



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN

Daño y reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en un grupo de longevos
excepcionales (LE) en comparación con un grupo de adultos mayores (AM)

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN GERIATRIA

PRESENTA:

DRA. ELIZABETH PAREDES SALOMÓN

TUTOR DE TESIS: DR. EMILIO JOSÉ GARCÍA MAYO

ASESOR DE TESIS: DR JUAN MIGUEL GARCÍA LARA

México, D.F. Noviembre 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

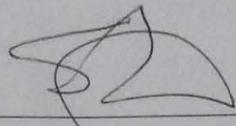
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Fernando , Fernanda, Cristina y Gabriel, todo lo que soy es gracias a ustedes y para ustedes .



DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

DIRECTOR DE ENSEÑANZA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN



DR EMILIO JOSÉ GARCÍA MAYO

PROFESOR TITULAR

ADSCRITO DE LA CLÍNICA DE GERIATRÍA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN



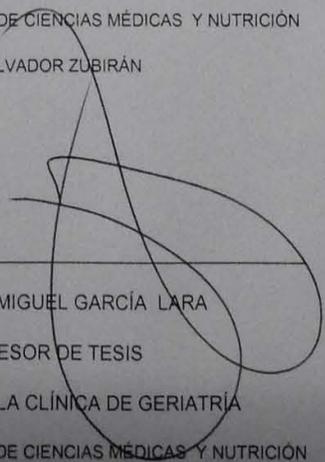
DR EMILIO JOSÉ GARCÍA MAYO

TUTOR DE TESIS

ADSCRITO DE LA CLÍNICA DE GERIATRÍA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN



DR JUAN MIGUEL GARCÍA LARA

ASESOR DE TESIS

ADSCRITO A LA CLÍNICA DE GERIATRÍA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN

INDICE

I.	RESUMEN	5
II.	ABSTRACT	7
III.	MARCO TEÓRICO.	
	a. Introducción	9
	b. Marco de referencia	10
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
V.	JUSTIFICACIÓN	17
VI.	OBJETIVOS	
	a. Objetivo primario	17
	b. Objetivo secundario	17
VII.	HIPÓTESIS	17
VIII.	METODOLOGÍA	18
	a. Diseño del estudio	18
	b. Población de estudio	18
	c. Criterios de inclusión y exclusión	18
	d. Desarrollo del estudio	19
	e. Variables	21
	f. Análisis estadístico	22
	g. Consideraciones éticas	22
IX.	RESULTADOS	23
X.	DISCUSIÓN	28
XI.	CONCLUSIONES	33
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
XIII.	ANEXOS	38

RESUMEN

Introducción: A lo largo de la vida estamos expuestos a múltiples factores tanto intrínsecos (transporte de electrones mitocondriales, reacciones del citocromo p450, subproductos de reacciones enzimáticas, peroxisomas, especies reactivas de oxígeno), como extrínsecos (radiación, químicos, fármacos, humo del tabaco, radiaciones ionizantes, etc.) que modifican la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) retando a su funcionalidad por la disminución o pérdida en la capacidad de los mecanismos de reparación o alteraciones en procesos de regulación génica. Estos fenómenos se han descrito como algunos de los condicionantes de la longevidad. Se han hecho estudios en humanos en donde se observa que el daño al ADN progresa conforme avanza la edad y se va acumulando, en cambio, cuando se induce un daño directo al ADN en sujetos longevos se observa que sus mecanismos de reparación presenta resistencia al daño y disminuye la apoptosis. Todos estos estudios son poco concluyentes y las edades de reclutamiento en muchos casos no alcanzan la longevidad excepcional. Por esta razón surgió la pregunta si en pacientes longevos excepcionales el daño basal y los mecanismos de reparación al ADN serán iguales o mejores cuando se comparan con un grupo de adultos mayores.

Objetivo: Evaluar el daño y los mecanismos de reparación del ADN en un grupo de longevos excepcionales en comparación con un grupo de adultos mayores entre 60-75 años

Método: Estudio experimental que incluyó a 6 personas >95 años (longevos excepcionales, LE) y 6 sujetos entre 60-75 años (adultos mayores, AM) (grupo de comparación). Se excluyeron a las personas con patologías en las cuales se ha reportado daño oxidativo que interviene en los mecanismos de reparación del ADN. A todos se les aplicó una evaluación geriátrica integral y se tomó una muestra de sangre a la que se le midió el daño basal al ADN, post reto genotóxico con radiación y mecanismos de reparación (medición de daño a los 60 minutos) utilizándose electroforesis unicelular (ensayo cometa). El daño al ADN se reportó en unidades arbitrarias (UA). Realizamos análisis descriptivo mediante medidas de

tendencia central y análisis comparativo con pruebas no paramétricas. Se consideró valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

Resultados: Nuestra población tuvo las siguientes características; fueron 8/12 mujeres con una mediana de edad de 97 años para los LE y de 70 años para los AM. El riesgo de desnutrición fue más frecuente en LE mientras que la dislipidemia en los AM. No hubo otras diferencias en las variables estudiadas. El daño basal y el post-radiación no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos; en cambio, se observó que el daño medido como representación de los mecanismos de reparación del ADN es mucho menor en el grupo de LE, mostrando diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de AM.

