoles (fitoquímicos). Se encuentran en frutas, vegetales y bebidas obtenidas de plantas. La propiedad antioxidante de estos compuestos está relacionada con su estructura molecular, depende del número de anillos fenólicos que presente, de la posición de los grupos hidroxilo y de la posición de otros grupos funcionales. 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, se han descrito más de 6,000 compuestos.¹¹⁶

Coenzima Q10 (suplementos). Es una benzoquinona liposoluble; 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. La función de la Q10 es evitar la lipoperoxidación en las membranas celulares, así como la regeneración de la vitamina E y de la vitamina C a sus formas activas.¹¹⁷

Ácido lipoico. Está compuesto por una estructura de ocho carbonos y dos grupos tiol; presenta un comportamiento anfipático que le permite participar en los mecanismos de defensa antioxidantes en la fase hidrofílica e hidrofóbica de la membrana. El ácido alfa lipoico es la forma oxidada y el ácido dihidrolipoico la reducida; ambas tienen actividad antioxidante, pueden atrapar EROs, quelar metales de transición y son capaces de regenerar antioxidantes como el glutatión y las vitaminas E y C.¹¹⁸

Proteínas atrapadoras de metales

Ferritina. Es una proteína intracelular que previene la acumulación excesiva de hierro y es capaz de inhibir la peroxidación al quelar sales de hierro.¹⁰⁷

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.¹⁰⁷

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 4.¹⁰⁷

Ceruloplasmina. Es la proteína plasmática que contiene unido a más del 90% del ión cobre (Cu²⁺); es capaz de inhibir al O₂^{-•} y H₂O₂, pero su mayor contribución como antioxidante es que remueve rápidamente los iones ferrosos en solución.¹⁰⁷

Albúmina. Esta proteína tiene la capacidad de enlazar diferentes iones metálicos, absorber ácido hipocloroso (HClO) y es la responsable de atrapar entre el 10 y el 50% de radicales peroxilo que se generan en el plasma humano.¹⁰⁸

IV.5.1. Vitaminas antioxidantes

Como ya se mencionó, entre los antioxidantes secundarios se encuentran las vitaminas C y E. A estas vitaminas se les considera excelentes antioxidantes por su capacidad para neutralizar o controlar la toxicidad de las ERO's y evitar el daño celular.

Ácido ascórbico o vitamina C es una vitamina hidrosoluble compuesta por 6 carbonos en forma de lactano, lo que le permite funcionar como un cofactor en diversas reacciones de hidrolización y amidación al transferir electrones a enzimas que proporcionan equivalentes reductores. Esta vitamina es el principal antioxidante hidrosoluble que remueve los RL del plasma, citoplasma y mitocondrias, atrapa iones superóxido y radicales peroxilo antes de que inicie la peroxidación lipídica, protegiendo con esto a las membranas celulares y atenuando de esta manera la progresión de las enfermedades relacionadas con el EOX; además, potencia la actividad de la vitamina E al regenerar el alfa tocoferol desde su forma oxidada.¹¹⁹⁻¹²⁰

La vitamina C se oxida al transferir electrones a las EROs, transformándose en ácido dehidroascórbico, el cual es estable debido a la resonancia de sus dobles

enlaces. El ácido ascórbico puede ser regenerado por medio del GSH o por vía enzimática por la reducción de NADH.¹²¹

Vitamina E. Esta denominación es utilizada para describir un grupo de al menos ocho compuestos que contienen actividad de α -, β -, δ - y γ -tocoferoles, siendo el más abundante el α -tocoferol. Debido a sus características de liposolubilidad es considerado el más potente antioxidante en la fase lipídica, ya que previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, deteniendo la cadena de autooxidación, además de participar en la estabilidad de las lipoproteínas e influir en la arquitectura de los fosfolípidos (figura IV.10).¹²²⁻¹²⁴

La vitamina E atrapa principalmente radicales peroxilo y es capaz de actuar sobre radicales alcoxilo, superóxido, oxígeno singulete, ozono y especies reactivas de nitrógeno.¹²²

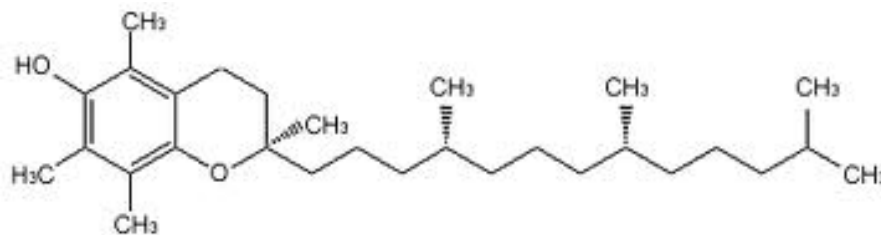


Figura IV.10. Estructura química del alfa-tocoferol. Tomado de McCall (1999).¹²⁵

IV.6. Relación del estrés oxidante con la densidad mineral ósea

En algunas investigaciones se ha demostrado, que el exceso de RL en el organismo provoca el aumento de los lipoperóxidos y, consecuentemente, un desequilibrio entre los RL y el sistema antioxidante, denominado EOx, el cual constituye uno de los mecanismos etiológicos y fisiopatológicos de diferentes enfermedades, como la diabetes mellitus, aterosclerosis, cataratas, hipertensión y osteoporosis, entre otras.^{4,2-126}

En cuanto a la relación del EOx con el metabolismo óseo, se ha demostrado que los RL y EROs intervienen en la resorción ósea, promoviendo la diferenciación de las células precursoras osteoclasticas a osteoclastos e inhibiendo la diferenciación

de los osteoblastos, de tal manera que la resorción ósea se incrementa por la influencia del EOx.³⁻¹²⁷

En investigaciones realizadas con modelos animales y cultivos celulares, se observó que las EROs activan el receptor NF-kB, el que a su vez promueve la síntesis de las citocinas IL- 1 y 6 y el TNF, que tienen como función primordial en el metabolismo óseo promover la maduración de los osteoclastos, células encargadas de la resorción ósea.¹²⁸⁻¹³⁰

En este sentido, Mody *et al.* (2001) demostraron que el EOx promueve la calcificación de las células vasculares e inhibe la diferenciación de las células del sistema óseo, lo cual sugiere que la acumulación de las LDL en las células vasculares pueden, en paralelo, provocar la calcificación vascular y pérdida de hueso que puede llevar al organismo a osteoporosis.¹³¹

También se ha observado que en individuos con osteoporosis se encuentran concentraciones elevadas de marcadores de EOx, como son lipoperóxidos, F2-isoprostanos, MDA y 8-iso-PGF2 α , mientras que otras investigaciones experimentales han mostrado que en las personas que padecen osteoporosis los antioxidantes exógenos, como las vitaminas A, C y E y las enzimas antioxidantes SOD y GPx, así como el ácido úrico, disminuyen.¹³²⁻¹³⁵

Sontakke *et al.* (2002) señalan el aumento significativo de MDA en mujeres postmenopaúsicas con osteoporosis, mientras que Franceschi *et al.* (1992) encontraron que la vitamina C es un cofactor crucial para la formación y estabilización del colágeno en el tejido óseo y, por lo tanto, señalan que este antioxidante juega un papel importante en la formación y resorción de hueso.¹³⁶⁻¹³⁷

Por otro lado, Ozgocmen *et al.* (2007) muestran un incremento en los niveles de MDA y NO en plasma y eritrocitos, así como una disminución significativa de la enzima antioxidante catalasa, en mujeres con osteoporosis. Asimismo, Hall *et al.* (1995) señalan que la diferenciación osteoclástica y la función de estas células se ve estimulada por las EROs, especialmente por el H₂O₂ y el radical superóxido (figura IV.11).¹³⁸⁻¹³⁹

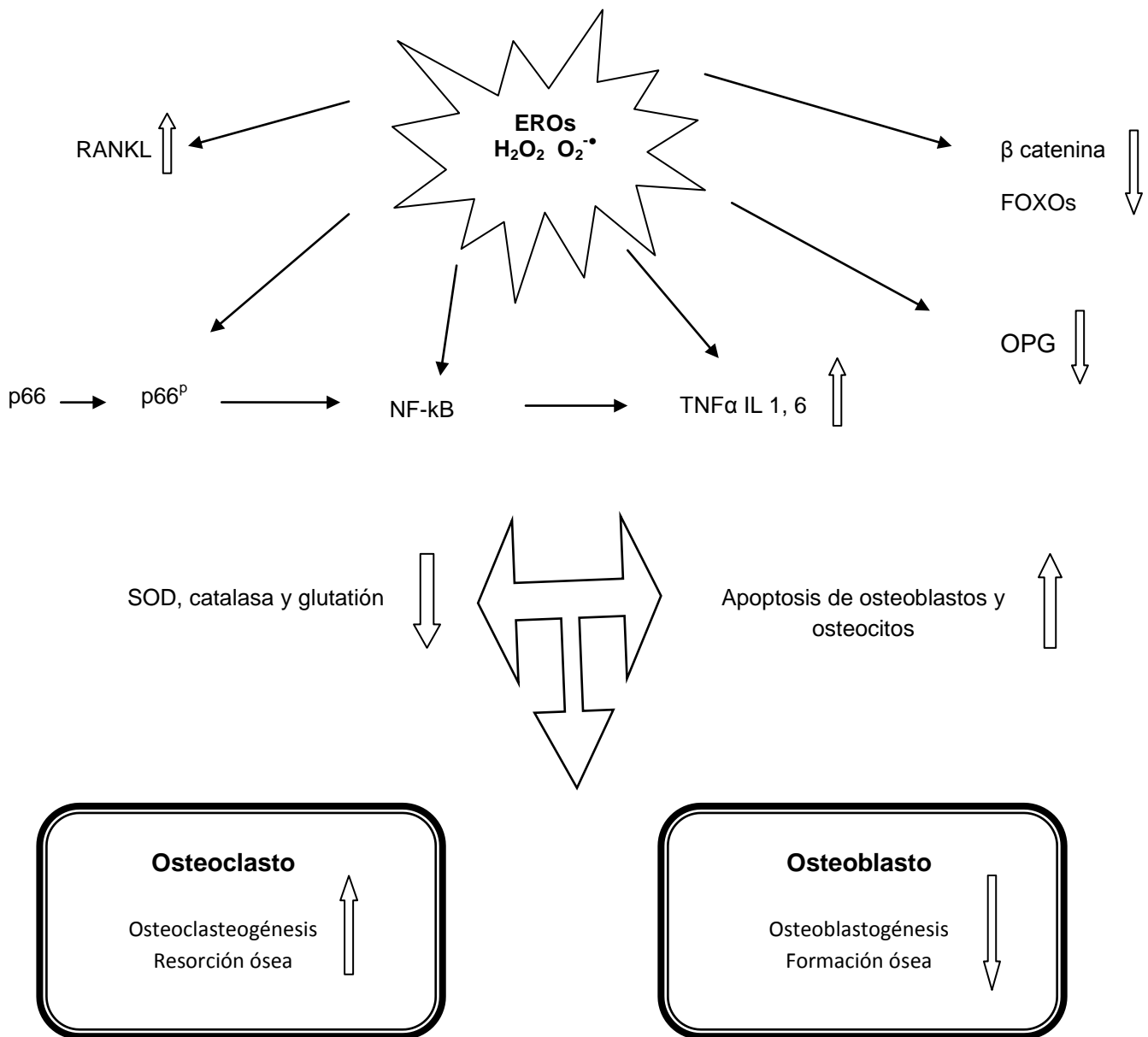


Figura IV.11. Remodelación ósea y EOX. Las EROs van a provocar de forma directa o indirecta la fosforilación de la proteína p66, la amplificación en la producción del RANKL y en la síntesis de TNFα, IL 1 y 6; así como la disminución de los factores de transcripción de β-catenina, FOXOs y OPG. Lo que a su vez se traduce en la pérdida de masa ósea, asociada al aumento de la osteoclastogénesis y la apoptosis de osteoblastos y osteocitos.

IV.7. Efecto de la administración del ácido ascórbico y el alfa-tocoferol sobre la densidad mineral ósea

Investigaciones recientes han demostrado que las enfermedades crónico-degenerativas de alta prevalencia en la vejez, como diabetes mellitus, hipertensión arterial, osteoartritis y osteoporosis, entre otras, están vinculadas con el estrés oxidativo; de ahí que se ha propuesto que el consumo adecuado de antioxidantes podría mejorar el pronóstico de estas patologías.¹²⁵ En relación con la osteoporosis, los estudios realizados sobre el consumo de antioxidantes, como posibles agentes que ayudan a disminuir la pérdida de masa ósea, incluyen a las vitaminas C, D, K, E y el té verde (cuadros IV.5 y IV.6).

Se ha demostrado que la vitamina D es una hormona esencial para que se lleve a cabo de manera correcta el metabolismo óseo, y la deficiencia de ésta puede llevar a la osteoporosis. Es por ello que existen diferentes investigaciones en donde se relaciona el consumo de esta vitamina con el riesgo de sufrir fracturas (cuadro IV.5). Al respecto, Chapuy *et al.* (1992), en un estudio aleatorio con grupo placebo y con duración de 3 años, comprobó en 2,790 mujeres ancianas que la administración de 1.200 mg de calcio y 800 UI de vitamina D al día, disminuían de forma significativa la frecuencia de fracturas de cadera en un 25% y otras fracturas no vertebrales en 15%. Por otro lado, Dawson-Hughes *et al.* (1997), en un estudio doble ciego, evaluaron el efecto de la administración de complementos de 500 mg de calcio y 700 UI de vitamina D diarios en un período de 3 años, en una población de 176 varones y 213 mujeres de 65 años y más. Estos investigadores encontraron que la administración de complementos de calcio y vitamina D previene la pérdida ósea en todas las localizaciones esqueléticas medidas (cuello femoral, columna vertebral y la corporal total) y disminuyó la incidencia de fracturas no vertebrales en un 50%. Recientemente, Trivedi *et al.* (2003) realizaron un estudio en población sana mayor de 65 años, a la que se le administró suplementos de 800 UI de vitamina D sin calcio cada 4 meses durante 5 años, encontrando una disminución en el riesgo de fracturas de un 39%.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Por lo que se refiere a la vitamina K, se ha señalado su eficiencia para el tratamiento de la osteoporosis y en la prevención de fracturas. Shiraki *et al.* (2000), en un estudio con mujeres posmenopáusicas encontraron que la incidencia de fracturas disminuía en quienes habían consumido vitamina K con respecto a los placebos, aunque no presentaban cambios significativos en la concentración de los marcadores de resorción ósea. De igual forma Cheung, *et al.* (2008), pero con mujeres posmenopáusicas con osteopenia, encontraron que

disminuía la incidencia de fracturas, sin que se presentaran cambios en los marcadores de resorción ósea.¹⁴³⁻¹⁴⁴

Con relación a la vitamina A y los carotenos, no existe un consenso en los resultados. Algunas investigaciones han encontrado que concentraciones altas de vitamina A en la dieta se asocian con el aumento en el riesgo de fracturas, debido al aumento en la resorción ósea y a la hipercalcemia, mientras que otros argumentan que su metodología y la población no ha sido la adecuada. Barker *et al.* (2005), en un estudio con mujeres mayores de 75 años, en donde se examinó la relación entre el consumo de retinol y carotenos con el riesgo de fracturas, no encontraron relación entre ellos, mientras que Sahni *et al.* (2009) detectaron una asociación inversa entre el consumo de carotenos con la DMO de cadera columna y radio.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶

Por otro lado, los estudios recientes señalan que la ingestión de té verde puede beneficiar la salud de los huesos, debido a que disminuye el EOx, la expresión de los mediadores pro-inflamatorios y aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes. En diferentes investigaciones se ha encontrado que el consumo de té verde, de una a seis tazas, incrementa la DMO de cadera, columna y fémur en mujeres posmenopáusicas y en mayores de 60 años.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

En el caso de las vitaminas C y E (cuadro IV.6), estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en alimentos antioxidantes ayuda a mantener en estado saludable los huesos. Arjmandi *et al.* (2002), demostraron que la administración de vitamina E tiene un efecto benéfico sobre la calidad del hueso en ratas viejas, mientras que Franceschi *et al.* (1994) señalan que la vitamina C es un cofactor crucial para la formación y estabilización del colágeno en el tejido óseo; por lo tanto, este antioxidante juega un papel importante en la formación y resorción de hueso. Al respecto, se han observado niveles bajos de vitaminas C, E, y de antioxidantes endógenos en mujeres de edad avanzada con osteoporosis.^{137,150}

También se ha demostrado la asociación positiva entre el consumo de vitamina C en la dieta y la DMO en mujeres postmenopáusicas.¹⁵¹

Melhus *et al.* (1999) observaron que el consumo bajo de vitaminas C y E incrementa el riesgo de fractura de cadera en mujeres fumadoras con respecto a las no fumadoras, sugiriendo que el EOx por el tabaquismo, tiene efectos adversos en el sistema óseo y que una dieta deficiente en vitaminas C y E puede incrementar significativamente el riesgo de sufrir fractura de cadera.¹⁵²

Por su parte, Zhan *et al.* (2006) encontraron que un consumo adecuado de vitamina E, β -caroteno y selenio reducen significativamente el riesgo de fractura de cadera en ancianos fumadores con osteoporosis.¹⁵³

Por otro lado, se señala que la vitamina E tiene un efecto protector en el cartílago y en las células óseas, ya que evita su lipoperoxidación. La vitamina E y sus derivados inhiben la activación del NF-kB, que regula la producción de citocinas como la IL-6 y IL-1, las cuales son factores fundamentales para la activación de la resorción ósea.¹⁵⁴

Por último, es importante mencionar que los resultados de los diferentes estudios sobre la relación del EOx y la osteoporosis, así como el consumo de antioxidantes y su efecto sobre la DMO, son inconsistentes. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la efectividad de la administración de alfa tocoferol y ácido ascórbico sobre el EOx y la DMO en adultos mayores sanos y con osteopenia, con el fin de proponer programas de intervención para la prevención y control de la osteoporosis, para con ello prevenir las fracturas y evitar los altos costos y el impacto social, económico y en la calidad de vida que causa este problema de salud pública en la vejez.