Conclusiones: No se corroboró que el daño al ADN aumente en grupos longevos cuando se compara con un grupo de adultos mayores jóvenes, pero sí se observó disminución del daño en los sujetos LE cuando este se induce mediante un reto genotóxico. De acuerdo a esto, el grupo de LE tiene casi el mismo daño que se reportó en estado basal. Es posible que de acuerdo a nuestros resultados existan mejores mecanismos de reparación al ADN en grupos específicos como son los LE que pueden explicarse por restricción calórica o por aumento en el nivel de antioxidantes, sin embargo, este efecto debe estudiarse.

ABSTRACT

Introduction: Throughout life we are exposed to multiple factors such as intrinsic (mitochondrial electron transport, cytochrome p450 reactions, enzymatic reactions, peroxisomas, reactive oxygen species), and extrinsic (radiation, chemicals, drugs, tobacco, ionizing radiation) that modify the structure of the deoxyribonucleic acid (DNA) challenging their functionality by reduction or loss in the repair mechanisms of DNA or alterations in gene regulation processes. These phenomena have been described as some of the constraints of longevity. There have been studies in humans shows the DNA damage progresses as the age advances, and it accumulates, on the other hand, when it's induced a direct damage to DNA in long-lived subjects shows that its repair mechanisms presents resistance to damage and decreased apoptosis. All these studies are inconclusive and the ages of recruitment in many cases do not reach the exceptional longevity. For this reason emerged the question if the basal damage and DNA repair mechanisms will be equal or better in exceptional long-lived patients compared with a group of older adults.

Objective: To assess the damage and the repair mechanisms of DNA in a group of exceptional long-lived subjects compared to a group of older between 60-75 years

Method: Pilot study that included 6 persons older of 95 years (exceptional long-lived, LE) and 6 subjects between 60-75 years (older, AM) (comparison group). Excluded persons were the ones that have pathologies which already have been reported oxidative damage involved in DNA repair mechanisms. A comprehensive geriatric assessment was applied to all and took a blood sample which was measured the basal DNA damage, post challenge genotoxic with radiation and mechanisms of repair (measurement of damage at 60 minutes) using single cell electrophoresis (Comet assay). The DNA damage was also reported in arbitrary units (AU). We provide descriptive measures of central tendency analysis and comparative analysis with nonparametric tests. We use p-value lower of 0.05 as statistically significant.

Results: Our population had the following characteristics; they were 8/12 women with a median age of 97 for the long-lived and 70 years for the older adults. The risk of malnutrition was frequent in long-lived just as the dyslipidemia in the older adults. There were no other differences in the variables studied. Basal damage and after radiation showed no statistically significant differences between the two groups; on the other hand, was that the damage measured as a representation of DNA repair mechanisms is much lower in the group of long-lived, showing statistically significant difference compared with the group of older adults.

Conclusions: With our study it was not confirmed that damage to DNA increases in long-lived groups when compared with a group of older adults, but it was observed decrease damage in subjects long-lived when this is induced by genotoxic challenging. Accordingly, the group of long-lived has almost the same damage that was reported in the basal state. Is possible that, according to our results, there are better mechanisms of repair to DNA in specific groups such as the long-lived and it can be explained by calorie restriction or by increase in the level of antioxidants, however, this effect should be considered.

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

La expectativa de vida ha aumentado de 18-22 años para los hombres y de 22 a 26 años para las mujeres a partir de los 60 años. Debido a este cambio demográfico los adultos mayores se han categorizado de la siguiente manera: adulto mayor joven 65-74 años, adulto mayor 75-80 años, y los adultos mayores viejos >85 años. En 2010 existía más de un billón de personas a nivel mundial que son mayores de 65 años. De éstos el 8% (aproximadamente 42 millones) son mayores de 85 años y se proyecta que para el año 2050 éstos constituyan más de 147 millones. (Naciones Unidas, 2011). Estos cambios representan un salto de 350% a lo largo de 40 años. Cuando hablamos de centenarios está proyectado un aumento de 10 veces (más de 3 millones de personas) durante el periodo de 2010 a 2050.

Por esta razón se ha hecho de mayor interés el estudio del envejecimiento y de la longevidad. Desde hace más de 100 años se han desarrollado múltiples teorías que han tratado de explicar este fenómeno.

El envejecimiento y la neurobiología de la longevidad son fenómenos cuyos mecanismos desencadenantes aún siguen siendo objeto de estudio y se ha descrito que son eventos que vienen de la mano. Por esta razón aún se siguen desarrollando protocolos en diferentes especies y etapas de la vida para poder explicar las condiciones específicas que llevan a estos desenlaces. Han surgido más de 300 hipótesis, entre las más importantes se encuentran:

(a) daño molecular ocasionado por el estrés oxidativo que induce la liberación de radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ERO) tales como los superóxidos, peróxidos, especies derivadas del hidroxilo y del óxido nítrico, y la disminución de moléculas antioxidantes entre las que se incluyen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa, así como vitamina E, C y los carotenoides.²⁷ **(b)** daño macromolecular causado por radicales libres

que causan oxidación de los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Estos complejos macromoleculares oxidados y ubiquitinizados son depurados por el proteosoma, cuando existe una alteración genética o un daño al ADN este sistema es incapaz de degradar las proteínas dañadas y mutadas, causando acumulación y daño.¹⁷ y **(c)** daño al ADN telomérico, nuclear y/o mitocondrial, aún sin la presencia de radicales libres. El daño al ADN nuclear es el de mayor relevancia, ya que de éste depende la integridad y fidelidad genómica de la célula que asegura su funcionalidad. Durante el proceso de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria se producen altas concentraciones de radicales libres, que oxidan al ADNmt entre otros blancos ya mencionados.^{17, 20,23}

Altos niveles de ADNmt (ácido desoxirribonucleico mitocondrial) dañado en tejidos postmitóticos se observan durante el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas. Esto es debido a que el genoma mitocondrial codifica elementos esenciales de la cadena de transporte de electrones que ayuda a la síntesis de ATP (adenosin trifosfato), y con ello al dañar el ADNmt existen fallas bioenergéticas severas. Modelos en ratones han mostrado que existe una correlación entre el daño mitocondrial y signos consistentes con envejecimiento prematuro. Siendo esto lo que condiciona acortamiento de la expectativa de vida en ratones en más del 50%.^{23,30}

Todos estos mecanismos se han estudiado durante el envejecimiento y se han tratado de utilizar para describir la longevidad. Un sujeto LE se caracteriza como aquel que sobrepasa la expectativa de vida, pero se mantiene sin comorbilidades y que conserva su funcionalidad. Por este motivo en múltiples estudios se vuelven sujetos de interés para poder determinar sus mecanismos que les permiten supera la expectativa de vida.

MARCO DE REFERENCIA

A lo largo de la vida estamos expuestos a múltiples factores tanto intrínsecos (transporte de electrones mitocondriales, reacciones del citocromo p450, subproductos de reacciones enzimáticas, peroxisomas, ERO), como extrínsecos

(radiación, químicos, fármacos, humo del tabaco, radiaciones ionizantes, etc.) que modifican la estructura del ADN ^{26,28,29} por daño directo a las cadenas (ruptura de las cadenas dobles o sencillas, deleciones o entrecruzamientos) retando a su funcionalidad por la disminución o pérdida en la capacidad de los mecanismos de reparación o alteraciones en procesos de regulación génica.

Como ya hemos descrito una de las teorías que es más aceptada y a la que la mayoría hacen referencia dentro del proceso de envejecimiento es la que habla del daño al ADN por la presencia de radicales libres como ya hemos descrito con anterioridad. Esta propuesta nos dice que en procesos metabólicos normales (como el metabolismo de los alimentos) se forman radicales libres, que se requieren para la producción de energía (ATP). Cuando estos productos se llegan a acumular o su metabolismo de degradación está afectado existe daño al sistema de transporte de la mitocondria y daño directo al ADN y a sus mecanismos de reparación, originándose una alteración en la función de las células y aumentando la apoptosis, es decir la muerte de los tejidos. Este fue el fundamento de que existiera la teoría de la restricción calórica como mecanismo de antienvjecimiento ^{26,34} Se ha descrito en diferentes comunidades representativas de longevidad excepcional que la restricción calórica es un fenómeno que puede ocurrir y puede llegar a mejorar la expectativa de vida. En la comunidad de Okinawa se ha observado que la ingesta de alimentos está reducida en un 30% cuando se compara con población occidental. En ellos se ha observado que existe una disminución en la producción de radicales libres lo que pudiera condicionar que esta población alcance una edad mucho mayor y en buenas condiciones ³⁴ Por estos estudios se propuesto que la mejoría de la dieta donde hay restricción en el consumo de proteínas, aumento en el consumo de antioxidantes naturales, pescado , aceites y disminución en las grasas de origen animal puede condicionar disminución en la producción de radicales libres, por lo tanto disminución en el estrés oxidativo y mejoría en los mecanismos de reparación al ADN. ³⁴

Por este motivo se ha hecho cardinal desde hace más de 30 años el estudio de los mecanismos de envejecimiento, y en últimas fechas , siendo que ha aumentado tanto la expectativa de vida , el estudio de la longevidad.

La mayor parte de los estudios inicialmente se hicieron in vitro, posteriormente in vivo en animales y en últimas fechas se han hecho en humanos. Un par de estudios han demostrado que en las especies longevas existe una mayor resistencia al estrés oxidativo y bajos niveles de ERO. Razón por la cual se ha sugerido que la restricción calórica extiende la vida de muchos organismos a través de la disminución en la producción de ERO, teoría que se ha propuesto que prolonga la vida y retarda el envejecimiento.^{7,17}

Existen múltiples investigaciones en donde se identificó que la edad es directamente proporcional a la acumulación de daño oxidativo en moléculas críticas como el ADN, induciendo la muerte celular, senescencia y con ello la pérdida funcional de los órganos.⁷ Como marcador de daño oxidativo se ha utilizado a la 8 oxoguanina que es un subproducto del daño oxidativo, sus niveles correlacionan con el daño al ADN. En la Figura 1. podemos observar la producción extracelular e intracelular de 8 oxoguanina.