Cuadro IV.5. Estudios relativos al efecto de las vitaminas D, A, K y Té verde sobre la densidad mineral ósea

Autor y año	Universo de estudio	Objetivo	Cantidad y tiempo de vitamina administrada	Marcadores medidos	Hallazgos
Chapuy <i>et al.</i> (1992) ¹⁴⁰	2790 mujeres mayores de 70 años	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina D con la prevención de fracturas	800 UI de vitamina D y 1200 mg de calcio durante 3 años	Vitamina D Frecuencia de fracturas de cadera y en otros sitios	Disminuyó la frecuencia de fracturas de cadera en un 25% y en otros sitios en 50%
Dawson-Hughes <i>et al.</i> (1997) ¹⁴¹	213 mujeres 176 hombres	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina D con la prevención de fracturas	700 UI de vitamina D con 500 mg de calcio durante 3 años	Vitamina D Frecuencia de fracturas de cadera y en otros sitios DMO	Disminuye la pérdida de DMO en cuello femoral, columna y corporal total en 50%
Trivedi <i>et al.</i> (2003) ¹⁴²	649 mujeres 2037 hombres	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina D con la prevención de fracturas	800 UI de vitamina D sin calcio cada 4 meses durante 5 años.	Vitamina D Frecuencia de fracturas de cadera y en otros sitios DMO	Disminuye el riesgo de fracturas en un 39%
Meyer <i>et al.</i> (2002) ¹⁵⁵	1144 sujetos con un 75% de mujeres	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina D con la prevención de fracturas	400 UI de vitamina D sin calcio por 2 años	Vitamina D Frecuencia de fracturas de cadera y otros sitios	No disminuye la frecuencia de fracturas de cadera y otros sitios

Ruiz Ramos Mirna

Shiraki <i>et al.</i> (2000) ¹⁴³	190 Mujeres posmenopáusicas mayores de 60 años	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina K y la incidencia de fracturas	45 mg/d de vitamina K por 2 años	Marcadores de resorción ósea y riesgo relativo	No hubo cambios en los marcadores de resorción ósea, pero disminuyó la incidencia de fracturas (riesgo relativo de 0.44)
Cheung <i>et al.</i> (2008) ¹⁴⁴	300 Mujeres posmenopáusicas con osteopenia entre 40 y 82 años	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina K y la incidencia de fracturas	5 mg/d durante 2 años	Marcadores de resorción ósea y riesgo relativo	No hubo cambios en los marcadores de resorción ósea, pero disminuyó la incidencia de fracturas (riesgo relativo de 0.45)
Hegarty <i>et al.</i> (2000) ¹⁴⁷	1256 pacientes	Determinar la asociación entre el consumo de té verde y la DMO	0 tazas (n = 122) 1-3 tazas (n = 438) 4-6 tazas (n = 567) >6 tazas (n = 129)	DMO	Aumentó en un 5% la DMO con respecto a los placebos
Hoover <i>et al.</i> (1996) ¹⁴⁸	62 mujeres posmenopausicas	Determinar la asociación entre el consumo de té verde y la DMO	0 a 12 tazas	DMO	Aumentó en un 10% la DMO de columna y en un 14% la de fémur con respecto a los placebos
Devine <i>et al.</i> (2007) ¹⁴⁹	164 mujeres ancianas	Determinar la asociación entre el consumo de té verde y la DMO	1 taza por día	DMO	Disminuyó la DMO de cadera en 1.6% en las que tomaban té y en 4.0% en quienes no tomaban

Cuadro IV.6. Estudios relativos al efecto de las vitaminas C y E sobre la densidad mineral ósea.

Autor y año	Universo de estudio	Objetivo	Cantidad y tiempo de vitamina administrada	Marcadores medidos	Hallazgos
Leveille <i>et al.</i> (1997) ¹⁵⁶	1892 mujeres postmenopáusicas entre 55 a 80 años de edad	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina C en la dieta y la DMO	La ingesta de vitamina C en la dieta fue estimada por medio del cuestionario de frecuencia de alimentos	Se realizó la densitometría ósea de cadera y columna	No se encontró una asociación entre el consumo de vitamina C y la pérdida de DMO
Wong <i>et al.</i> (1997) ¹⁵⁷	125 mujeres postmenopáusicas	Determinar la asociación entre la vitamina C, calcio y proteínas y la DMO	La ingesta de vitamina C, calcio y proteínas en la dieta fue estimada por medio del cuestionario de frecuencia de alimentos	Se realizó la densitometría ósea de cadera y columna	No hubo asociación entre el consumo de calcio y proteínas con la DMO Se presentó asociación positiva entre la vitamina C y la DMO de cadera
Hall <i>et al.</i> (1998) ¹⁵¹	775 mujeres postmenopáusicas entre 45 y 64 años de edad	Determinar la asociación entre el consumo de vitamina C en la dieta y la DMO	La ingesta de vitamina A, C y carotenos en la dieta fue estimada por medio del cuestionario de frecuencia de alimentos	Se realizó la densitometría ósea de cadera y columna	Por cada 100 mg de vitamina C que se incrementen en la dieta, se da un incremento de 0.017 g/cm ² de DMO del fémur, no así en cadera y columna
Melhus <i>et al.</i> (1999) ¹⁵²	66,651 mujeres fumadoras entre 40 y 76 años, con historia de fractura previa.	Determinar si existe asociación entre el consumo de vitaminas antioxidantes con el incremento en el riesgo de fractura de cadera	La ingesta de vitamina C y E en la dieta fue estimada por medio del cuestionario de frecuencia de alimentos.	Se estratificaron en grupos de acuerdo al consumo de vitaminas 1) alto y 2) bajo.	El RM para el consumo bajo de vitamina E fue de 3 (1.6-5.4) y para vitamina C de 3 (1.6-5.6). Mientras que para el consumo alto fue de 1.1 (0.5-2.4) y 1.4 (0.7-3) respectivamente
Arjmandi <i>et al.</i> (2002) ¹⁵⁰	22 ratones de 6 meses y 30 de 24	Determinar la influencia del	1) 30 mg/Kg de vitamina E al día por 30 días	Se determinaron proteínas de matriz ósea y las propiedades	Aumentaron las proteínas de matriz ósea y mejoró la calidad del hueso

Ruiz Ramos Mirna

	meses	consumo de suplementos de vitamina E en la DMO de ratones jóvenes y viejos	2) 500 mg/Kg de vitamina E al día por 30 días.	bioquímicas del hueso y el RNA mensajero.	con un consumo alto de vitamina E
Wolf <i>et al.</i> (2005) ¹⁵⁸	11068 mujeres entre 50 y 79 años de edad	Determinar si la ingesta diaria de antioxidantes (vitaminas A, C y E) puede estar asociada con mayor DMO	La ingesta de antioxidantes en la dieta fue estimada por medio del cuestionario de frecuencia de alimentos	Se cuantificaron concentraciones séricas de retinol, carotenos y tocoferoles, así como la densitometría ósea de columna y cadera	No se encontró una asociación entre el incremento en el consumo de antioxidantes y la DMO Se encontró interacción significativa entre el consumo de la vitamina C y la terapia de remplazo hormonal, observándose un efecto benéfico en las mujeres con un consumo alto de vitamina C
Sahni <i>et al.</i> (2008) ¹⁴⁶	334 hombres y 540 mujeres con una media de edad de 75±5 años	Determinar la asociación de la ingesta de vitamina C con la DMO de cadera, columna y radio	La ingesta de vitamina C se evaluó con el cuestionario de frecuencia de alimentos	Se formaron tres grupos con base en el consumo de suplementos de vitamina C, 1) no suplementado, 2) consumo < 75 mg/dl y 3) consumo > 75 mg/dl. Se cuantificó el consumo en la dieta de vitamina C, D y E	Se encontró una asociación negativa entre el consumo alto de vitamina C, el consumo de suplementos con vitamina C y la DMO en los hombres fumadores. Mientras que se presentó un efecto protector en los hombres con bajo consumo de calcio y vitamina E Un consumo alto de frutas y vegetales tiene un efecto benéfico para la DMO
Sahni <i>et al.</i> (2009) ¹⁵⁹	334 hombres y 540 mujeres con una media de edad de 75±5 años	Determinar la asociación entre el consumo de carotenos y licopenos con DMO de cadera, columna y radio	La ingesta de carotenos y licopenos se evaluó con el cuestionario de frecuencia de alimentos	Se cuantifico el consumo en la dieta de carotenos y licopenos, se realizó la densitometría ósea de cadera, columna y radio	El consumo de carotenos evita la pérdida de DMO de trocánter en los hombres y de columna en las mujeres

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La osteoporosis es una enfermedad esquelética generalizada, caracterizada por una masa ósea disminuida, con un incremento en la fragilidad ósea y vulnerabilidad para las fracturas, cuya prevalencia e incidencia es significativamente mayor en la vejez y sobre todo en las mujeres.

Se ha demostrado que factores pro-oxidantes como el tabaquismo, el sedentarismo, el consumo excesivo de café, alcohol y bebidas gaseosas disminuyen significativamente la DMO. Asimismo, estilos de vida antioxidantes como la ingesta abundante de frutas y verduras y el ejercicio físico moderado podrían prevenir la osteoporosis.

Por otro lado, como ya se señaló, estudios recientes han demostrado una asociación etiológica y fisiopatológica entre el EOx y la osteoporosis, así como un posible efecto benéfico de la administración crónica de vitamina C y E, no obstante, las evidencias científicas en humanos ancianos son escasas e inconsistentes, de ahí que nos planteamos las siguientes preguntas de investigación

¿Cuál es la relación entre el EOx y la DMO en adultos mayores?

¿Cuál es el efecto de la administración de alfa tocoferol y ácido ascórbico sobre el EOx y la DMO en adultos mayores?

VI. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los reportes científicos respecto a la efectividad de la ingesta de α -tocoferol y ácido ascórbico sobre el control del EOx y su relación con la DMO en modelos animales y en población joven, suponemos que los adultos mayores que ingieran dichos antioxidantes por 12 meses mostrarán menor EOx y mayor DMO en comparación con los grupos control y placebo.

VII. OBJETIVOS

VII.1. Objetivo General

- Determinar la efectividad del alfa tocoferol y el ácido ascórbico sobre la reducción del EOx y el aumento en la DMO en adultos mayores.

VII.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de LPO, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx y la CAT pre-intervención y post-intervención, después del tratamiento a los 12 meses.
- Evaluar el efecto de la administración crónica de antioxidantes sobre la densidad mineral ósea en adultos mayores.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

VIII.1. Diseño y población de estudio. Previo consentimiento informado, se llevó a cabo un estudio cuasi-experimental doble ciego, una muestra a conveniencia de 116 personas mayores de 60 años con residencia en el área rural del Valle del Mezquital (Hidalgo, México) por más de 10 años, sin enfermedades crónicas, tabaquismo o alcoholismo, ni ingesta de antioxidantes u hormonales de reemplazo en el caso de las mujeres. La muestra fue dividida de manera aleatoria en cuatro grupos: (i) controles, (ii) placebo, (iii) Tx1 (500 mg de vitamina C con 400 UI de vitamina E por día, durante un año) y (iv) Tx2 (1 g de vitamina C con 400 UI de vitamina E por día, por un año). Los cuatro grupos fueron monitorizados cada 3 meses, de acuerdo con el diseño experimental que se muestra en la figura VIII.1.

Variables

Variables independientes

Tratamiento:

- i) Grupo control, ii) Grupo placebo, iii) Tx1 (500 mg de vitamina C con 400 UI de vitamina E) y iv) Tx2 (1000 mg de ácido ascórbico con 400 UI de alfa tocoferol).

Variables dependientes

EOx, medido a través de:

- Concentración de LPO
- CAT
- Actividad de las enzimas antioxidantes: SOD y GPx
- Razón SOD/GPx

DMO

- Sanos: valores > -1 DE en la escala de T*
- Osteopenia: valores entre -1 a -2.4 DE en la escala de T*
- Osteoporosis: con un valor \leq -2.5 DE en la escala de T*

(*Criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud)

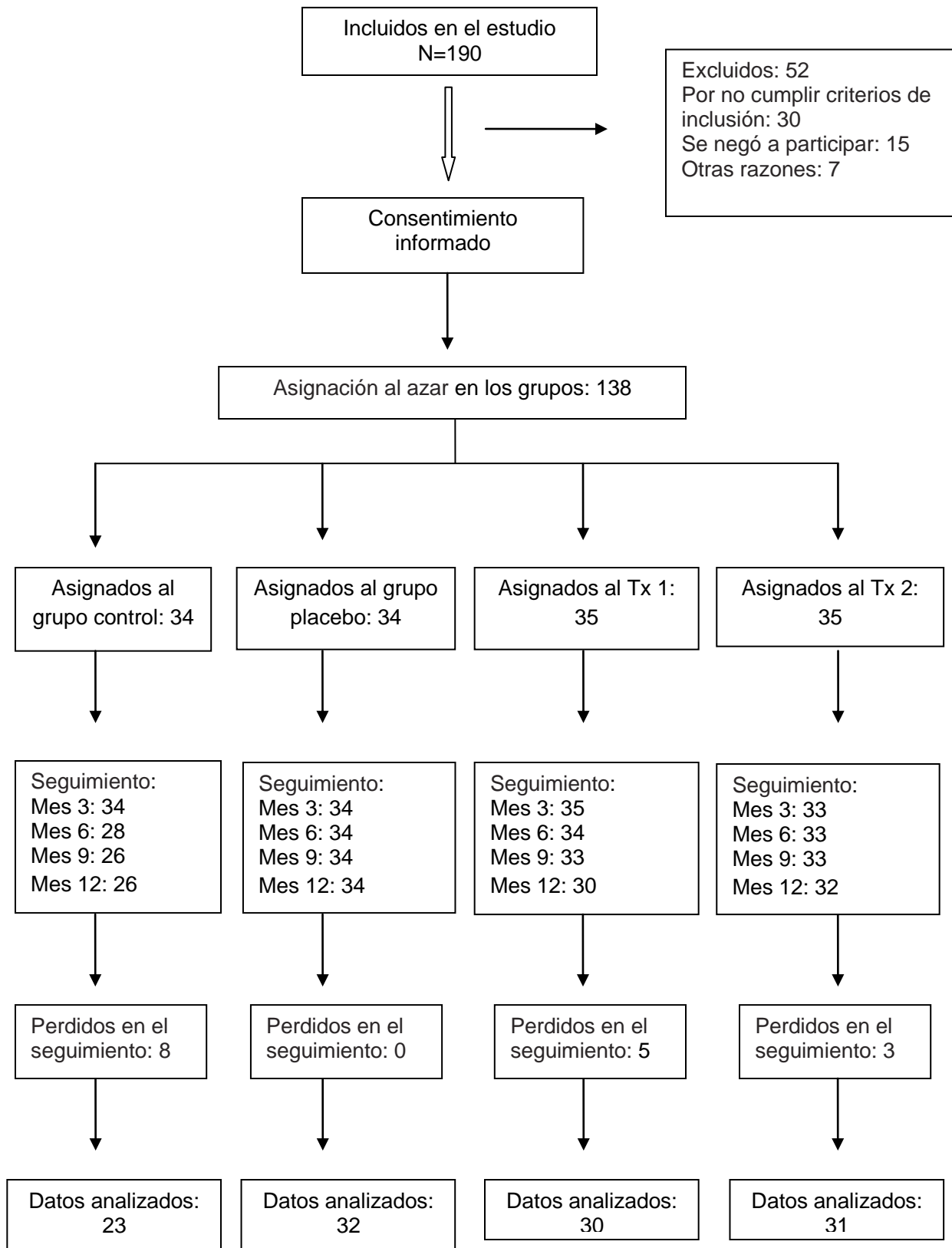


Figura VIII.1. Diagrama del seguimiento de los pacientes durante el estudio.

Cuadro VIII.1. Operacionalización de variables

Variables	Definición	Nivel de medición	Categoría
Estrés oxidativo	Desequilibrio bioquímico entre radicales libres y antioxidantes	Cualitativa Nominal	Positivo Negativo
Lipoperoxidación	Concentración de lipoperóxidos plasmáticos	Cuantitativa continua	µmol/L
Capacidad antioxidante total	Capacidad antioxidante del plasma	Cuantitativa continua	mmol/L
Actividad de SOD	Actividad enzimática de SOD	Cuantitativa continua	U/mL
Actividad de GPx	Actividad enzimática de GPx	Cuantitativa continua	U/L
Densidad mineral ósea	Cantidad de minerales (calcio y fósforo) presentes en el hueso	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	gr/cm ² y T-score <ul style="list-style-type: none"> • Sanos • Osteopenia • Osteoporosis
Sexo	Características fenotípicas del individuo	Cualitativa nominal	Hombre/mujer
IMC	Razón del peso dividido entre la estatura al cuadrado	Cuantitativa continua Cualitativa ordinal	Valor del IMC <ul style="list-style-type: none"> • IMC bajo (<22) • IMC Normal (22-27) • Sobrepeso (>27)

Técnicas

Material biológico. Sangre total obtenida por el sistema vacutainer sin anticoagulante y con heparina como anticoagulante. Se tomaron 2 tubos de 5 mL por paciente.