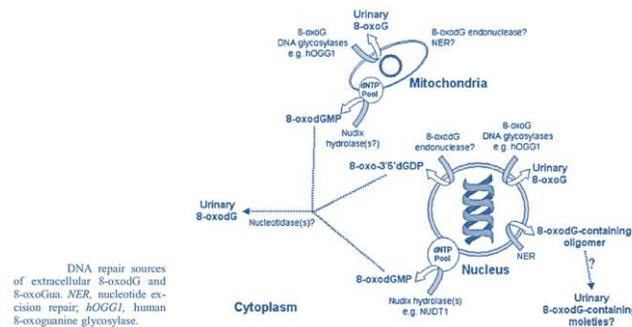


Figura 1. Producción intra y extracelular de 8 oxoguanina (7)

La acumulación de daño por medición de 8 oxoguanina se ha evaluado en ratas y se ha observado que ésta condiciona mutaciones puntuales.¹⁵ Mientras que la pérdida del balance oxidativo se puede evaluar por la disminución en la actividad

de las enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, ceruloplasmina, peróxido de glutatión) ¹⁷

Para que la célula se mantenga estable y conserve la homeostasis, los mecanismos de reparación del ADN deben ser eficientes. Entre los más importantes encontramos (a) la reparación de escisión de bases que actúan a nivel de la deaminación, depurinación y depirimidación, este es el tipo de reparación que ocurre más comúnmente en el tejido nervioso y (b) la reparación de escisión de nucleótidos que responde ante alteraciones que comprometen la tridimensionalidad del ADN y que pueden bloquear la transcripción ¹⁷

A medida que la célula envejece, la tasa de reparaciones del ADN disminuye hasta que el equilibrio de daño/reparación se inclina hacia el daño y la célula llega a la senescencia, la apoptosis, la carcinogénesis o cualquier otro tipo de muerte. ²¹

A partir de estas teorías se decidieron hacer estudios en donde se medía el daño que existe al ADN in vivo e in vitro. Una de las técnicas más utilizadas y que se encuentra validada para esto es la electroforesis unicelular o también llamado ensayo cometa.

El ensayo cometa es un método por el cual se detecta el daño oxidativo, mediante la medición de lesiones del ADN de cadena sencilla o de cadena doble. Las que primero se detectan son las de cadena sencilla, pero las más importantes son las de cadena doble, debido a que las primeras se reparan mediante escisión de bases o escisión de nucleótidos y las segundas son más difíciles de reparar. Este método es muy útil, sensible y específico para detección de daño, y es una herramienta útil para la epidemiología molecular. ⁵

Cómo ya hemos mencionado en el cuerpo existe un equilibrio entre la producción de estrés oxidativo y los mecanismos antioxidantes. Se debe mantener un nivel tolerable de radicales libres para que las defensas del cuerpo puedan prevenir el desarrollo de enfermedades. Cuando las defensas son insuficientes o se acumula niveles altos de daño oxidativo es muy común que encontremos una gran variedad

de enfermedades ⁵ Se ha descrito que la peroxidación de lípidos puede estar involucrada en la producción de placa ateromatosa que puede contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En pacientes con diabetes se ha descrito que la glicación de lipoproteínas de baja densidad contribuye al alto riesgo de desarrollo de arterioesclerosis. Las cataratas se asocian con la acumulación de daño oxidativo derivado de la exposición del cristalino a los rayos ultravioleta. De igual forma se ha hecho una asociación importante del daño oxidativo en relación al desarrollo de inflamación y a la presencia de cáncer. Se ha observado que en el lugar en donde hubo inflamación muy probablemente se desarrolle cáncer.

Otra asociación que se ha hecho es la presencia de daño oxidativo y el envejecimiento. Siendo una hipótesis atractiva se han hecho algunos estudios en donde se trata de comparar el daño y la reparación al ADN en diferentes grupos de edad y la correlación que tienen con la capacidad antioxidante. Se ha descrito ya que la acumulación de daño genera que los órganos se deterioren e inevitablemente tiendan a perder su funcionalidad. La evidencia que encontramos la mostramos a continuación.

Los primeros estudios que se realizaron fueron a partir de 1990. Se compararon 3 grupos de edad, 35-39 años, 54-59 años y el último de 65-69 años midieron el daño al ADN y capacidad de reparación mediante ensayo cometa y determinaron niveles de antioxidantes, en él se observó que en el grupo de mayor rango de edad había un porcentaje mayor de ADN dañado y menor capacidad de reparación ante el reto con peróxido de hidrógeno, mientras que los niveles de antioxidantes no tuvieron modificación ¹⁶

Posteriormente, se realizaron estudios de extensión en donde comparó un grupo de mayor rango de edad (75-79 años), y observó que el porcentaje de daño al ADN estaba disminuido y la capacidad de reparación estaba aumentada en este grupo al comparar con el grupo de 65-69 años, a partir de esto se concluyó que probablemente los ancianos que alcanzan una mayor expectativa de vida tienen mecanismos de reparación al ADN igual que los jóvenes.¹

Otros estudios hicieron la correlación entre los niveles antioxidantes y la presencia de daño y reparación al ADN, tratando de corroborar que a menor capacidad o defensa antioxidante, existen más daño al ADN, y en los estudios encontraron lo siguiente. En México se ha reportado que existe una asociación entre disminución de antioxidantes e incremento en el daño al ADN en sujetos hombres mayores de 70 años.^{14, 19} En otros estudios observaron que en un grupo de nonagenarios suizos existía una mayor capacidad antioxidante y el porcentaje de ADN dañado era mayor en comparación con un grupo de jóvenes de 40 a 60 años. Con esto se concluiría que a mayor edad sigue existiendo mayor cantidad de ADN dañado, pero hay una mejor capacidad antioxidante que podría contrarrestar el estrés oxidativo.¹⁹ Estos datos van de acuerdo a lo reportado¹³ en donde se observó aumento del daño en el ADN en el grupo de 75-82 años cuando lo comparó con otro de 20-35 años, pero cuando se inducía daño mediante peróxido de hidrógeno éste era mucho menor en el grupo de mayor rango de edad, de ahí concluyó que la capacidad de reparación al ADN debe ser mejor en los ancianos lo cual repercute en la disminución de células en senescencia o apoptosis y se aumenta la expectativa de vida.^{1,13,14}

La mayoría de los estudios reporta que el daño en el ADN aumenta progresivamente conforme transcurre la edad, pero cuando se induce daño ya sea con peróxido de hidrógeno o radiación gamma se genera menos daño en los grupos más añosos, dado que en ellos se reporta una mejor capacidad antioxidante, de ahí se pudiera sugerir que el paciente longevo (aquel que supera la esperanza de vida) tenga una mejor capacidad de reparación del ADN, debido a que probablemente tienen mejores mecanismos de reparación, lo que les permite llegar a edades más avanzadas.¹³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de todo lo que hemos expuesto se observa que desde hace más de 100 años se han tratado de describir los mecanismos que conducen al envejecimiento y en últimas fechas se ha otorgado gran importancia a los mecanismos antienvjecimiento. Para llegar a éstos últimos se ha utilizado la longevidad como una base para su estudio. Se han descrito algunas teorías que tratan de explicar los mecanismos que llevan a la longevidad. Entre las más importantes hemos mencionado la teoría de los radicales libres que se ha estudiado en diferentes grupos etarios. La teoría de los radicales libres implica el daño y la reparación al ADN que se ha descrito como factor desencadenante de múltiples enfermedades y de pérdida de la funcionalidad de los tejidos. A partir de esta teoría se han hecho estudios en donde se compara los mecanismos de daño y reparación al ADN en diferentes grupos etarios; se ha evidenciado que existe una predisposición al aumento del daño al ADN secundario a la exposición de factores intrínsecos y extrínsecos conforme pasa la edad, pero de igual forma se ha descrito en algunos estudios, no en todos que a mayor edad existen mejores mecanismos de reparación al ADN. Si bien contamos con estos estudios que nos muestran que el daño aumenta conforme aumenta la edad, no contamos con estudios confirmatorios de que los mecanismos de reparación sean mucho mejores en longevos excepcionales en comparación con adultos mayores.

Por lo tanto, nos planteamos esta pregunta. A partir de éstos estudios surge la siguiente pregunta de investigación: ¿El daño al ADN y sus mecanismos de reparación serán mejores en un grupo de longevos excepcionales en comparación con un grupo de adultos mayores?

JUSTIFICACIÓN

Para poder explicar los mecanismos de envejecimiento es necesario determinar los factores iniciales que pueden condicionar el mismo y es de vital importancia conocer los mecanismos moleculares. Debemos estudiar la relación entre el daño basal en el ADN, su sensibilidad en respuesta a un insulto genotóxico y su capacidad reparativa en diferentes grupos de ancianos categorizando a uno de ellos como longevos excepcionales. Y con ello corroborar la hipótesis de que la exposición a factores intrínsecos y extrínsecos son los que generan más daño al ADN a lo largo de la vida, pero a pesar de ello el grupo de longevos excepcionales constituye un grupo en donde los mecanismos de reparación están bien adaptados a los genotóxicos y a pesar de ellos tienen una mejor respuesta ante el estrés oxidativo.

OBJETIVOS

Objetivo primario

Determinar el grado de daño y la capacidad de reparación del ADN en un grupo de sujetos longevos excepcionales en comparación con un grupo de adultos mayores.

Objetivos secundarios

Identificar si existe una asociación entre la presencia de las comorbilidades y daño al ADN, capacidad de reparación del ADN.

HIPÓTESIS

El daño y la capacidad de reparación al ADN serán mayores en un grupo de longevos excepcionales en comparación con un grupo de adultos mayores.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio

Estudio experimental.

Población de estudio

Se incluyeron 12 sujetos distribuidos en los siguientes grupos de edad:

- (a) Seis sujetos de 60 a 75 años de edad (adultos mayores) seleccionados de forma no aleatoria y consecutiva evaluados durante los meses de marzo-junio de 2013, pareados con el grupo de longevos excepcionales por género y comorbilidades, cumpliendo los criterios de inclusión y exclusión.
- (b) Seis sujetos mayores de 95 años (longevos excepcionales) seleccionados de forma no aleatoria y consecutivamente evaluados durante el periodo de enero-mayo 2013.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

A. Inclusión

- a) Longevos excepcionales: hombres o mujeres con edad ≥ 95 años.
- b) Grupo de adultos mayores: hombres o mujeres ≥ 60 y ≤ 75 años.

B. Exclusión

- a) Pacientes que se encuentren en terapia intensiva.
- b) Aquellos con cualquier tipo de cáncer activo, excepto cáncer de piel.
- c) Que hayan recibido quimioterapia o radioterapia durante los últimos 3 meses.
- d) Uso regular de antioxidantes.
- e) Infectados con virus hepatitis B, C, VIH.
- f) Enfermedades autoinmunes concomitantes.

- g) Diabetes mellitus.
- h) Etilismo o tabaquismo actual.
- i) Toxicomanías.