Material:

- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Pipetas
- Vasos de precipitado
- Probetas

Reactivos:

- Agua destilada
- Tetrametoxipropano (TMP)
- Ácido tricloroacético
- Ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Butiril hidroxitolueno (BHT)
- Equipo comercial de Randox para la determinación de antioxidantes (Ransel, Ransod y antioxidantes totales)

Equipo:

- Baño metabólico
- Centrífuga de 8 camisas
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Balanza granataria

Se llevó a cabo una evaluación de los parámetros bioquímicos, mediciones antropométricas, así como una cuantificación de la DMO central (cadera y columna lumbar).

Técnicas bioquímicas:

A los sujetos participantes en el estudio, con ayuno de 8 horas, se les tomaron muestras sanguíneas en tubos al vacío con heparina como anticoagulante entre 7-9 am, para la cuantificación del EOx a través de las técnicas de peroxidación

lipídica, capacidad antioxidante total y actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) y para la determinación de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL-colesterol las muestras se tomaron en tubos al vacío sin anticoagulante.

Las técnicas utilizadas fueron las siguientes:

- Glucosa: Estuche comercial para la determinación de glucosa. Método enzimático colorimétrico (Randox Laboratorios Ltd, GL 2614).

Fundamento: La glucosa se determina colorimétricamente después de una oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa.

Procedimiento: Muestras (suero) y patrón se mezclan e incuban con el reactivo de color durante 15 min. a 25°C y se mide la absorbancia a 500 nm frente al blanco de reactivo.

- Colesterol: Estuche comercial para la determinación de colesterol. Método enzimático de punto final CHOD-PAP (Randox Laboratorios Ltd, CH 201).

Fundamento: El colesterol se determina colorimétricamente después de hidrólisis enzimática y oxidación.

Procedimiento: Muestras (suero) y patrón se mezclan e incuban con el reactivo de color durante 10 min. a 25°C y se mide la absorbancia a 540 nm frente al blanco de reactivo.

- Triglicéridos: Estuche comercial para la determinación de triglicéridos. Método enzimático colorimétrico GPO-PAP (Randox Laboratorios Ltd, UK TR212).

Fundamento: Los triglicéridos se determinan tras la hidrólisis enzimática con lipasas.

Procedimiento: Muestras (suero) y patrón se mezclan e incuban con el reactivo de color durante 10 a 15 min. a 25°C y se mide la absorbancia a 500 nm frente al blanco de reactivo.

- HDL-colesterol: Reactivo precipitante colesterol y paquete suplementario para colesterol CHOD-PAP. Método enzimático colorimétrico (Randox Laboratorios Ltd, CH 204 y CH 201).
-
-

Fundamento: Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), muy baja densidad (VLDL) y las fracciones de quilomicrones se precipitan al añadir al suero ácido fosfotúngstico en presencia de Mg^{2+} , se toma el sobrenadante y de este se determina la fracción de HDL por el método enzimático de punto final para colesterol total.

Procedimiento: Muestras (sobrenadante) y patrón se mezclan e incuban con el reactivo de color durante 10 min. a 25°C y se mide la absorbancia a 540 nm frente al blanco de reactivo.

- Peroxidación lipídica por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

Fundamento: La prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA) es el ensayo más usado para la medición de la lipoperoxidación. Durante la prueba, la muestra es tratada con TBA a pH bajo; en la reacción del TBA, 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.

Procedimiento: Se utilizó el método de Jentzsch (1996)¹⁶⁰. Se recolectó sangre total en tubos con anticoagulante, heparina o EDTA, se centrifuga inmediatamente la sangre 10 min a 3000 rpm para obtener el plasma, al cual se le adicionan 10 μ L de butiril-hidroxitolueno (BHT) 2mM por mL de sangre, para evitar la auto-oxidación de las muestras. Se colocan 400 μ L de plasma con 50 μ L de BHT (12.6 mmol/L) y 400 μ L de ácido ortofosfórico (0.2M) se agita en vortex 10 seg. y posteriormente se adicionan 50 μ L de TBA (0.11 mol/L), se agita en vortex por 10 s. Esta mezcla se incubaba por 45 min a 90°C en un baño de agua; pasado este tiempo se colocan los tubos en hielo por 5 min para detener la reacción.

Posteriormente se adicionan 1000 μ L de butanol en cada tubo y 100 μ L de solución salina saturada, se agita vigorosamente por 30 seg, se centrifuga a 5000 rpm 1 min, se pasa la fase de butanol a una celda y se mide la absorbancia a 535 nm y 572 nm.

La concentración de ácido tiobarbitúrico que reacciona se calcula por medio de una curva estándar de MDA, obtenida a partir del estándar de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP).

Preparación de la curva estándar

Preparar las siguientes soluciones:

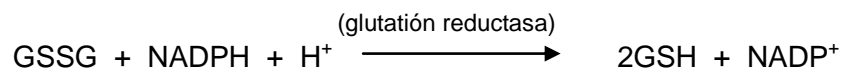
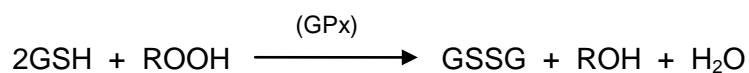
1. TMP 1mM. Diluir 17 μL de TMP en 100 mL de agua bidestilada.
2. TMP 0.2 mM. Tomar un ml de TMP 1mM y añadir 4 mL de agua bidestilada (preparar cada vez que se use).
3. Preparar 8 tubos con diferentes concentraciones de TMP, como se describe a continuación:

Tubo	TMP (μL)	H ₂ O (mL)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)
1	0	400	0
2	10	390	0.4
3	20	380	0.8
4	40	360	1.6
5	60	340	2.4
6	100	300	4.0
7	140	260	5.6
8	200	200	8.0

4. A cada uno de los tubos de la curva se les da el mismo tratamiento que a la muestra.

- Evaluación de la actividad de glutatión peroxidasa GPx): Se empleó el equipo comercial Ransel (Randox Laboratorios Ltd, UK).

Fundamento: La cuantificación de esta enzima se basa en el método desarrollado por Paglia y Valentine¹⁶¹ con base en la siguiente reacción:



(GSH= Glutatión reducido) (ROOH=hidroperóxido) (Gpx= Glutatión peroxidasa) (GSSG= glutatión oxidado)

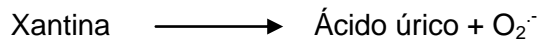
La concentración de GPx se evalúa por la disminución en absorción a 340 nm, debida a la oxidación de NADPH a NADP⁺.

Procedimiento: Se diluyeron 0.05 mL de sangre entera heparinizada en 1 mL de solución diluyente (proporcionada por Randox); se incubó 5 min, para posteriormente añadir 1 mL de reactivo de Drabkin a doble concentración. Las muestras se analizaron en los siguientes 20 min.

Para el ensayo, se colocaron 0.02 mL de muestra diluida, 1 mL de reactivo de trabajo (glutatión 4 mmol/L, glutatión reductasa ≥ 0.5 U/L y NADPH 0.34 mmol/L) y 0.04 mL de cumeno (hidroperóxido de cumeno 0.18 mmol/L). Se mezcló y leyó la absorbancia inicial al cabo de 1 min. y se empezó a cronometrar simultáneamente para leer de nuevo al cabo de 1 y 2 min. La cinética de esta reacción se lee a 340 nm.

- Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD): Se empleó el equipo comercial Ransod (Randox Laboratorios Ltd, UK).

Fundamento: La técnica se basa en la reacción entre la xantina y la xantina oxidasa para generar radicales superóxido (O₂⁻).



Los radicales superóxido generados reaccionan con sales de p-iodonitrotetrazolio (INT) para producir el colorante rojo formazán.



La SOD presente en las muestras compite con el INT por los radicales superóxido y, por tanto, inhibe la producción del colorante formazán.



La SOD se mide por el grado de inhibición de la formación del colorante formazán, a 505 nm.

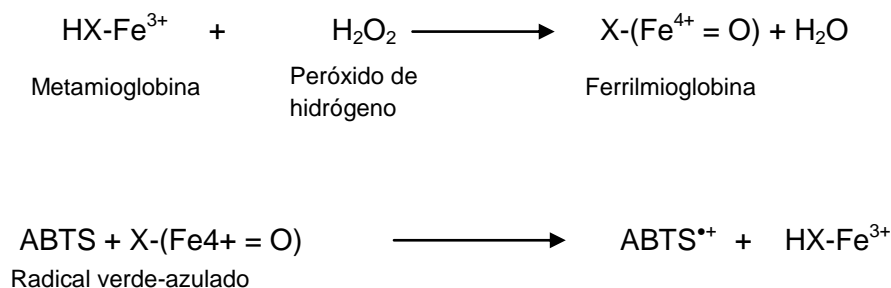
Procedimiento: Se tomaron 0.5 μ L de sangre total y se lavaron los eritrocitos tres veces con 3 mL de solución de NaCl al 0.9 %, centrifugando durante 10 min, a 3000 rpm en cada lavado. Al botón de eritrocitos lavados se adicionaron 2 mL de agua bidestilada fría, se mezcló y dejó reposar durante 15 min a 4°C. Del lisado se

tomaron 0.100 mL y se diluyeron con 1.9 mL de tampón de fosfato 0.01 mmol/L pH 7.0.

Para el ensayo se pipetearon 0.050 mL de muestra diluida y se adicionaron 1.7 mL de sustrato mixto (xantina 0.05 mmol/L, I:N:T: 0.025 mmol/L). Después de mezclar se agregaron 0.25 mL de xantin oxidasa (0.94 mmol/L). Se mezcló y se registró la absorbancia A1 al cabo de 30 seg y se empezó a cronometrar el tiempo simultáneamente para leer la absorbancia final A2 al cabo de 3 min frente al blanco de agua, a una longitud de onda de 505 nm.

- Razón SOD/GPx: Este parámetro se calcula como el cociente entre la actividad de la enzima SOD y la actividad de la GPx.
- Análisis del estado de los antioxidantes totales: Se empleó el equipo comercial (Total antioxidant status, Randox Laboratorios Ltd, UK).

Fundamento: 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.



Procedimiento: Se pipetearon 0.02 mL de plasma y se adicionó 1 mL de cromógeno. Después de mezclar se prosiguió a la lectura de la absorbancia inicial A1 y luego se adicionaron 0.200 mL de sustrato, se empezó a cronometrar para leer la absorbancia A2 al cabo de exactamente 3 min, las lecturas se realizaron a 600 nm.

A los sujetos participantes se les realizaron las medidas antropométricas para la determinación del IMC, las cuales fueron obtenidas con el siguiente protocolo estandarizado:

- **Peso:** Las personas fueron pesadas con la menor cantidad de ropa (bata clínica) en una báscula calibrada marca Torino.
- **Estatura:** Los pacientes se colocaron con los talones juntos, glúteos, hombros y cabeza en contacto con el estadiómetro, los ojos mirando al frente y el plano de Frankfurt paralelo al suelo.
- **IMC:** Se obtuvo a través de la razón peso dividido entre la estatura al cuadrado (Kg/m^2).

Se realizó densitometría central (cadera y columna lumbar) con un densitómetro Hologic modelo QDR4000, tomando como criterio de osteoporosis un valor por debajo de -2.5 desviaciones estándar, en la escala de T, de los parámetros obtenidos para adultos jóvenes. La técnica para evaluar la densitometría se ajustó a lo establecido por el fabricante y la medición la llevó a cabo un técnico capacitado de una empresa privada reconocida.

Diseño estadístico

Los datos fueron analizados utilizando medidas descriptivas, promedio y desviación estándar (DE), como pruebas de comparación, ANOVA de medidas repetidas. Para todas las pruebas se consideró un valor de $p < 0.05$ como significancia estadística. Para tal efecto se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0

IX. RESULTADOS

Para el análisis de los datos se llevó a cabo una estratificación por subgrupos, considerado los siguientes diagnósticos: i) sanos, ii) osteopenia y iii) osteoporosis, tomando como referencia el valor de la DMO de columna.

IX. 1. Prevalencia de osteoporosis.

Se detectó un 42% de osteoporosis, un 37% de osteopenia y 21% sanos de entre los 116 adultos mayores estudiados. Así mismo, las mujeres mostraron una prevalencia significativamente más alta de osteoporosis que los hombres (mujeres, 69% vs. hombres, 31%, $p < 0.01$) (cuadro IX.1).

IX.2. Relación del estrés oxidante con la DMO

En la evaluación pre-intervención los grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros bioquímicos y los marcadores de EOx ($p > 0.05$) (cuadro IX.2).

En el cuadro IX.3 se presenta la relación de la DMO de columna (DMO-Col) con los marcadores de EOx. Al respecto, se encontró una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de LPO ($r = -0.217$, $p = 0.014$), así como una correlación positiva de la capacidad antioxidante total ($r = 0.293$, $p = 0.001$) y la enzima SOD ($r = 0.184$, $p = 0.026$) con la DMO-Col.

Respecto a la frecuencia de las concentraciones anormales de los marcadores biológicos del EOx de la población de estudio, se observó un porcentaje significativamente más alto de ancianos con capacidad antioxidante total baja en el grupo con osteoporosis en comparación con los sanos (osteoporosis, 40% vs. sanos, 22%, $p < 0.05$) (cuadro IX.4).

En el cuadro IX.5 se muestran las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL de la pre y post-intervención por grupo, cuyas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

IX. 3. Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre el EOx

En cuanto a los marcadores de EOx, se observó un aumento porcentual estadísticamente significativo en los valores de LPO en los adultos mayores del grupo control con respecto a los grupos placebo y tratamientos con vitamínicos (control, +13%, placebo -31%, Tx1 -24% y Tx2 -110%, $p < 0.05$) (cuadro IX.6 y figura IX.1). Así mismo, se encontró un incremento significativo en la CAT, aumentó de manera significativa en los sujetos del Tx1 (pre-intervención, 1.01 ± 0.19 vs. post intervención 1.43 ± 0.23 , $p < 0.05$). En cuanto a estos resultados, las diferencias que se presentaron en cada grupo, se muestran en la figura IX.2 en porcentajes.

IX. 4. Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre la DMO

Con relación a la densidad mineral ósea después del tratamiento se observó un incremento estadísticamente significativo en la DMO de cadera en el grupo con el Tx2 en comparación con los demás grupos (pre-intervención, 0.841 ± 0.155 vs. post-intervención, 0.850 ± 0.153 , $p < 0.01$) (cuadro IX.6). No obstante, la DMO-Col no mostró diferencias estadísticamente significativas (figura IX.3)

Cuadro IX.1. Características de la población de estudio por diagnóstico.

	Sanos	Osteopenia	Osteoporosis
N (%)	24(21)	43(37)	49(42)
Edad promedio	68.96±7.75	66.65±8.18	68.00±6.85
Hombres (%)	13 (54)	13 (30)	15(31)
Mujeres (%)	11 (46)	30 (70)	34 (69)*
IMC	27.14±3.98	27.71±3.92	25.55±3.43†
DMO Columna (g/cm ²)	1.063±0.198‡	0.822±0.122	0.587±0.150
DMO cadera (g/cm ²)	0.986±0.166***	0.905±0.114	0.789±0.116

DMO, densidad mineral ósea. Población pre-intervención * χ^2 p< 0.05 mujeres vs hombres
†ANOVA p< 0.05 osteoporosis vs. osteopenia y sanos, ‡p < 0.05 sanos vs osteopenia y osteoporosis.

Cuadro IX.2. Parámetros bioquímicos y marcadores de EOx por diagnóstico.

Variable	Sanos n = 24	Osteopenia n = 43	Osteoporosis n = 49
Glucosa (mg/dL)	98± 25	95±30	94±25
Colesterol (mg/dL)	192± 25	198± 36	199±47
Triglicéridos (mg/dL)	187±91	170±58	166± 54
HDL (mg/dL)	52±8	55±13	56±11
LPO (mmol/L)	0.238±0.053	0.257±0.090	0.248±0.075
CAT (mmol/L)	1.10±0.17	1.01±0.25	1.00±0.24
SOD (UI/mL)	173±9	175±7	173±9
GPx (UI/L)	8140±3087	7798±2835	7946±3203
Razón SOD/GPx	0.024±0.009	0.025±0.008	0.025±0.011

Población pre-intervención. LPO, lipoperóxidos; CAT, capacidad antioxidante total; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa. ANOVA simple.

Cuadro IX.3. Relación de la DMO-Col con los marcadores de EOx.

Variables	Valor de r	Valor de p
LPO	-0.217	0.014
CAT	0.293	0.001
SOD	0.184	0.026
GPx	0.143	0.076
SOD/GPx	-0.144	0.068

DMO-Col, densidad mineral ósea de columna. Análisis pre-intervención. Regresión lineal simple. LPO, lipoperóxidos; CAT, capacidad antioxidante total; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa.

Cuadro IX.4. Frecuencia de los marcadores biológicos de EOx de la población de estudio por diagnóstico.

Marcador	Sanos n (%)	Osteopenia n (%)	Osteoporosis n (%)	Valor de p
LPO				
Alto (≥ 0.300)	3 (19)	7(44)	6(37)	0.461
SOD				
Bajo (≤ 168)	6(21)	8(28)	15(52)	0.150
GPx				
Bajo (≤ 5526)	5 (18)	12(43)	11(39)	0.522
CAT				
Bajo (≤ 0.86)	1(22)	12(38)	15(40)	0.036*
SOD/GPx				
Alto (≥ 0.030)	4(15)	12(44)	11(41)	0.317

Análisis pre-intervención. Ji cuadrada. LPO, lipoperóxidos; CAT, capacidad antioxidante total; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa. * $p < 0.005$

Cuadro IX.5. Parámetros bioquímicos pre y post-intervención por tratamiento.