DESARROLLO DEL ESTUDIO

Selección de muestra

La selección de grupos de longevos excepcionales fue identificada del archivo general del INCMSZ y de participantes externos. El procedimiento consistió en firma de consentimiento informado, posteriormente se realizaba una evaluación geriátrica global y se tomaba la muestra de sangre; el grupo control de adultos mayores se comparó con el grupo de longevos excepcionales por género y comorbilidades

A cada grupo se le aplicó un cuestionario donde se describieron características sociodemográficas, antecedentes personales patológicos y no patológicos, medición de funcionalidad mediante escala de Barthel, evaluación nutricional mediante escala de evaluación nutricional mínima (*Minimal nutritional assessment*)⁹ y el DNA de Payette (*Depistage Nutritionnel des Aînés*)³⁵ e índice de Charlson¹².

Recolección de muestra

Se tomaron 10 ml de sangre periférica mediante punción venosa. Se colocó la sangre en la primera capa de agarosa que se había preparado, posteriormente se coloca la segunda y se coloca la muestra. Las laminillas se refrigeran hasta que la capa solidifica.

Se ingresan las laminillas a solución de lisis. Una vez colocadas todas las laminillas se vierte el buffer hasta cubrir las laminillas. En este momento se inicia el conteo del tiempo de desenrollamiento, el cual fue de 20 minutos.

Al término de éste periodo, se inició el corrimiento de la electroforesis. Al término se agrega buffer Tris pH 7.5 y se incuban 1 o 2 veces por 5 minutos.

En el microscopio de fluorescencia se evalúan 50 nucleótidos por laminilla. Por otro lado, con la ayuda de un contador se determina la proporción de un total de 100 células, la cantidad de células con imagen de cometa, aunque sea muy cerrado con respecto a la de células con daño total o nubes.

En este caso el análisis se realizó al establecer categorías de daño con base a la longitud de las colas de los cometas y de la intensidad de fluorescencia. Estableciendo categorías 0-4, donde 0 son las menos dañadas y 4 las más dañadas.

Posteriormente se aplicó la fórmula: $UA = (\text{Porcentaje de células en categoría } 0 \times 0) + (\text{Porcentaje de células en categoría } 1 \times 1) + (\text{porcentaje de células en categoría } 2 \times 2) + (\text{Porcentaje de células en categoría } 3 \times 3) + (\text{Porcentaje de células en categoría } 4 \times 4)$

Para evaluar la capacidad de reparación se realizó ensayo cometa reto con el mismo procedimiento que durante la medición inicial de daño, sólo que en este caso se indujo un reto genotóxico que consiste en la aplicación de radiación gamma (2 Gy) por 50 segundos. Se midió el daño basal post-radiación y posteriormente a los 60 minutos.⁵

Se realizó el análisis al establecer categorías de daño con base a la longitud de las colas de los cometas y de la intensidad de fluorescencia. Estableciendo categorías de 0-4, donde 0 son las menos dañadas y 4 las más dañadas. Se obtuvo un promedio de ellas y a partir de ahí se obtuvo el número de cadenas dañadas con un rango de 0-400 en unidades arbitrarias para establecer como daño más de 100. A partir de ello obtuvimos el daño basal, el número de cadenas dañadas al exponer a un reto genotóxico y posteriormente se midió la capacidad de reparación mediante el mismo ensayo.

VARIABLES

Edad: Sujetos mayores de 95 años

Sujetos de 60-75 años

Sexo: Nominal, (mujer, hombre)

Escolaridad: Continua en años

Estado civil: Nominal (casado, viudo, soltero, unión libre, divorciado o separado)

Situación económica: Ordinal (Excelente, muy buena, buena, mala, muy mala)

Autopercepción de salud: Ordinal (Excelente, muy buena, buena, mala, muy mala)

Residencia: Nominal (Vivienda propia, asilo)

Medicamentos: Continua (Número total)

Actividades básicas de la vida diaria: Escala de Barthel¹⁸ Consideramos como puntaje 0-100; dependiente <50, parcialmente independiente 50-70, independiente >70

Examen mínimo del estado nutricional (MNA)⁹ Nominal. Con puntaje máximo de 30.

Teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

≥ 24 puntos: Normal

17-23.5: Riesgo de desnutrición

≤17 puntos: Desnutrición

Cuestionario para la detección de desnutrición en personas adultas mayores (DNA) Nominal³⁵

- 0-2 Puntos: Riesgo nutricional bajo
- 3-5 Puntos: Riesgo nutricional moderado
- 6-13 Puntos: Riesgo nutricional elevado

Índice de Charlson¹² Continua

Se consideran las enfermedades de acuerdo a un puntaje máximo de 10 puntos asignada a cada enfermedad. Consideramos como comorbilidad:

- Ausencia: 0-1 punto
- Baja: 2 puntos
- Alta >3 puntos

Daño al ADN: Continua, Medición de rompimientos de cadena sencilla; Unidades arbitrarias de 0-400; >100 representa daño

Daño al ADN al exponerlo a un reto genotóxico: Continua, inducción de rompimientos de cadenas de ADN por radiación gamma 2 Gy; Unidades arbitrarias de 0-400; >100 representa daño

Capacidad de reparación de ADN: Continúa, Posterior a (Reto cometa) a los 60 minutos; Unidades arbitrarias de 0-400; >100 representa daño

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La muestra se describió mediante medidas de tendencia central, utilizamos medidas no paramétricas, mediana y rango.