Variable	Controles n = 23	Placebo n = 32	Tx1 n =30	Tx2 n = 31
Glucosa (mg/dL)				
Pre-intervención	104 ± 29	96 ± 36	95 ± 24	91 ± 18
Post-intervención	102 ± 39	101 ± 50	110 ± 39	102 ± 24
Colesterol (mg/dL)				
Pre-intervención	180 ± 57	195 ± 35	212 ± 33	195 ± 32
Post-intervención	207 ± 56	184 ± 42	204 ± 43	190 ± 39
Triglicéridos (mg/dL)				
Pre-intervención	174 ± 111	166 ± 47	177 ± 49	166 ± 46
Post-intervención	225 ± 96	158 ± 68	202 ± 114	141 ± 60
HDL (mg/dL)				
Pre-intervención	48 ± 18	54 ± 9	55 ± 12	58 ± 7
Post-intervención	50 ± 10	47 ± 11	51 ± 10	54 ± 6

ANOVA de medidas repetidas.

Cuadro IX.6. Marcadores de EOX pre y post-intervención por tratamiento.

Variable	Controles n = 23	Placebo n = 32	Tx1 (500 mg) n = 30	Tx2 (1 gr) n = 31
LPO (mmol/L)				
Pre-intervención	0.330±0.118	0.239±0.058	0.214±0.035	0.254±0.058
Post-intervención	0.370±0.090*	0.164±0.050	0.163±0.034	0.144±0.027
CAT (mmol/L)				
Pre-intervención	1.03±0.33	1.02±0.21	1.01±0.19	1.02±0.25
Post-intervención	1.06±0.15	1.36±0.33	1.43±0.23**	1.26±0.32
SOD (UI/L)				
Pre-intervención	165±11	175±6	175± 6	176±6
Post-intervención	167±9	175±14	174± 12	175±11
GPx (UI/L)				
Pre-intervención	6607±2335	8450± 3126	8842 ±3596	8057± 2675
Post-intervención	7750± 3877	8345± 3547	10655± 5013	10372± 5918
Razón SOD/GPx				
Pre-intervención	0.029± 0.012	0.024± 0.009	0.023± 0.009	0.025± 0.011
Post-intervención	0.028± 0.018	.026±0 .015	.019±0.010	.025± 0.022
DMO-Col(g/cm²)				
Pre-intervención	0.480 ±0.176	0.896±0.207	0.786± 0.171	0.822± 0.209
Post-intervención	0.484 ±0.194	0.904± 0.212	0.800 ±0.163	0.831± 0.216
DMO-Cad (g/cm²)				
Pre-intervención	0.972± 0.165	0.865± 0.120	0.852± 0.146	0.841± 0.155***
Post-intervención	0.952± 0.164	0.860± 0.118	0.848± 0.146-	0.850 ±0.153

DMO-Col, densidad mineral ósea de columna; DMO-Cad, densidad mineral ósea de cadera; LPO, lipoperóxidos; CAT, capacidad antioxidante total; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa. ANOVA de medidas repetidas. *Control vs placebo, Tx1 y Tx2, **Tx1 vs control, placebo y Tx2, ***Tx2 vs control, placebo y Tx1.

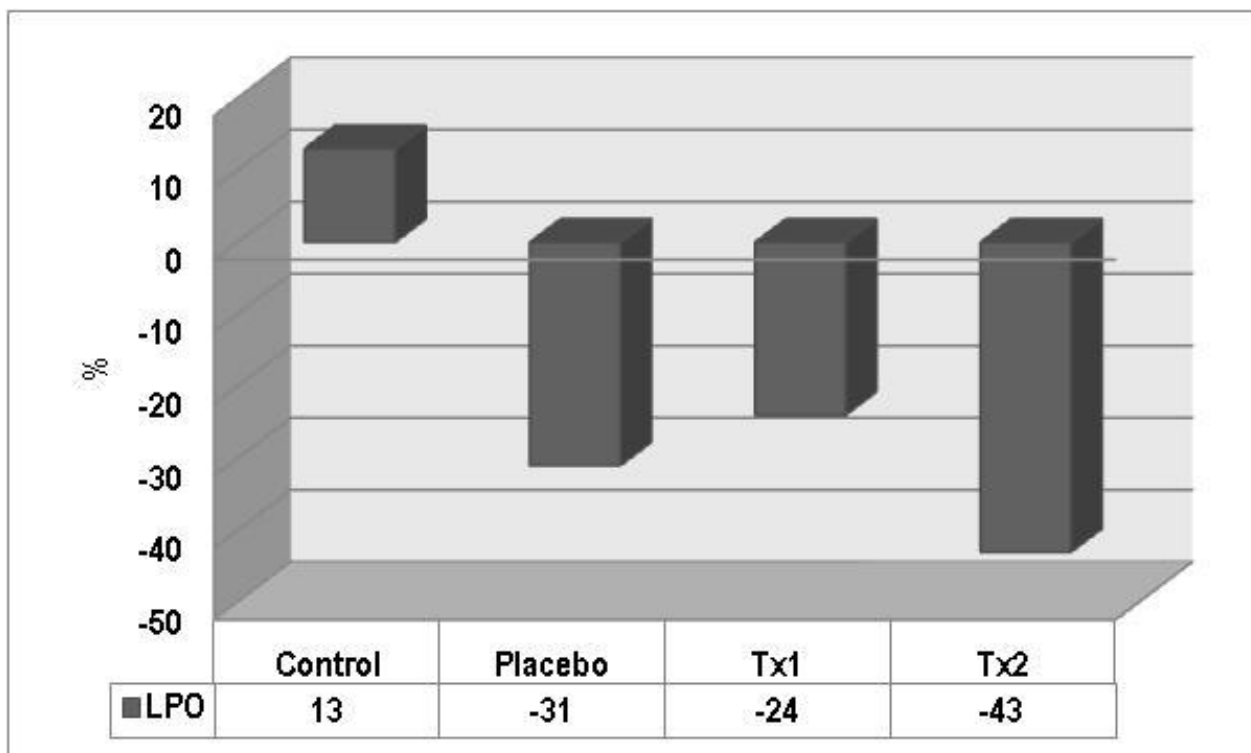


Figura IX.1. Cambios en porcentaje en los niveles plasmáticos de LPO en la población de estudio post-intervención. La disminución en los niveles plasmáticos de LPO fue significativamente más baja ($p < 0.05$) en el grupo que recibió el Tx2, 1000 mg de vitamina C con 400 UI de vitamina E.

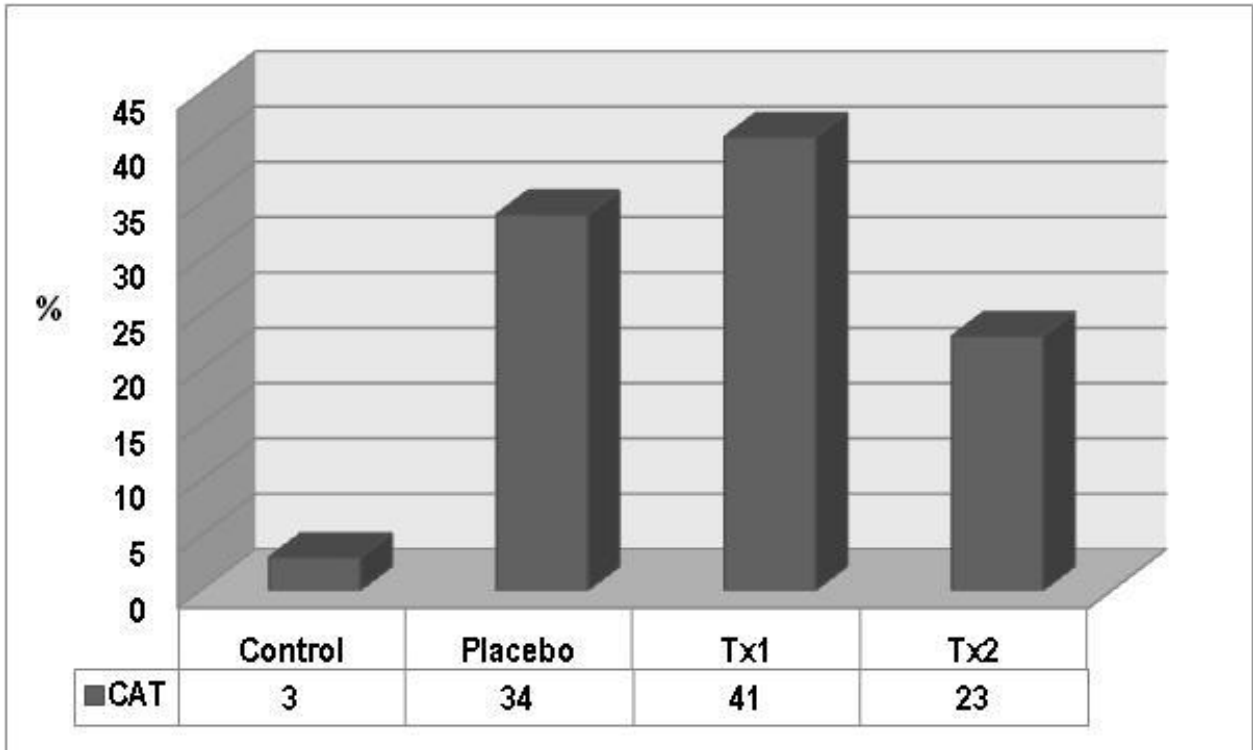


Figura IX.2. Cambios en porcentaje de la capacidad antioxidante total en la población de estudio post-intervención. Se presentó un incremento significativamente más alto ($p < 0.05$) en el grupo que recibió el Tx1, 500 mg de vitamina C con 400 UI de vitamina E.

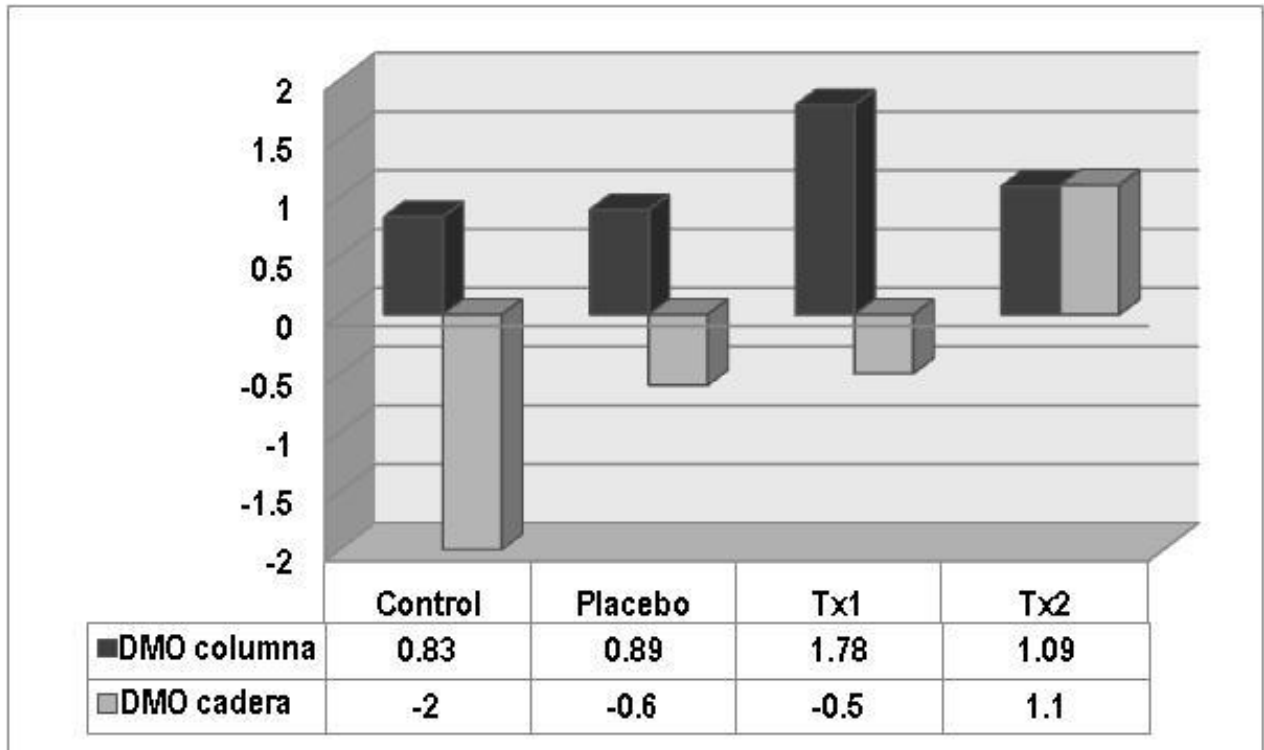


Figura IX.3. Cambios en porcentaje de la DMO de columna y de cadera en la población de estudio post-intervención. El grupo con el Tx2 presentó un aumento en la DMO de ambas regiones, siendo únicamente estadísticamente significativo el aumento en la cadera ($p < 0.05$).

X. DISCUSIÓN

El estrés oxidante (EOx) constituye uno de los factores etiológicos y uno de los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en la vejez. Múltiples investigaciones han demostrado que el exceso de radicales libres (RL), cuando no son contrarrestados por los sistemas antioxidantes, provoca un desequilibrio bioquímico denominado EOx, el cual genera daño celular y alteraciones en el funcionamiento de órganos y sistemas. Al respecto, el EOx se ha vinculado con la diabetes mellitus, arteriosclerosis, cataratas, hipertensión y osteoporosis, entre otras.¹²⁶⁻¹³⁰

La osteoporosis es considerada un problema de salud pública sobre todo en la población gerontológica, debido a su magnitud, repercusiones físicas, psicológicas y económicas. Esta enfermedad sistémica, se caracteriza por una disminución de la masa ósea y deterioro de la arquitectura microscópica del hueso, propiciando un incremento de la fragilidad y riesgo de fracturas óseas. La osteoporosis es causa de hasta un 75% de fracturas en mayores de 50 años, cuya magnitud y repercusiones en la calidad de vida representa un gran reto para la gerontología.⁶

Es por ello que el objetivo principal para enfrentar dicha problemática debe ser la prevención de la pérdida de tejido óseo, para evitar el riesgo de fracturas, así como la recuperación de la masa ósea y aminorar el dolor y molestias que puedan surgir de las fracturas en pacientes con osteoporosis ya declarada.¹⁶²

Entre los fármacos más utilizados en la prevención y tratamiento de la osteoporosis, sobresalen los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos, la calcitonina, los bifosfonatos, suplementos de calcio y vitamina D, análogos de vitamina D, ipriflavona, ranelato de estroncio y la terapia de reemplazo hormonal.¹⁶²⁻¹⁶⁴

La mayoría de las investigaciones sobre osteoporosis se encuentran encaminadas a dilucidar los mecanismos endocrinos y degenerativos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que existe una asociación entre la osteoporosis y el EOx. Se ha evidenciado que las personas que cursan con osteoporosis presentan niveles más bajos de enzimas antioxidantes¹³⁵, apoyando la propuesta de indicar suplementos antioxidantes con fines preventivos y/o terapéuticos para la osteoporosis. En este sentido, se menciona que el consumo de vitaminas antioxidantes puede influir en la calidad de la DMO, al reducir los efectos del EOx, que pueden estar asociados con la pérdida de masa ósea. No obstante, la

información científica disponible en humanos y, sobre todo en ancianos, es escasa y no concluyente.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la efectividad de la administración de alfa-tocoferol y ácido ascórbico sobre el EOx y la DMO en adultos mayores.

La trascendencia de los hallazgos de la presente investigación radica en su posible aplicación en programas preventivos y de intervención, que favorezcan los estilos de vida antioxidantes y, con ello, el envejecimiento sin enfermedades crónicas vinculadas con el EOx.

X.1. Diagnóstico y prevalencia de osteoporosis

Es importante señalar que en este estudio se realizó la DMO de columna y cadera en todos los sujetos, para establecer el diagnóstico de osteoporosis en los adultos mayores. En este sentido, se han encontrado grandes discrepancias en el diagnóstico de esta patología en función del criterio diagnóstico, ya que se puede detectar osteoporosis en una región y no aparecer en la otra.¹⁶⁷ En nuestro estudio se detectó una DMO significativamente menor en la cadera con respecto a la columna, además de que la concordancia en el diagnóstico de osteoporosis en ambas regiones fue del 7.2%. Por tal motivo, es recomendable evaluar las 2 regiones ya que no se puede llevar a cabo un diagnóstico sistemático suponiendo que una región se afectará siempre antes que la otra. Así mismo, se ha demostrado que la detección de osteoporosis en la columna es más sensible que en la cadera, de ahí que para los estudios de tamizaje se evalúe dicha zona, no obstante el riesgo de fractura de cadera justificaría la evaluación de ambas regiones.¹⁶⁷

Se ha demostrado que la magnitud de la osteoporosis en personas mayores de 50 años oscila entre un 16 y 30%⁷⁰⁻⁷². Sin embargo, en el presente estudio se detectó una frecuencia de osteoporosis del 42%, magnitud mayor a lo reportado por otros autores. Al respecto, debemos considerar lo limitado del tamaño de la muestra de estudio, ya que el objetivo del estudio no es de tipo epidemiológico; no obstante, la mayor prevalencia podría ser debida a las condiciones de vida precarias de la población de estudio. Por otro lado, las personas que aceptaron participar en el estudio, aunque negaron el diagnóstico previo de osteoporosis, es probable que no estuvieran enteradas de que presentaban este problema de salud.

Al analizar la frecuencia de osteoporosis por sexo encontramos un porcentaje significativamente más alto en las mujeres con respecto a los hombres, lo cual es congruente con lo observado por otros autores en población de edad similar al de

nuestro estudio. En este sentido, se ha demostrado mayor prevalencia de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas en comparación con los hombres.⁵⁶

X.2. Relación del estrés oxidativo con la DMO

Al analizar los parámetros bioquímicos de la población por diagnóstico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, con lo cual se aseguró la comparabilidad y confiabilidad del estudio.

En cuanto a los marcadores de EOx, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, en los adultos mayores con osteopenia y los del grupo con osteoporosis, se observaron concentraciones más altas de los niveles plasmáticos de LPO, los valores de la CAT y la actividad antioxidante de las enzimas SOD y GPx fue más bajas que en el grupo de ancianos sanos. Lo que sugiere que al presentarse una deficiencia del sistema antioxidante, principalmente endógeno, la generación de RL va a aumentar, provocando con ello la presencia de EOx, el cual influye en la maduración y sobrevivencia de los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, favoreciendo la resorción ósea y, con ello, la disminución de la DMO.¹⁶⁸

Por otro lado, se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre la CAT, la actividad antioxidante de la SOD y la DMO de columna, así como una correlación negativa con los niveles plasmáticos de LPO; lo cual apoya la propuesta de que los sujetos con osteoporosis presentan una deficiencia en el sistema antioxidante, con un aumento en la generación de RL, los que a su vez van a provocar daño a las biomoléculas, en este caso a los lípidos, con una pérdida significativa de la DMO de columna. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, en donde se ha encontrado un vínculo entre la actividad antioxidante baja y el aumento de la resorción ósea como consecuencia del incremento de los RL.¹⁶⁹

Nuestro grupo de investigación en el 2002 demostró una relación entre la actividad baja del sistema antioxidante con la pérdida de la DMO y estos resultados fueron confirmados por Ozgocmen *et al.* (2007), lo cual sugiere que la deficiencia del sistema antioxidante, principalmente endógeno, es un factor de riesgo para la disminución de la DMO y con ello la presencia de osteoporosis, ya que los sujetos que cursan con esta patología presentan alteraciones en el sistema antioxidante, tanto endógeno como exógeno, comparados con los sujetos sanos.^{134,138}

En este sentido, se ha reportado que las personas con osteoporosis muestran concentraciones más bajas de ácido úrico aunado a una actividad antioxidante baja.¹³³ Por otro lado, Basu *et al.* (2001) demostraron una asociación negativa entre el 8-iso-PGF2 α (uno de los principales isoprostanos) y la DMO, mientras que Sontakke *et al.* (2002), por su parte, reportan un aumento significativo de LPO en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis.^{132,137}

Al analizar la frecuencia de los sujetos que presentaron concentraciones de los marcadores de EOx anormales, por diagnóstico, se encontró que un porcentaje mayor de pacientes con osteopenia y osteoporosis cursan con LPO altos y valores bajos de las enzimas antioxidantes, así como una CAT baja, siendo esta última diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), lo cual apoya la propuesta de que la deficiencia en el sistema antioxidante contribuye a la disminución de la DMO, que puede llevar al adulto mayor a padecer osteoporosis.

En este sentido, nuestros hallazgos coinciden con lo reportado por Maggio *et al.* (2003) quienes en un estudio realizado con mujeres mayores de 60 años, observaron que la actividad antioxidante disminuye significativamente en las mujeres con osteoporosis, comparadas con los controles sanos. Al respecto, encontraron una disminución de las vitaminas A, C y E, el ácido úrico y las enzimas antioxidantes SOD y GPx, así como una correlación positiva entre la densidad mineral ósea y la GPx.¹³³

X. 3. Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre el EOx

En cuanto a los marcadores de EOx por tratamiento, se presentaron diferencias estadísticamente significativas en algunos parámetros. Después de la intervención se observó un incremento estadísticamente significativo de LPO en los adultos mayores del grupo control, con relación a los grupos a quienes se les administró placebo, Tx1 (500 mg vitamina C y 400 UI vitamina E) y Tx2 (1000 mg de vitamina C y 400 UI de vitamina E). Estos hallazgos sugieren que el placebo tiene un efecto antioxidante. En este sentido, recientemente nuestro grupo de investigación encontró que el consumo crónico de un placebo relativo a vitaminas C y E disminuyen significativamente los niveles séricos de LPO.¹⁷⁰ Al respecto, el efecto placebo ha sido reconocido en los ensayos clínicos donde se usa de forma aleatoria, se sabe que el 30% de los sujetos responden al placebo cuando se utilizan formas farmacéuticas similares a éste.¹⁷¹⁻¹⁷²

Así mismo, se encontró un aumento estadísticamente significativo de la CAT en el grupo con el Tx1 (500 mg de vitamina C y 400 UI de vitamina E) en comparación con el grupo control y el Tx2 (1000 mg de vitamina C y 400 UI de vitamina E), lo cual sugiere que el consumo crónico de vitamina C a dosis más bajas (500 mg), tiene mejor efecto antioxidante que a dosis más altas de vitamina C (1000 mg). Estos hallazgos apoyan la propuesta relativa a que el consumo excesivo de vitaminas antioxidantes pueden tener un efecto pro-oxidante cuando no se justifica su indicación. En este sentido, paradójicamente las vitaminas pueden actuar como pro-oxidantes, ya que la vitamina C en altas concentraciones en presencia de Hierro es capaz de catalizar la reacción de Fenton y generar ión ferroso, que facilita la producción de radical Hidroxilo. Por su parte la vitamina E en presencia de Cu^{2+} forma Cu^+ que promueve la peroxidación lipídica y por ende un incremento en la producción de radicales alcóxilo. Además se ha reportado *in vitro* que la vitamina E puede incrementar la lipoperoxidación y dañar el ADN, debido a que se forma un radical el cual requiere de otro antioxidante como la vitamina C o la coenzima Q para ser regenerado, si esto no sucede incrementa la oxidación por un proceso llamado peroxidación mediada por tocoferol, que produce peróxido de hidrógeno.¹⁷³

No obstante, también se ha demostrado que cuando los individuos tienen alta exposición a factores pro-oxidantes, las dosis altas de vitamina C están plenamente justificadas, tal como fue demostrado por Block *et al.* (2008) quienes en un estudio realizado con sujetos no fumadores que consumieron por dos meses 1000 mg de vitamina C y 800 UI de vitamina E por día, que el consumo de estas vitaminas disminuye significativamente los niveles de LPO.¹⁷⁴

X. 4. Efecto del consumo de vitaminas antioxidantes sobre la DMO

Por otro lado, después de la intervención terapéutica, la DMO de columna no mostró un incremento significativo en ninguno de los grupos; no obstante la DMO de cadera registró un aumento estadísticamente significativo en los adultos mayores que tomaron 1 gr. de vitamina C con 400 UI de vitamina E. Este hallazgo sugiere, que el consumo de vitamina C combinada con vitamina E puede ofrecer cierta protección contra la pérdida de masa ósea en los adultos mayores, ya que ayuda en la remineralización de la DMO de cadera y detiene la desmineralización de la DMO de columna.

En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los hallazgos de otras investigaciones, en donde se ha propuesto que el consumo de vitaminas E y C puede disminuir la resorción ósea en mujeres postmenopáusicas

no fumadoras. Estos investigadores concluyen que el consumo de antioxidantes puede jugar un papel importante en la prevención de la osteoporosis. En el mismo sentido, Sahni *et al.* (2008) encontraron una correlación negativa entre el consumo de suplementos de vitamina C con la DMO total en hombres fumadores, mientras que en los no fumadores, la correlación de la ingesta de vitamina C con la DMO de cuello femoral fue positiva y estos sujetos presentaron una menor pérdida de DMO en un año.^{152,159,175}

Por su parte, Turan *et al.* (2003), en un experimento con ratas, encontró que la administración de vitamina E y C combinadas con selenio previenen las alteraciones estructurales del hueso que se presentan en la osteoporosis. También Arjmandi *et al.* (2002) demostraron que la administración de antioxidantes (vitamina E) tiene un efecto benéfico sobre la calidad del hueso en ratas viejas.¹⁵⁰⁻¹⁷⁶

Así mismo, en relación con la dieta, se reporta en la literatura que un consumo alto de alimentos ricos en antioxidantes, desempeña un papel importante en la prevención de la osteoporosis, ya que si ésta es deficiente en vitaminas E y C, se incrementa de manera significativa el riesgo de sufrir fractura de cadera; mientras que si es rica en vitaminas E, C y D, así como carotenos y selenio, el riesgo disminuye.¹⁵³ De igual forma, se ha encontrado que no existe relación entre una dieta rica en antioxidantes y la DMO cuyas inconsistencias justifican continuar con esta línea de investigación.¹⁵⁷

Otro hallazgo significativo del presente estudio, es que no es del todo claro por qué las dosis más bajas de vitamina C (500 mg) en combinación con la vitamina E tuvieron un efecto antioxidante más eficiente, y por qué las dosis más altas de vitamina C (1000 mg) en combinación con vitamina E, tuvieron un efecto positivo sobre la densidad mineral ósea. Esto nos debe hacer reflexionar sobre la complejidad del estrés oxidante, y que quizás, nuestro concepto e interpretación del EOX de desequilibrio bioquímico es muy limitado y debería ser discutido y replanteado.

Finalmente, aunque los resultados del estudio no son del todo concluyentes, debido a lo limitado en el tamaño de la muestra, nuestros hallazgos nos permiten apoyar la propuesta de la asociación etiológica y fisiopatológica del EOX con la osteoporosis y el efecto benéfico del consumo de antioxidantes sobre la DMO, principalmente de cadera, por lo que el consumo de vitamina C en combinación con la vitamina E podría ser un coadyuvante en la prevención y tratamiento de la osteoporosis.

XI. CONCLUSIÓN

Tomando en cuenta la hipótesis inicial:

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los reportes científicos respecto de la efectividad de la ingesta de α -tocoferol y ácido ascórbico sobre el control del EOx y su relación con la DMO en animales y en población joven, suponemos que los adultos mayores que ingieran dichos antioxidantes por 12 meses mostrarán menor EOx y mayor DMO en comparación con los grupos control y placebo.

Llegamos a las siguientes conclusiones:

- Nuestros hallazgos confirman el vínculo etológico y fisiopatológico entre el estrés oxidante con la densidad mineral ósea, por lo que la medición de los marcadores de estrés oxidante podrían ser útiles para establecer el pronóstico y efectividad terapéutica en el ámbito clínico.
- Nuestros hallazgos apoyan la propuesta de que el consumo de 1 g de vitamina C, aunado a 400 UI de vitamina E, pueden ser un coadyuvante en la prevención y manejo terapéutico de la osteoporosis durante el proceso de envejecimiento.

XII. PERSPECTIVAS

- Es necesario llevar a cabo estudios longitudinales con un tamaño de muestra representativo para confirmar nuestros hallazgos.
- Es conveniente evaluar otros componentes del sistema antioxidante, así como otros marcadores de estrés oxidante, para contar con una visión más completa sobre las alteraciones que presenta el sistema antioxidante y el daño a las biomoléculas en los pacientes con osteoporosis.
- Los resultados apoyan la propuesta de indicar suplementos antioxidantes como manejo complementario o preventivo de la osteoporosis en el adulto mayor.

XIII. REFERENCIAS

1. Knight JA. Free radicals: their presence in biological system. In: Free radicals, antioxidants, aging & disease. Washington: AACC Press, 1999. pp. 21-43.
2. Faure P, Corticelli P, Richard MJ, Arnaud J, Coudray C, Halimi S, Favier A, Roussel AM. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy. *Clin Chem*. 1993; 39 (5): 789-793.
3. Stringer MD, Görög PG, Freeman A, Kakkar W. Lipid peroxides and atherosclerosis. *Br Med J*. 1989; 298: 281-284.
4. Diaz J, Alonso de Vega JM, Serrano E, Gimbert EM, Acosta F, Colomina J, Carbonell LF. Nuevos marcadores plasmáticos de gravedad en pacientes críticos: Lipoperóxidos, estado antioxidante total e índices de activación leucocitaria. *L'Ecobiologiste*. 2000; 246 (104): 105-109.
5. Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC, O'Dowd KJ. Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiol Rev*. 1985; 7:178-208.
6. Riggs BL, Melton LJ, Melton LJ. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone*. 1995; 17: S505-S511.
7. Key LL Jr, Ries WL, Glasscock H, Rodriguiz R, Jaffe H. Osteoclastic superoxide generation: taking control of bone resorption using modulators of superoxide concentrations. *Int J Tissue React*. 1992; 14: 295-298.
8. Zanchetta RJ, Talbot RJ. Osteoporosis: Fisiología, diagnóstico, prevención y tratamiento. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2001. pp. 3-15.
9. Calvo MS, Eyre DR and Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev*. 1996; 17: 333-368.
10. Frost H. A new direction for osteoporosis research; a review and proposal. *Bone*. 1991; 12: 429-437.
11. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover part I: Biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*. 2005; 26: 97-122.
12. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423: 349-355.
13. Kimura H, Kwan KM, Zhang Z, Min JD, Darnay BG, Behringer RR, Nakamura T, Crombrughe B, Akiyama H. *Cthrc1* is a positive regulator of osteoblastic bone formation. *PLoS One*. 2008;9;3(9):e3174.
14. Matsuo K and Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473: 201-209.
15. Castelo-Branco C, Haya Palazuelos J. Osteoporosis y menopausia. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2004. pp. 1-7.
16. Massari F. Homeostasis metabólica (control endocrino). En: Zancheta JR, Talbot JR. Osteoporosis, fisiopatología, diagnóstico prevención y

- tratamiento. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina 2001. pp. 221-224.
17. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19: 444-451.
 18. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR and Reilly GC. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284: C934-943.
 19. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 335: 1095-1101.
 20. Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Vaananen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res.* 2006; 21: 616-25.
 21. Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142: 5050-5055.
 22. Raisz GL. Pathogenesis of osteoporosis: co cets, conflicts, and prospects. *J Clin Inv.* 2005; 115(12): 3318-3325
 23. Raisz LG, Roldan GA. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003; 32: 15-24.
 24. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ III. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 2002; 23: 279-302.
 25. Cummings SR, Karpf DB, Harris F, Genant HK, Ensrud K, Lacroix AZ, Black DM. Improvement in spine bone density and reduction in risk of vertebral fractures during treatment with antiresorptive drugs. *Am J Med.* 2002; 112: 281-289.
 26. Lafita J. Fisiología y fisiopatología ósea. *An Sist Sanit Navar.* 2003, 26 (suppl 3):7-15.
 27. Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K. Are nonresorbing osteoclasts sources of bone anabolic activity? *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 487-494.
 28. Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development.* 1996; 122: 3151-3162.
 29. Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem.* 1998; (Suppl 30-31): 83-91.
 30. Ducy P, Schinke T and Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000, 289: 1501-1504.
-
-

-
-
31. Chau JF, Leong WF, Li B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol.* 2009; 24: 1593-1606.
 32. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003; 24: 218-235.
 33. Langlois JA, Rosen CJ, Visser M, Hannan MT, Harris T, Wilson PW, Kiel DP. Association between insulin-like growth factor I and bone mineral density in older women and men: the Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 4257-4262.
 34. Horowitz MC. Citokines and estrogen in bone: antiosteoporotic effects. *Science.* 1993; 260: 626-7.
 35. Parfitt AM. Bone remodeling: relationship to the amount and structure of bone, and the pathogenesis and prevention of fractures. En: Riggs BL, Melton LJ. *Osteoporosis: etiology, diagnosis and management.* New York: Raven Press, 1988. pp. 45-93.
 36. Morales MF. Aspectos biológicos del envejecimiento. En: Anzola PE, Galinsky D, Morales MF, Salas AR, Sánchez AM. *La atención de los ancianos: Un desafío para los años noventa.* 1994 Washington: OPS Publicación Científica No. 546. pp. 45-56.
 37. Organización de Naciones Unidas. Reunión sobre envejecimiento. Kiev, URSS: ONU; 1979.
 38. Organización de Naciones Unidas. Plan de acción internacional de Viena sobre el envejecimiento. New York: ONU; 1983.
 39. Miquel J. Envejecimiento fisiológico, celular y subcelular. En: Ochoa S, Leloir F L, Oro J, Sols A. *Bioquímica y biología molecular.* Barcelona, España: Salvat; 1986. pp. 241-247.
 40. Lozano CA. Envejecimiento en el ser humano. En: *Introducción a la geriatría.* México: Méndez Oteo Editores; 1992: 19-24.
 41. Salgado AA, González MJ, Alarcón AM. Modificación en órganos, aparatos y sistemas asociados al envejecimiento. En: *Fundamentos prácticos de la asistencia al anciano.* Barcelona: Masson, 1996. pp.7-14.
 42. 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.
 43. Seeman TE, Singer BH, Riff CD, Love GD, Levy-Storms L. Social relationships, gender, and allostatic load across two age cohorts. *Psychosom Med.* 2002; 64: 395-406.
 44. McEwen BS. Allostasis, allostatic load, and the aging nervous system: role of excitatory aminoacids and excitotoxicity. *Neurochem Res.* 2000; 25:1219-1231.
 45. McEwen BS. Sex, stress and hippocampus: allostasis, allostasis load and
-
-