Para los análisis comparativos, se utilizaron pruebas no paramétricas tipo U Mann-Whitney o prueba exacta de Fisher, según el tipo de variables analizadas. Se consideró valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos. Para los cálculos se utilizó el programa SPSS V.19

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio queda clasificado como **investigación con riesgo mínimo** de acuerdo con el artículo 17, Título segundo, capítulo I, Sección II del Reglamento de la Leu General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Diario oficial de la Federación. Estudio previamente aprobado por el comité de ética con número de REF 810 (Anexo 1)

RESULTADOS

Se reclutaron un total de 6 longevos excepcionales y 6 controles en el periodo comprendido entre marzo a junio de 2013. El 66% fueron mujeres con una mediana de edad de 97 años y los controles de 70 años. En la Tabla 1 se presentan los datos sociodemográficos donde únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos a nivel de escolaridad, estado civil, y autopercepción de salud; sólo el 16% de los longevos refirió que tenía una buena percepción de salud. En cuanto a factores de exposición encontramos que el grupo de longevos excepcionales el 36% tiene exposición a humo de leña y el 8.3 % desarrolló neumopatía secundaria (Tabla 1).

Tabla 1.

Variables sociodemográficas: Comparación entre longevos excepcionales y adultos mayores

Variables sociodemográficas	Total	Longevos excepcionales	Adultos mayores	p
	n=12	n=6	n=6	
Edad, años, mediana (RI25-75)		97(3)	70(8)	<0.01
Mujer, n, (%)	66.04	83	50	NS
Escolaridad media, años, mediana	8	6	15	0.01
Estado Civil (%)				<0.01
Viudo	66.04	83	66	
Casado	8.3	16	0	
Situación económica (%)				NS
Buena	58.33	66.6	50	
Autopercepción de salud, buena, (%)	50	16	83	0.03
Residencia, vivienda propia (%)	75	100	50	NS

Cuando se hizo la comparación en cuanto a los antecedentes médicos únicamente encontramos diferencia significativa en el grupo de longevos excepcionales en donde predominaba la presencia de demencia (p 0.03) y en el grupo de adultos mayores dislipidemia (p 0.04). Y cuando hacemos el comparativo con índice de Charlson encontramos que existe diferencia significativa, siendo mayor en el grupo de longevos excepcionales (Tabla 2).

Tabla 2.

Antecedentes médicos: Comparación entre longevos excepcionales y adultos mayores

Antecedentes médicos	Total	Longevos excepcionales	Adultos mayores	p
	n=12	n=6	n=6	
Enfermedad renal crónica (%)	8.3	16	0	NS
Dislipidemia (%)	8.3	0	16	0.04
Hipotiroidismo (%)	16	16	16	NS
Hipertensión (%)	58	66	50	NS
EPOC* (%)	8.3	16	0	0.08
Cardiopatía isquémica (%)	0	0	0	NS
EVC** (%)	8.3	16	5	NS
Demencia (%)	8.3	16	0	<0.01
Historia de cáncer (%)	25	50	0	0.07
Índice de Charlson, mediana (RI25-75)	0(1)	0(1)	0(0)	<0.01
Uso de medicamentos mediana (RI 25-75)	3.26(2.26)	3.56	2.8	0.16

*Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**Enfermedad vascular cerebral

En cuanto a la valoración funcional encontramos que ambos grupos eran independientes (Tabla 3).

Tabla 3.

Funcionalidad: Comparación entre longevos excepcionales y adultos mayores

Funcionalidad	Total	Longevos excepcionales	Adultos mayores	p
	n=12	n=6	n=6	
Puntaje Barthel (%)				
Independiente	100	100	100	NS

El estado nutricional lo evaluamos mediante DNA y MNA para describir si existía desnutrición o riesgo de desnutrición. Nuestros resultados que mostraron diferencia estadísticamente significativa en comparación con los adultos mayores fueron los siguientes; utilizando MNA se observó que el 33% de los longevos excepcionales tenían riesgo de desnutrición y el 16% estaba desnutridos, en comparación con el grupo de adultos mayores que el 100% estaban sin riesgo de desnutrición, encontrando diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$. En cuanto al índice de masa corporal encontramos que la mediante fue de 23 kg/m² en comparación con los adultos mayores que estaba en 28.1 kg/m² mostrando diferencia significativa entre ambos $p 0.002$ (Tabla 4).

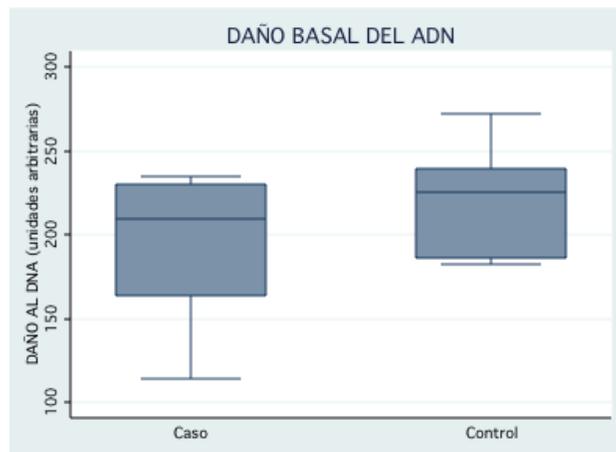
Tabla 4.