- the aging process. *Neurobiol Aging*. 2002; 23:921-939.
46. Dequeker J. Bone and ageing. *Ann Rheum Dis* 1975; 34: 100-115.
 47. Heaney RP. A unified concept of osteoporosis *Amer J Med*. 1965; 39: 877-889.
 48. Ettinger MP. Aging bone and osteoporosis. *Arch Intern Med*. 2003;163:2237-2246.
 49. Recker RR. Embryology, anatomy, and microstructure of bone. En: Coe FL, Favus MJ. *Disorders of bone and mineral metabolism*. New Cork: Raven, 1992. pp. 219-240.
 50. Kanis JA. *Osteoporosis*. Oxford: Blackwell Science, 1996. pp. 8-17.
 51. Mullender MG, Van Der Meer DD, Huiskes R, Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*. 1996; 18: 109-113.
 52. Reid IR. Therapy of osteoporosis: calcium, vitamin D, and exercise. *Am J Med Sci*. 1996; 312: 278-286.
 53. Rowe T. The Canadian Consensus Conference on Menopause and Osteoporosis. *J Obstet Gynaecol Can*. 1998; 20: 1243-1272.
 54. Bjarnason K, Hassager C, Ravn P, Christianse C. Early postmenopausal diminution of forearm and spinal bone mineral density: a cross-sectional study. *Osteoporosis Int*. 1995; 5: 35-38.
 55. Pouilles JM, Trémollières F, Bonneu M, Ribot C. Influence of early age at menopause on vertebral bone mass. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 311-315.
 56. Crilly RG, Francis RM, Nordin BE. Steroid hormones, ageing and bone. *Clin Endocrinol Metab*. 1981;10(1):115-139.
 57. Francis RM, Peacock M, Aaron JE, Selby PL, Taylor GA, Thompson J, Marshall DH, Horsman A. Osteoporosis in hypogonadal men: Role of decrease plasma 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium malabsorption, and low bone formation. *Bone*. 1986;7(4):261-268.
 58. Gunby MC, Morley JE. Epidemiología de la pérdida ósea con el envejecimiento. En: Perry HM. *Clínicas de Medicina Geriátrica*. 1994; 4: 537-554.
 59. Malkin I, Kalichman L and Kobylansky E. Heritability of a skeletal biomarker of biological aging. *Biogerontology*. 2007; 8:627-637.
 60. Leppänen VO, Sievänen H, Jokihäärä J, Pajamäki I, Kannus P, Teppo LN. Pathogenesis of age-related osteoporosis: Impaired mechanoresponsiveness of bone is not the culprit. *PLoS ONE*. 2008; 3(7):1-10.
 61. Haj AJ, Minter SL, Rawlinson SC, Suswillo R, Lanyon LE. Cellular response to mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res*. 1990; 5(9): 923-932.
 62. Brünsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003; 23:15-39.
 63. Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing*. 2005; 2: 14-18.
-
-

-
-
64. Consensus development conference. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1991; 90:107-110.
 65. Kleerekoper M. The pathophysiology of osteoporosis. In: Rosen CJ. *Osteoporosis. Diagnostic and therapeutic principles.* New York: Human Press NJ, 1996. pp. 65-68.
 66. Crow EC, Talbot JR. Clasificación de la osteoporosis. En: Zancheta JR, Talbot JR. *Osteoporosis, fisiopatología, diagnóstico prevención y tratamiento.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2001. pp. 221-224.
 67. Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ. Bone mineral density in elderly men and women: Results from the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Min Res.* 1992; 7: 547-553.
 68. Compston JE, Papapoulos SE, Blanchard F. Report on osteoporosis in the European Community: Current status and recommendations for the future. *Osteoporosis Int.* 1998; 8: 531-534.
 69. Consenso Mexicano de Osteoporosis. Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral. *Rev Inv Clin.* 2001; 53(5): 469-495.
 70. Delezé M, Aguirre E, Calva J, Cons F. Prevalencia de osteopenia y osteoporosis en México. Estudio multicéntrico. *Rev Med Inter Mex.* 1997; 13 (supl 1): 4-11.
 71. Delezé M, Cons-Molina F, Villa AR, Morales-Torres J, Gonzalez-Gonzalez G, Calva JJ, Murillo A, Briceño A, Orozco J, Morales-Franco G, Peña-Rios H, Guerrero-Yeo G, Aguirre E, Elizondo J. Geographic differences in bone mineral density of Mexican women. *Osteoporos Int.* 2000; 11:562-569.
 72. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy.* *JAMA.* 2001; 285: 785-795.
 73. Yabur JA, Mautalen C, Rapado A. Aspectos diagnósticos y terapéuticos de la osteoporosis. *Rev Esp Enf Metab Oseas.* 1998; 7: 1-13.
 74. The WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series., Geneva: World Health Organization 1994; 843: 29-40
 75. Kanis JA, McCloskey EV, Takats D, Pande K. Clinical assessment of bone mass, quality and architecture. *Osteoporos Int* 1990; (suppl 2): S24-S28.
 76. Solomon L. Osteoporosis and fracture of the femoral neck in the South African Bantu. *J Bone Int Surg.* 1986; 50: 2-13.
 77. Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res.* 1996; 11: 530-534.
 78. Nakamura T, Turner CH, Yoshikawa T. Do variations of hip geometry explain differences in hip fracture risk between Japanese and white
-
-

- Americans? *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 1071-1076.
79. Mackerras D. Calcium intake and osteoporosis. *Aust J Nutr Dietetics.* 1995; 52 (suppl 1): S3-S25.
80. Cumming RG. Calcium intake and bone mass: a quantitative review of the evidence. *Calcif Tissue Int.* 1990; 47: 194-2001.
81. Parra-Cabrera MS, Hernández-Ávila M, Tamayo OJA. Exercise and reproductive factors as predictors of bone density among osteoporotic women in Mexico City. *Calcif Tissue Int.* 1996; 59: 89-94.
82. Gómez GF, Clark P, de la Peña F. Factores de riesgo para el desarrollo de osteopenia y su relación con fracturas de cadera. *Rev Mex Ortop Traum* 1993; 7: 185-190.
83. Cumming SR, Nevitt MC. Risk factors for hip fracture in white women. *N Engl J Med.* 1995; 332: 767-773.
84. Clark P, de la Peña F, Gómez GF, Orozco JA, Tugwell P. Risk factors osteoporotic hip fractures in Mexicans. *Arch Med Res.* 1998; 29: 253-257.
85. Nelson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kannel WB, Kiel DP. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1995;142:485-492.
86. Jensen J, Christiansen C, Rodbro P. Cigarette smoking, serum estrogens, and bone loss during hormone-replacement therapy early after menopause. *N Engl J Med.* 1985; 313: 973-975.
87. Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking and bone loss among postmenopausal woman. *J Bone Miner Res.* 1991; 6: 331-338.
88. Aitkinson EJ, Wahner HW. Is caffeine a risk factor for osteoporosis? *J Bone Miner Res.* 1992; 7: 465-471.
89. Pérez PLM. Estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno. *Rev Cubana Endocrinol.* 2000; 11(3): 139-142.
90. Chesseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49:481-493.
91. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source biochemistry, and role in human. *Am J Med.* 1991; 91 Suppl 3C:14S-22S.
92. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. *Lab Invest.* 1982; 47 (5): 412-426.
93. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7124-7128.
94. Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, Ramsey JJ. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. 2004; *Acta Physiol Scand.* 182: 321–331.
95. Kowaltowki JA, Vercesi EA. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 1999; 26:463-471.
-
-

-
-
96. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174:305-319.
 97. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996; 273(5271): 59-63.
 98. Cadenas E. and Kelvin J. A. D. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biol Med.* 2000; 29 (3): 222-230.
 99. Robertis EDP. *Biología celular y molecular.* 10^a. ed. México: Editorial El Ateneo, 1981. pp. 253-256.
 100. Rodríguez C K. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed.* 1999; 18 (2): 67-76.
 101. Pine SH, Hendrickson JB, Ceram DJ, Hammond GS. Free radical. In: *Organic Chemistry*, 4a ed. McGraw-HILL international, México, 1981; 864-876.
 102. Wook JL, Beccham C, Bryce R, Rosen H, Deeg J. HLA-DR-Mediated signals for hematopoietic and induction of apoptosis involve but are not limited to a nitric oxide pathway. *Blood.* 1997; 90 (1):217-225.
 103. Halliwell B, Gutteridge MC, Cross EC. Free radical, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992; 119 (6): 598-620.
 104. Valda WB. Free radical, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci.* 1992; 49: 299-312.
 105. Marnett JL. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000; 21(3): 361-370
 106. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41 (12): 1819-1828.
 107. Niki E. Action of antioxidants against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 7915-7922.
 108. González-Torres C, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica.* 2000; 25:3-9.
 109. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244:6049-6055.
 110. Fridovich I. Superoxide Anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997; 272:18515-18517.
 111. Weisiger A R, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248(13):4793-4796.
 112. Daret K. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Rad Biol Med.* 1994; 16(2): 275-282.
 113. Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36:1481-95.
 114. Cutler G. R. Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53: 373s-379s.
-
-

-
-
115. Bourges RH, Casanueva E, Rosado JL. Recomendaciones de Ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. México: Editorial Médica Panamericana, 2005. p. 391.
 116. Sun YA, Wang Q, Simonyi A, Sun YG. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med.* 2008; 10: 259–274.
 117. James MA, Smith AJ, Murphy PM. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 423:47-56.
 118. 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.
 119. Johnston C. Vitamina C. En: *Conocimientos actuales sobre nutrición.* Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. pp. 191-199.
 120. 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. pp.117-145.
 121. 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. pp. 147-165.
 122. Pryor W. Vitamina E. En: *Conocimientos Actuales sobre Nutrición.* Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. pp. 170-177.
 123. 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. pp. 75-97.
 124. Niki E, Noguchi N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc Chem Res.* 2004; 37:45-51.
 125. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1034-1053.
 126. Strassheim D, Asehnoune K, Park JS, Kim JY, He Q, Richter D, Mitra S, Arcaroli J, Kuhn K and Abraham E. Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H₂O₂: disparate effects on kinases, NF- κ B, and cytokine expression. *Am J Physiol Cell.* 2004; 286: C683-C692.
 127. Hikiji H, Shin WS, Koizumi T, Takato T, Susami T, Kiozumi Y, Okai-Matsuo Y and Toyo-Oka T. Peroxynitrite production by TNF- α and IL-1 β : implication for suppression of osteoblastic differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 278: E1031-E1037.
 128. BAi XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells ERK and NF-Kappa B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 314: 197-207.
-
-

-
-
129. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1990; 85: 632-639.
 130. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med.* 1997; 3: 1285-1289.
 131. Mody N, Parham F, Sarafian TA and Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 509-519.
 132. Basu S, Michaëlson K, Olofsson H, Johansson S and Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 288: 275-279.
 133. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori C, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. A marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocr Metab.* 2003; 8: 1523-1527.
 134. Sánchez-Rodríguez MA, Arellano-Pimentel B, Vargas-Guadarrama LA, Mendoza-Núñez VM. Relación entre la densidad mineral ósea y los niveles de antioxidantes totales en una población de adultos mayores. *Archivo Geriátrico.* 2002; 4:106-108.
 135. Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexican women as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007;8:124.
 136. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta.* 2002; 318: 145-148.
 137. Franceschi R, Iyer B. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1992; 7: 235-246.
 138. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R, Yilmaz Z. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem.* 2007; 295: 45-52.
 139. Hall TJ, Schaubelin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 207: 280-287.
 140. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Meunier P. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fracture in elderly women. *N Engl J Med.* 1992; 327:1637-42.
 141. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med.* 1997; 337:670-676.
 142. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) and mortality in men and women living in the community:
-
-

-
-
- randomised double blind controlled trial. *BMJ*. 2003; 326:469-478.
143. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2000;15:515-521.
144. Cheung AM, Tile L, Lee Y, Tomlinson G, Hawker G, Scher J. Vitamin K supplementation in postmenopausal women with osteopenia (ECKO trial): a randomized controlled trial. *PLoS Med*. 2008; 5:196.
145. Barker E. M, McCloskey E, Saha S, Gossiel F, Charlesworth D, Powers J. H. and Blumsohn A. Serum Retinoids and β -Carotene as Predictors of Hip and Other Fractures in Elderly Women. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(6): 913-920.
146. Sahni S, Hannan T M, Blumberg J, Cupples L A, Kiel P D and Tucker L K. Inverse association of carotenoid intakes with 4-y change in bone mineral density in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(1): 416-424.
147. Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(4): 1003-1007.
148. Hoover PA, Webber CE, Beaumont LF, Blake JM. Postmenopausal bone mineral density: relationship to calcium intake, calcium absorption, residual estrogen, body composition, and physical activity. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996; 74(8): 911-917
149. Devine A, Hodgson JM, Dick IM, Prince RL. Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86(4): 1243-7.
150. Arjmandi BH, Juma S, Beharka A, Bapna MS, Akhter M, Meydani SN. Vitamin E improves bone quality in the aged but no in the young adult male mice. *J Nutr Biochem*. 2002; 13: 543-549.
151. Simon JA, Hudes ES. Relation of ascorbic acid to bone mineral density and self-reported fractures among US adults. *Am J Epidemiol*. 2001;154:427-33.
152. Melhus H, Michaëlsson K, Holmberg L, Wolf A, Junghall SL. Smoking, antioxidant vitamins and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(1): 129-136.
153. Zhang J, Munger GR, West NA, Cutler DR, Wengreen HJ, Corcoran CD. Antioxidant intake and risk of osteoporotic hip fracture in Utah: An effect modified by smoking status. *Am J Epidemiol*. 2006; 163: 9-17.
154. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*. 1996; 10:709-720.
155. Meyer HE, Smedshaug GB, Kvaavik E, Falch JA, Tverdal A, Pedersen JI. Can vitamin D supplementation reduce the risk of fracture in the elderly? A randomized controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(4): 709-715.
156. Leveille SG, Lacroix AZ, Knepsell TD, Beresford SA, Van Belle G, Buchner GM. Dietary vitamin C and bone mineral density in postmenopausal woman in Washington State, USA. *J Epidemiol Community Health*. 1997;51(5):479-
-
-

- 485.
157. Wong MC, Villa ML, Marcus R, Kelsey JL. Associations of vitamin C, calcium and protein with bone mass in postmenopausal Mexican American women. *Osteoporos Int.* 1997; 7:533-545.
 158. Wolf RL, Cauley JA, Pettinger M, Jackson R, Lacroix A, Leboff MS, Lewis CE, Nevitt MC, Simon Ja, Stone KI, Wactawski-Wende J. Lack of a relation between vitamin and mineral antioxidants and bone mineral density: results from the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82(3): 581-588.
 159. Sahni S, Hannan MT, Gaqnon D, Blumberg J, Cupples LA, Kiel DP, Tucker KL. High vitamin C intake is associated with lower 4-year bone loss in elderly men. *J Nutr.* 2008; 138(10): 1931-1938.
 160. Jentsch Ma, Bachman H, Fürst P, Biesalski KH. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biol Med.* 1996; 20 (2): 251-256.
 161. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158.
 162. Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC, O'Dowd KJ: Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiol Rev.* 1985;7: 178-208.
 163. Stevenson M, Lloyd M J, De Nigris E, Brewer N, Davis S and Oakley J. A systematic review and economic evaluation of alendronate, etidronate, risedronate, raloxifene and teriparatide for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Health Technol Assess.* 2005;9(22): 51-82.
 164. Gennari C: Calcitonin, bone-active isoflavones and vitamin D metabolites. *Osteoporos Int.* 1999;9 (Suppl 2):S81-S90.
 165. Khan A: Advances in osteoporosis therapy. 2003 update of practical guidelines. *Can Fam Physician.* 2003; 49:441-447.
 166. Hall SL, Greendale GA. The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density: results from the PEPI study. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63: 183-189.
 167. El Maghraoui A, Mouinga ADA, Rkain H, Mounach A. Discordance in diagnosis of osteoporosis using spine and hip bone densitometry. *J Clin Densitom.* 2007;10:153-156
 168. Manolagas CS. From Estrogen-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010; 31:266-300
 169. Avitabile M, Campagna NE, Magrì GA, Vinci M, Sciacca G, Alia G, Ferro A. Correlation between serum glutathione reductases and bone densitometry values. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1991; 67: 931 -937.
 170. Retana-Ugalde R, Vargas LA, Altamirano-Lozano M and Mendoza-Núñez VM. Influence of the placebo effect on oxidative stress in healthy older
-
-

- adults of Mexico City. *J Clin Pharm Ther.* 2009; (34): 1–7
171. De Pascalis V, Chiaradia C, Carotenuto E. The contribution of suggestibility and expectation to placebo analgesia phenomenon in an experimental setting. *Pain.* 2002; 96(3):393-402.
172. Macedo A, Farré M, Baños JE. Placebo effect and placebos: what are we talking about? Some conceptual and historical considerations. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 59(4):337-42
173. Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants.* 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 2002: 99-145
174. Block G, Jensen DC, Morrow DJ, Holland N, Norkus PE, Milne LG, Hudes M, Dalvi BT, Crawford BP, Fung BE, Schumacher L, and Harmatz P. Effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress in nonsmokers. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(4): 377-384.
175. Pasco JA, Henry MJ, Wilkinson LK, Nicholson GC, Schneider HG, Kotowicz MA. Antioxidant vitamin supplements and markers of bone turnover in a community sample of nonsmoking women. *J Womens Health. (Larchmt)* 2006; 15(3): 295-300.
176. Turan B, Can B, Delilbasi E. Selenium combined with vitamin E and vitamin C restores structural alterations of bones in heparin-induced osteoporosis. *Clin Rheumatol.* 2003; 22(6): 432-436.

ANEXOS

ANEXO 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

*** Z A R A G O Z A ***

INSTITUTO PARA LA ATENCIÓN DE LOS ADULTOS MAYORES

DEL ESTADO DE HIDALGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**PROYECTO: “EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ALFA-
TOCOFEROL Y EL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA DENSIDAD MINERAL
ÓSEA EN ADULTOS MAYORES”**

Antecedente y Objetivo

Estudios recientes han demostrado una asociación etiológica y fisiopatológica entre el estrés oxidante y la osteoporosis, así como un efecto benéfico potencial de la administración crónica de vitamina C y E, sobre la densidad mineral ósea, no obstante, las evidencias científicas en humanos son escasas e inconsistentes

Procedimiento:

Se invitarán a personas adultas mayores del Estado de Hidalgo sanas y con enfermedades crónicas no descompensadas (**glucosa en sangre en ayuno menor de 180 mg/dL; presión arterial máxima, 160 sistólica/100 diastólica**) a que participen de manera voluntaria en el proyecto. A todas las personas incluidas en el estudio se les realizará un examen médico, incluyendo una historia clínica completa, electrocardiograma en reposo, toma de cuatro tubos de sangre para mediciones bioquímicas, medición de composición corporal, determinación de funcionalidad física y evaluación gerontológica integral, antes de iniciar el programa y, a los 12 meses posteriores al programa.

Condiciones para ingresar al estudio

- Edad mayores de 60 años, no importando el sexo.
- Clínicamente sanos o con enfermedades crónico-degenerativas controladas.
- Firmar o poner su huella digital en esta carta de compromiso.

Riesgos

No existe ningún riesgo para su salud, las tomas de muestras sanguíneas serán llevadas a cabo por personal experimentado con material nuevo y desechable y el programa será monitorizado por personal del Instituto para la Atención de los Adultos Mayores del Estado de Hidalgo.

Beneficios

Las pruebas **no tendrán ningún costo** y los resultados de glucosa, perfil lipídico, perfil renal, biometría hemática, así como los de las pruebas de funcionalidad física y de la evaluación gerontológica integral se les entregarán a los participantes para el control y vigilancia de su estado de salud.

Confidencialidad

Toda la información obtenida es **ESTRICTAMENTE CONFIDENCIAL**, por lo que sólo se le proporcionará al participante y a su médico tratante.

Preguntas

Toda duda que tenga durante el tiempo que dura la investigación la podrá consultar con su médico tratante y 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 que le brinda el Instituto para la Atención de los Adultos Mayores del Estado de Hidalgo. Así mismo, puede decidir abandonar el estudio en el momento que usted lo considere conveniente.

En caso de cualquier duda o sugerencia en relación al proyecto comunicarse con:

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez

M. en CQB. Mirna Ruiz Ramos

Unidad de Investigación en Gerontología, FES Zaragoza UNAM, México D.F.,

Tel. 015556230700, #, 39182, 015556230770, o a los correos:

mendovic@servidor.unam.mx, mirnar@comunidad.unam.mx

En el estado de Hidalgo:

Psic. Gustavo Carrasco

gustavocvera@yahoo.com.mx

CONSENTIMIENTO

DECLARO QUE HE LEÍDO O ME HAN LEÍDO EN PRESENCIA DE UN FAMILIAR RESPONSABLE EL CONTENIDO DEL PRESENTE DOCUMENTO, COMPRENDO LOS COMPROMISOS QUE ASUMO Y LOS ACEPTO EXPRESAMENTE. POR ELLO, MANIFESTO MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN CON TÍTULO: **“EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ALFA-TOCOFEROL Y EL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN ADULTOS MAYORES”** Y FIRMO VOLUNTARIAMENTE ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos y he recibido una copia de este impreso.

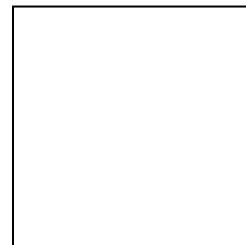
Nombre y firma del
participante _____

Nombre y firma de un familiar
(testigo): _____

Nombre y firma del investigador:

Pachuca, Hidalgo a ____ de _____ del _____.

En caso de no saber leer y escribir poner huella digital en el cuadro después de haberle leído el documento al participante en presencia del testigo.



ANEXO 2.

PRODUCTOS DE LA
INVESTIGACIÓN

SUPPLEMENTATION OF ASCORBIC ACID AND ALPHA-TOCOPHEROL IS USEFUL TO PREVENTING BONE LOSS LINKED TO OXIDATIVE STRESS IN ELDERLY

M. RUIZ-RAMOS¹, L. ALBERTO VARGAS², T.I. FORTOUL VAN DER GOES³,
A. CERVANTES-SANDOVAL¹, V.M. MENDOZA-NÚÑEZ^{1,4}

1. Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F., México. Batalla 5 de mayo s/n, esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, 09230 México, DF., México. Phone: (+52)(55) 5623-0721; Fax: (+52)(55) 5773-6330.; 2. Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM; 3. Facultad de Medicina, UNAM; 4. Corresponding author: V.M. Mendoza-Núñez. Guelatao # 66, Col. Ejército de Oriente, 09230 México, DF, México. Phone: (+52)(55) 5623-0721; Fax: (+52)(55) 5773-6330. E-mail address: mendovic@servidor.unam.mx

Abstract: *Objective:* To determine the effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol on oxidative stress and bone mineral density (BMD) in elderly people. *Design:* A double-blind, controlled clinical assay was carried out in a sample of 90 elderly subjects divided into three age-paired random groups with 30 subjects in each group. Group Tx0 received placebo, group Tx1 received 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. *Measurements:* We measured thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total antioxidant status (TAS), superoxide dismutase (SOD), and glutation peroxidase (GPx); BMD was obtained on DXA of hip and spine before and after the 12-month treatment period with supplementation of vitamins C and E. *Results:* We found a positive correlation between hip-BMD and SOD ($r = 0.298$, $p < 0.05$) and GPx ($r = 0.214$, $p < 0.05$). Also, a significantly lower decrease of LPO ($p < 0.05$) was observed as linked with hip bone loss in the Tx2 group than in the Tx0 group. *Conclusions:* Our findings suggest that administration of 1,000 mg of ascorbic acid together with 400 IU of alpha-tocopherol could be useful in preventing or aiding in the treatment of age-related osteoporosis.

Key words: Ascorbic acid, alpha-tocopherol, bone loss, osteoporosis, oxidative stress.

Introduction

All aerobic organisms, as a result of basic metabolic reactions, generate large quantities of superoxide radicals and hydrogen peroxide (H₂O₂), which can cause oxidative damage at the cellular level (1, 2). Thus, the organism possesses antioxidant homeostatic mechanisms to prevent attack of cellular components and the consequent oxidation of the latter, among which we find metal-trapping proteins and the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase, as well as estrogen in the case of women, among others (3, 4). Additionally, as a complement to these endogenous mechanisms, vitamins such as A, C, and E contribute significantly to the antioxidant system (5, 6). When the antioxidant system is not efficient in counterarresting the formation of free radicals (FRs), highly reactive molecules cause oxidative damage to macromolecules such as DNA, lipids, proteins, and carbohydrates. As a consequence of the disequilibrium between antioxidants/oxidants, so-called oxidative stress (OxS) is promoted, which constitutes an etiological and physiopathological factor of many chronic-degenerative diseases, among which diabetes mellitus, high blood pressure, cataracts, atherosclerosis, liver diseases, rheumatoid arthritis, osteoporosis, several types of cancer are prominent (7-12).

Bone tissue is formed and replaced in a constant manner by means of the complex interaction among minerals, hormones, and specialized cells. This process occurs in equilibrated

fashion until ca. the age of 40 years; after this stage, the rate of bone resorption exceeds that of formation, causing a decrease in bone mass. This disequilibrium is what gives rise to osteoporosis, a generalized skeletal disorder characterized by bone mass reduction and deterioration in bone-mass quality, causing an increase in bone fragility and a greater risk of fractures (13-15).

It has been demonstrated that the main risk factors for osteoporosis comprise inadequate ingestion of calcium and phosphorus, vitamin D deficiency, estrogen deficiency in the climacteric, low weight, chronic consumption of certain drugs (corticosteroids), physical inactivity, smoking, and the consumption of alcoholic beverages (16-19).

Recent studies have suggested that there is an association between bone mineral density (BMD) and oxidative stress (OxS) (20, 21). In this regard, it has been demonstrated that high H₂O₂ levels favor differentiation of osteoclastic cells from osteoclasts and inhibit differentiation of osteoblastic cells from osteoblasts, thus propitiating an accentuated diminution in OxS-related BMD (22-24). In addition, our research group evidenced a decrease in antioxidant activity in patients with osteoporosis (25). Arjmandi et al. (2002) demonstrated that administration of vitamin E exerts a beneficial effect on bone quality in old rats (26); however, the effect of antioxidant therapy on BMD has been scarcely approached in humans. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effectiveness of the administration of alpha-tocopherol and ascorbic acid on OxS and BMD in older adults.

ASCORBIC ACID AND ALPHA-TOCOPHEROL TO PREVENTING BONE LOSS

Methods

Design and participants

Screening and selection phase

Advertisements were distributed in the community specifying the objectives of the study, admission criteria and commitments. One hundred eighty elderly subjects agreed to participate in the study; however only 135 had the inclusion criteria. Candidates were requested to sign informed consent a letter specifying the reasons underlying their interest to participate as well as any circumstance that could facilitate or affect the compliance at the study.

Treatment phase

With previous informed consent, a double-blind controlled clinical assay was carried out in 135 elderly subjects healthy or with controlled chronic disease, which were randomly distributed into three groups (groups Tx0, Tx1, and Tx2) with 45 persons in each group. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Zaragoza Campus.

Group Tx0 received a placebo with a pharmaceutical presentation similar to that of the treatment, whereas the elderly members of Group Tx1 were administered 500 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol. At the same time, Group Tx2 received 1,000 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol. Treatment was self-administered by oral via daily.

Follow-up phase

Included in the follow-up phase of the study, were supervision visits in dwelling-house two times to week by gerontological promoters (27), besides, it was organized one meeting weekly between participants and members of the research team for strengthen the compliance of the treatment.

Fifteen persons each group did not finish the treatment (Lost to follow up), because, they underwent an acute disease and their physician prescribed several medications and stop the vitamins ingest. Finally, thirty subjects each group complied

Average age per group, body mass index (BMI), life styles, and menopausal age were similar. None of the participants had fracture history; the clinic diagnostics and medications of the participants are showed in the Table 1.

Blood sampling and preparation

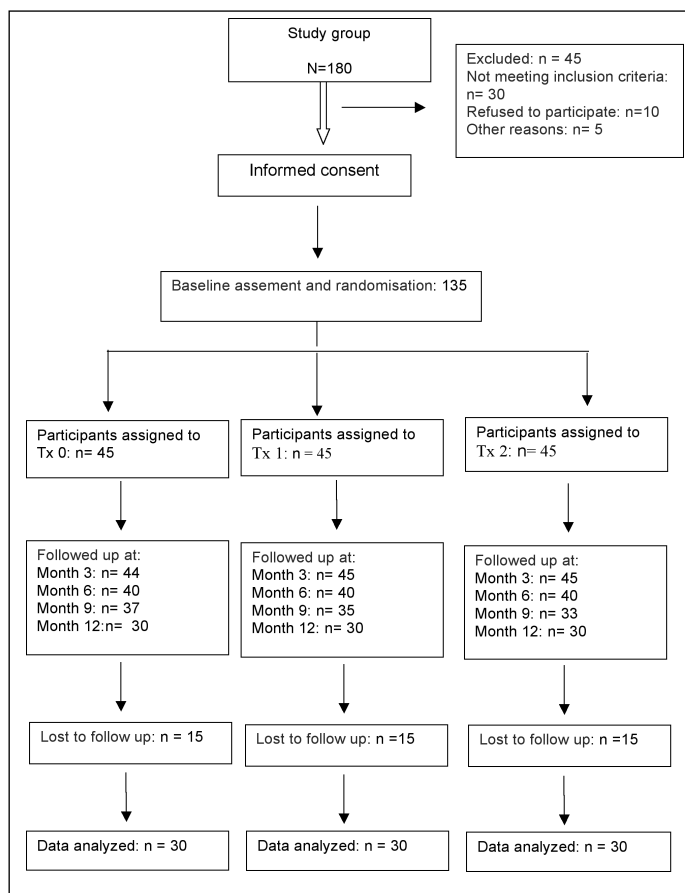
Blood samples were collected by venopuncture after a 12-h fasting period and were placed in vacutainer and siliconized test tubes containing a separating gel without additives. Heparin and ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA) were used as anticoagulant agents. Blood samples containing heparin were analyzed using complete hemoglobin test protocol (including hemoglobin, hematocrit, and leukocyte counts). Likewise TBARS, TAS, SOD, GPx activities.

The samples without anticoagulant agents were centrifuged at 3,500 rpm for 10min at 15°C-20°C with a centrifuge

Eppendorf 5804 (Hamburg, Germany); the serum obtained was subjected to the following tests: glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, urate, albumin, cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentrations. These tests were used as screening measurements for diagnosis of clinically healthy subjects.

Figure 1

Diagram of the number of patients actively followed up at different times during the trial



From the samples with heparin, 600 µL of the whole blood were kept for red blood cell (SOD), 100 µL for red blood cell (GPx). Each sample later was centrifuged at 3,500 rpm during 10min at 15°C-20°C a centrifuge Eppendorf 5804 (Hamburg, Germany). From the obtained plasma 100 µL were taken for TAS and 1000 µL for TBARS.

Blood and biochemical analyses

Glucose, cholesterol, triglycerides, and HDL-C concentration levels were determined using an Autoanalyzer Vitalab Eclipse Merck (Dieren, The Netherlands). In particular, glucose levels were measured by the glucose oxidase method (cut-off points: 63–120 mg/dL), urea levels 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).

Table 1
Clinical Characteristics of the Groups Study

	Tx 0 n = 30	Tx 1 n =30	Tx 2 n =30
Age	67.6 ± 7.3	68.2 ± 7.3	68.8 ± 8.5
Gender			
Female (%)	19 (66)	26 (87)	20 (68)
Male (%)	11 (34)	4 (13)	10 (32)
Menopausal age	46.3 ± 5.2	48.2 ± 4.3	47.8 ± 6.5
Body Mass Index (BMI) (kg/m ²)	27.2 ± 4.0	27.1 ± 3.7	27.7 ± 4.4
BMI < 22 (%)	2 (7)	3 (10)	3 (10)
BMI ≥22–27 (%)	18 (60)	14 (47)	15 (50)
BMI > 27 (%)	10(33)	13 (43)	12 (40)
Bone Mineral Density Lumbar Spine (g/cm ²)	0.84 ± 0.2	0.77 ± 0.1	0.79 ± 0.2
Bone Mineral Density HIP (g/cm ²)	0.85 ± 0.1	0.83 ± 0.1	0.84 ± 0.1
Smoke (≥7 cigarettes/week)			
Positive (%)	2 (7)	0 (0)	3 (10)
Negative (%)	28 (93)	30 (100)	27(90)
Alcohol Ingestion (≥ 2 cups/day)			
Positive (%)	1(3)	2 (7)	1 (3)
Negative (%)	29 (97)	28 (93)	29 (97)
Physical Exercise (≥ 3 days/week)			
Positive (%)	22 (73)	17(57)	16(53)
Negative (%)	8 (27)	13 (43)	14 (47)
Clinical diagnostic			
Healthy	17 (57)	18 (60)	15 (50)
Diabetes mellitus type 2 (DM2)	3 (10)	3 (10)	2 (7)
Arterial hypertension (AH)	5 (16)	3 (10)	5 (17)
DM2 & AH	3 (10)	3 (10)	4 (13)
Others	2 (7)	3 (10)	4 (13)
Medication			
None	12 (40)	9 (30)	12 (40)
Acid acetylsalicylic	6 (20)	9 (30)	3 (10)
Glibenclamide	6 (20)	6 (20)	6 (20)
Captopril	5 (16)	4 (13)	6 (20)
Enalapril	3 (10)	2 (7)	3 (10)
Glucosamine	3 (10)	2 (7)	2 (7)
Others	1 (3)	1 (3)	2 (7)

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

All reagents used in biochemical tests were obtained from Randox Laboratories, Ltd. (Crumlin, Co, Antrim, UK).

Plasma TBARS

The TBARS assay was prepared as described by Jentzsch et al. (1996) (29). 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).

Plasma (400µL) or malondialdehyde (MDA) standard (0.2-4 µmol/L) prepared by hydrolysis of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was mixed with 400 µL orthophosphoric acid (0.2 mol/L) (Sigma Chemical Co.) and 50 µL BHT (2mmol/L) (Sigma Chemical Co.) in 12x72 mm tubes. A total of 50µL TBA reagent (0.11mol/L in 0.1 mol/L NaOH) (Fluka Chem., Buchs, Switzerland) then has been added and the contents were mixed. Subsequently, the contents were incubated at 90°C for 45 minutes in a water bath. The tubes then were kept on ice to prevent further reaction. TBARS were extracted once with 1000 µL n-butanol (Sigma Chemical Co.). The upper butanol phase was read at 535 nm and at 572 nm to correct for baseline absorption in UV-spectrophotometer Shimadzu UV-1601 (Kyoto, Japan). MDA equivalents (TBARS) were calculated by the difference in absorption at the two wavelengths and quantification was done with calibration curve.

Plasma 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 Co. 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 with UV-spectrophotometer Shimadzu UV-1601 (Kyoto, Japan).

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., Crumlin Co. UK). The kinetics was measured at 505 nm with UV-spectrophotometer Shimadzu UV-1601 (Kyoto, Japan).

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+ (Randox Laboratories, Ltd., Crumlin Co. UK). Decrease in absorbance was measured at 340 nm with UV-spectrophotometer Shimadzu UV-1601 (Kyoto, Japan).

Bone mineral density

Subjects underwent dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) in hip and lumbar spine, which was measured with a densitometer (Hologic model QDR-4000 S/N 55618) with a

ASCORBIC ACID AND ALPHA-TOCOPHEROL TO PREVENTING BONE LOSS

precision of 0.34%, taking for the osteoporosis-like criterion a value less than -2.5 standard deviations (SD) in the T scale of parameters obtained for young adults and evaluated by age, gender, and ethnic group. The technique for evaluating BMD was adjusted to that established by the manufacturer, and measurement was performed by a technician trained by a recognized private company.

Statistical analysis

Data were processed by standard statistical software SPSS 14.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Descriptive statistics are analyzed by means ± standard error (SE). Results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Dunnett test post hoc. A p value < 0.05 was considered significant.

Results

In Table 2, we can observe the glucose concentrations and lipid profile of the population under study before and after treatment, in which no statistically significant differences were found. With respect to the relation of BMD with OxS markers, a statistically significant positive correlation between HIP-BMD and SOD activity (r = 0.298, p <0.05) was observed, as well as of GPx (r = 0.214, p <0.05) with BMD (Table 3).

Table 2

Biochemical Characteristics after Antioxidant Supplement

	Healthy n = 20	Osteopenia n = 36	Osteoporosis n = 34
Glucose (mg/dL)			
Baseline	97± 27.5	95± 32.0	90 ± 18.4
12 months	102±22.0	113±45.8	106±38.2
Cholesterol (mg/dL)			
Baseline	187± 23.1	199± 28.9	208 ±40.8
12 months	170±32.6	196±38.0	201±44.8
Triglycerides (mg/dL)			
Baseline	177± 43.2	171 ±52.1	159± 51.5
12 months	150±80.0	176±102	165±73.3
HDL- Cholesterol (mg/dL)			
Baseline	53.35±7.94	56.33±10.67	59.79±9.37
12 months	49.14±10.16	52.0±7.29	53.40±8.66

With regard to changes in OxS markers and BMD before and after treatment, we observed a statistically significant diminution in LPO concentration in addition to a statistically significant increase of DMO (Table 4).

In Figure 2, the changes are shown of LPO levels before and after treatment, observing a significant proportional diminution (-44%) in group Tx2 in comparison with groups Tx0 and Tx1 (-31 and -24%, respectively). In terms of BMD, we found less bone loss at the hip level in group Tx2 (Figure 3).

Table 3

Correlation between Age, BMI, Oxidative Stress Markers and Hip BMD

	BMD	Age	LPO	CAT	SOD	GPx	SOD/GPx	BMI	
r value	BMD	1.00	-0.383	0.100	0.189	0.411	0.446	-0.336	0.341
	Age	1.00	-0.166	-0.156	-0.289	-0.390	0.254	-0.618	
	LPO		1.00	0.055	0.093	0.132	0.054	0.043	
	TAS			1.00	-0.263	0.017	-0.252	0.401	
	SOD				1.00	0.225	-0.033	0.284	
	GPx					1.00	-0.853	0.302	
	SOD/GPx						1.00	-0.337	
	BMI							1.00	
Sig. (1-tailed)	BMD	0.027	0.313	0.178	0.019	0.011	0.046	0.044	
	Age		0.208	0.223	0.076	0.024	0.105	0.000	
	LPO			0.394	0.326	0.260	0.396	0.417	
	TAS				0.098	0.468	0.107	0.021	
	SOD					0.135	0.436	0.080	
	GPx						0.000	0.067	
	SOD/GPx							0.046	

LPO, Lipoperoxides; TAS, total antioxidant status; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutation peroxidase

Table 4

Oxidative Stress Markers and Bone Mineral Density Differences after Antioxidant Supplement

Variable	Tx0 n = 30	Tx1 n= 30	Tx2 n= 30
LPO (mol/L)			
Baseline	0.239±0.011	0.215±0.036	0.250±0.059
12 months	0.162±0.009	0.160±0.006	0.144±0.005
Differences	- 0.075 (31%)	- 0.052 (24%)	- 0.110 * (44%)
TAS (mmol/L)			
Baseline	1.03±0.038	1.02±0.033	1.02±0.046
12 months	1.36±0.062	1.43±0.050	1.26±0.061
Differences	0.336	0.416	0.246
SOD (UI/L)			
Baseline	175±1.16	175±1.23	176±1.24
12 months	176±2.66	175±2.27	175±2.11
Differences	0.571	- 1.292	- 1.714
GPx (UI/L)			
Baseline	8188±558	8498±670	8025±487
12 months	8345±670	10416±976	10155±1086
Differences	- 104.7	1812.9	2314.6
Lumbar spine BMD (g/cm ²)			
Baseline	0.896±0.037	0.786±0.031	0.822±0.37
12 months	0.904±0.038	0.800±0.030	0.831±0.039
Differences	0.0083	0.0141	0.0095
Hip BMD (g/cm ²)			
Baseline	0.865±0.015	0.852±0.012	0.841±0.010
12 months	0.859±0.015	0.848±0.011	0.850±0.010
Differences	- 0.0056	- 0.0043	0.0087†

Lipoperoxides (LPO), total antioxidant status (TAS), superoxide dismutase (SOD) y glutation peroxidase (GPx); bone mineral density (BMD). Tx1 (placebo), Tx1 (500 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol), Tx2 (1,000 mg of ascorbic acid and 400 IU of alpha-tocopherol.). ANOVA * Tx1 versus Tx2 p = 0.007; †Tx0 versus Tx2 p = 0.047.

Figure 2

Proportional changes of LPO by treatment group. Tx0 -31%;
Tx1 -24%; Tx2 -44%

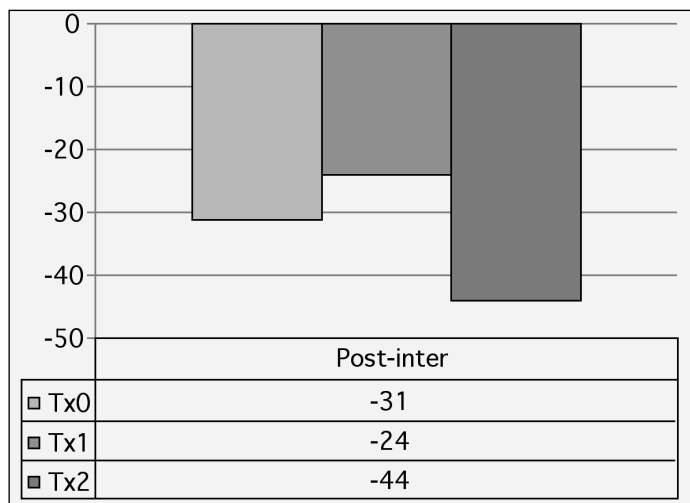
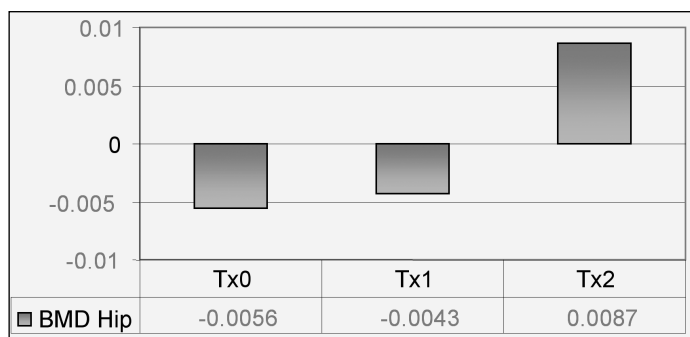


Figure 3

Differences of Hip BMD by treatment group. Tx0: -0.0056;
Tx1: -0.0043 and Tx2 0.0087. ANOVA test, $p < 0.05$: Tx0
versus Tx2



Discussion

Osteoporosis is one of the most frequent chronic-degenerative disorders during old age and is the cause of up to 75% of bone fractures in individuals aged >50 years; therefore, it is consequently accompanied by a diminution in the quality of life (QOL) in elderly adults (30). Thus, the main objective of the treatment of osteoporosis should be the prevention of bone tissue loss, to avoid the risk of fractures, as well as the recuperation of bone mass and diminishing the pain and discomfort that can arise from fractures in patients with diagnosed osteoporosis (31).

Among the most frequently employed drugs in the prevention and treatment of osteoporosis, the following are highlighted: selective estrogen receptor modulators (SERMs); calcitonin-salmon; the bisphosphonates; calcium and vitamin D supplements, vitamin D-analogues, ipriflavone, strontium ranelate, and hormone replacement therapy (HRT) (14, 32-34).

On the other hand, it has been reported that persons with osteoporosis present the lowest levels of uric acid and of antioxidant enzymes (20), supporting the proposal that indicates antioxidant supplements with preventive and/or therapeutic aims for osteoporosis. In this regard, recent studies have demonstrated that the consumption of antioxidant vitamins can exert an influence on the quality of BMD on reducing the effects of OxS, which can be associated with bone mass loss; notwithstanding this, the scientific information available in humans is scarce and inconclusive (35, 36). Therefore, in the present study, we evaluated the influence of administration of alpha-tocopherol and ascorbic acid on OxS and BMD in older adults. On analyzing the biochemical markers of OxS per diagnosis, we observed that subjects with osteoporosis presented higher LPO values and a diminution of the activity of antioxidant enzymes SOD and GPx, although only a statistically significant difference was present in SOD activity. These findings support the hypothesis about link the bone tissue loss with deficit in the antioxidant system and OxS.

In this respect, our results coincide with those of other studies, in which a relationship has been observed between low antioxidant activity and an increase in bone resorption as a consequence of the increase of FR (37). Likewise, our research group found a directly proportional relationship between total serum antioxidant capacity and BMD, and demonstrated that OxS is a risk factor for osteoporosis in elderly adults because the SOD/GPx ratio increases (25, 38).

Another finding of the present study was the positive correlation between BMD and antioxidant enzyme activity. These results suggest that the efficiency of the enzymatic antioxidant system can prevent the decrease in age-relative BMD and with this, the risk of presenting osteoporosis. Our results coincide with that reported by Maggio et al. (2003), who in a study carried out in women >60 years of age, observed that antioxidant activity diminishes significantly in women with osteoporosis compared with healthy controls. In this respect, the authors a decrease in vitamins A, C, and E, uric acid, and the antioxidant enzymes SOD and GPx, as well as a positive correlation between BMD and GPx (23).

On the other hand, Sahni et al. (2008) found an effect protective of the vitamin C for bone tissue loss in elderly men, but not in elderly women (39), suggesting that this option therapeutic only can be useful for males.

On analyzing OxS markers by treatment, we observed that subjects exposed to Tx2 presented a significant effect on the concentration of LPO and BMD on the hip, which demonstrate that an intake of 1,000 mg of vitamin C in addition to 400 IU of vitamin E daily diminishes the concentration of LPO, favoring a slight increase in hip BMD. In this sense, it has been observed that the consumption of vitamins E and C can diminish bone resorption in non-smoking postmenopausal women (40). Similarly, Turan et al. (2003), in a study conducted in rats, found that the consumption of vitamins E and C combined with selenium can prevent the bone structural changes that present in

ASCORBIC ACID AND ALPHA-TOCOPHEROL TO PREVENTING BONE LOSS

osteoporosis (41). In this regard, it has been noted that the antioxidant-rich diet plays an important role in the prevention of osteoporosis, because if the alimentary intake of vitamins E and C is deficient, the risk of hip fracture increases significantly, while if the diet is rich in vitamins E, C, and D, as well as in carotenes and selenium, this risk decreases. However, it has also been reported that there is no relation between a diet rich in antioxidants and BMD; these inconsistencies justify continuing this line of research (42).

Finally, our findings support the proposal of the etiological and physiopathological association of OxS with osteoporosis and the possible beneficial effect of antioxidants as a coadjuvant in the prevention and treatment of osteoporosis.

Acknowledgements: This work was supported by grants from Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and DGAPA, UNAM PAPIIT IN303009.

Financial disclosure: None of the authors had any financial interest or support for this paper.

References

1. Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
2. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3):481-493.
3. Gutteridge JM: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-1828.
4. Liehr JC, Roy D: Pro-oxidant and antioxidant effects of estrogens. In: Armstrong D. Free radical and antioxidant protocols. New Jersey: Humana Press, 1998: 425-435.
5. Sies H, Stahl W: Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(6 Suppl):1315S-1321S.
6. Stahl W, Sies H: Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* 1997; 46 (Suppl 2):S14-S18.
7. Valda WB: Free radical, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci* 1992; 49: 299-312.
8. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE: Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J Lab Clin Med* 1992;119(6):598-620.
9. Niki E: Action of antioxidants against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 7915-7922.
10. Gutteridge JM: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994;91(2-3):133-140.
11. Faure P, Corticelli P, Richard MJ, Arnaud J, Coudray C, Halimi S, Favier A, Roussel AM: Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy. *Clin Chem* 1993; 39: 789-793.
12. Knight JA: Free radicals, antioxidants, aging, and disease. Washington: AACCC Press, 1999.
13. Dequeker J: Bone and ageing. *Ann Rheum Dis* 1975; 34: 100-115.
14. Consenso Mexicano de osteoporosis: Asociación Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral. *Rev Inv Clin* 2001; 53(5): 469-495.
15. Kleerekoper M: The pathophysiology of osteoporosis. In: Rosen CJ. Osteoporosis. Diagnostic and therapeutic principles. New York: Human Press, 1996: 65-68.
16. Cumming RG: Calcium intake and bone mass: a quantitative review of the evidence. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 194-201.
17. Parra-Cabrera S, Hernandez-Avila M, Tamayo-y-Orozco J, López-Carrillo L, Meneses-González F. Exercise and reproductive factors as predictors of bone density among osteoporotic women in Mexico City. *Calcif Tissue Int*. 1996; 59(2):89-94.
18. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kannel WB, Kiel DP: Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1995; 142:485-492.
19. Krall EA, Dawson-Hughes B: Smoking and bone loss among postmenopausal woman. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 331-338.
20. Key LL Jr, Ries WL, Glasscock H, Rodriguiz R, Jaffe H: Osteoclastic superoxide generation: taking control of bone resorption using modulators of superoxide concentrations. *Int J Tissue React* 1992; 14: 295-298.
21. Strassheim D, Asehounne K, Park JS, Kim JY, He Q, Richter D, Mitra S, Arcaroli J, Kuhn K, Abraham E: Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H2O2: disparate effects on kinases, NF-kB, and cytokine expression. *Am J Physiol Cell* 2004; 286: C683-C692.
22. Hikiji H, Shin WS, Koizumi T, Takato T, Susami T, Koizumi Y, Okai-Matsuo Y, Toyo-Oka T: Peroxynitrite production by TNF- and IL-1 : implication for suppression of osteoblastic differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:E1031-1037.
23. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A: Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1523-1527.
24. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ: Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 197-207.
25. Sánchez-Rodríguez MA, Arellano-Pimentel B, Vargas-Guadarrama LA, Mendoza-Núñez VM: Relación entre la densidad mineral ósea y los niveles de antioxidantes totales en una población de adultos mayores. *Arch Geriatr* 2002; 4:106-108.
26. Arjmandi BH, Juma S, Beharka A, Bapna MS, Akhter M, Meydani SN: Vitamin E improves bone quality in the aged but no in the young adult male mice. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 543-549.
27. Martínez-Maldonado M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM: Program of active aging in a rural Mexican community: a qualitative approach. *BMC Public Health* 2007; 7:276.
28. Altman DG, Schulz KF, Moher D, Egger M, Davidoff F, Elbourne D, Gøtzsche PC, Lang T; CONSORT GROUP (Consolidated Standards of Reporting Trials): The revised CONSORT statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration. *Ann Intern Med*. 2001; 134:663-694.
29. Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK: Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:251-256.
30. Chrischilles EA, Butler CD, Davis CS, Wallace RB: A model of lifetime osteoporosis impact. *Arch Intern Med* 1991;151:2026-2032.
31. Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC, O'Dowd KJ: Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiol Rev* 1985;7: 178-208.
32. Reid IR: Therapy of osteoporosis: calcium, vitamin D, and exercise. *Am J Med Sci*. 1996; 312(6):278-286.
33. Gennari C: Calcitonin, bone-active isoflavones and vitamin D metabolites. *Osteoporos Int* 1999;9 (Suppl 2):S81-S90.
34. Khan A: Advances in osteoporosis therapy. 2003 update of practical guidelines. *Can Fam Physician* 2003; 49:441-447.
35. Hall SL, Greendale GA: The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density: results from the PEPI study. *Calcif Tissue Int* 1998; 63: 183-189.
36. Melhus H, Michaëlsson K, Holmberg L, Wolk A, Ljunghall S: Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 1999; 14(1):129-135.
37. Avitabile M, Campagna NE, Magri GA, Vinci M, Sciacca G, Alia G, Ferro A : Correlation between serum glutathione reductases and bone densitometry values. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1991; 67: 931-937.
38. Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM: Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexican as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:124.
39. Sahni S, Hannan MT, Gagnon D, Blumberg J, Cupples LA, Kiel DP, Tucker KL: High vitamin C intake is associated with lower 4-year bone loss in elderly men. *J Nutr* 2008; 138:1931-1938.
40. Pasco JA, Henry MJ, Wilkinson LK, Nicholson GC, Schneider HG, Kotowicz MA: Antioxidant vitamin supplements and markers of bone turnover in a community sample of nonsmoking women. *J Womens Health (Larchmt)* 2006;15(3):295-300.
41. Turan B, Can B, Delilbasi E: Selenium combined with vitamin E and vitamin C restores structural alterations of bones in heparin-induced osteoporosis. *Clin Rheumatol* 2003; 22(6): 432-436.
42. Wolf RL, Cauley JA, Pettinger M, Jackson R, Lacroix A, Leboff MS, Lewis CE, Nevitt MC, Simon JA, Stone KL, Wactawski-Wende J: Lack of a relation between vitamin and mineral antioxidants and bone mineral density: results from the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:581-588.