Estado Nutricio: Comparación entre longevos excepcionales y adultos mayores

Estado Nutricio	Total	Longevos excepcionales	Adultos mayores	P
	n=12	n=6	n=6	
Puntaje MNA (%)				<0.01
Riesgo de desnutrición	16	33.33	0	
Normal	75	50	100	
Desnutrición	8.3	16	0	
IMC, mediana, (RI25-75)	24.6(7.16)	23(5.17)	28.15(6.73)	0.01

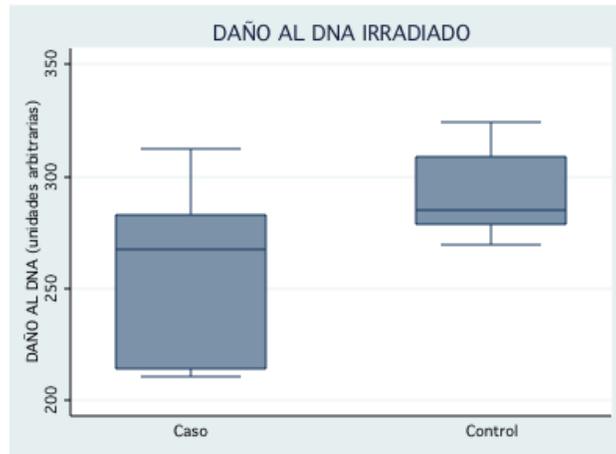
Para hacer la evaluación de nuestro objetivo primario se obtuvieron datos de 6 pacientes longevos excepcionales y 6 controles. Los resultados que encontramos se describen a continuación; al evaluar el daño basal al ADN mediante ensayo cometa observamos que todas las células muestran daño, se cuantifica un daño por arriba de 100 (unidades arbitrarias) en ambos grupos. Se describe el daño en 209.525 en los LE en comparación con 225.69 en el grupo de AM no existiendo diferencia significativa entre ellos con p 0.26 (Figura 1).

Figura 1.



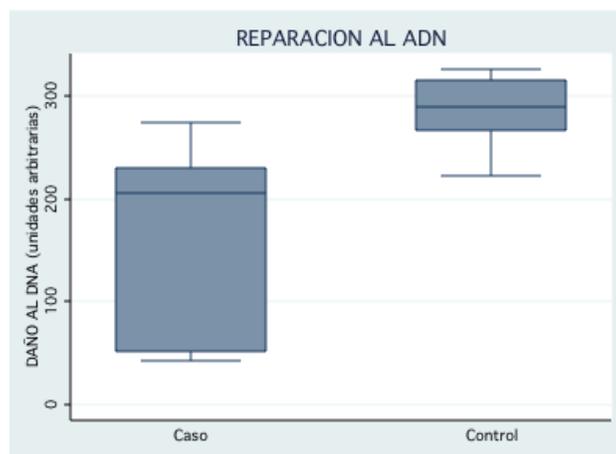
Cuando inducimos daño mediante un reto genotóxico como es la radiación gamma (factor extrínseco) observamos que aumenta el daño al ADN en ambos grupos, en los LE hasta 267.48 y el AM hasta 284.77, llegando a cuantificarse más del doble de daño, pero que no muestran diferencia significativa entre ambos grupos p 0.14 (Figura 2).

Figura 2.



En cuanto a los mecanismos de reparación del ADN encontramos las siguientes diferencias. A los 60 minutos que se midió el daño se encontró que en el grupo de longevos excepcionales el daño al ADN fue de 205.21, observándose que regresó al daño que se había descrito en el basal, en cambio, en el grupo de adultos mayores el daño es mucho mayor, hasta 289.925, casi igual al descrito en la post-radiación y no regresando al basal. Estos datos si representaron una diferencia significativa con p 0.01 (Figura 3).

Figura 3.



DISCUSIÓN

Dentro de nuestra muestra observamos que predominan las mujeres, probablemente al aumentar la muestra se sigan mostrando estos resultados en los longevos excepcionales por la epidemiología que ya se ha descrito en diferentes poblaciones.

Funcionalidad y comorbilidades

En cuestión de funcionalidad y comorbilidades en los centenarios también se ha descrito un perfil, existe retraso o se escapan de enfermedades asociadas a la edad. En nuestro estudio con una edad promedio de 97 años se observa que 66% de los longevos son funcionales en cuanto a actividades básicas y tienen un índice de comorbilidad bajo. En estudios previos se ha observado que a los 97 años 45% de las mujeres y 75% de los hombres aún son independientes. Como esperábamos estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de morbilidad de James Fries' que habla de que cuando se alcanza más allá de la expectativa de vida es frecuente que las enfermedades se presenten hasta los últimos años de vida y no condicionen discapacidad⁸, es decir, son personas como en nuestra población que en su mayoría se presentan sin enfermedades de gravedad o que comprometan su vida.²⁴

Se han descrito diferentes modelos para alcanzar la longevidad, uno de ellos es el que menciona Evert en donde se explican 3 formas que siguen las siguientes características: longevidad para supervivientes, aquellos que presentaron comorbilidades antes de los 80 años (38%); retrasados (43%), que presentan enfermedad después de los 80 años, y por último los que escapan (19%), aquellos que presentan enfermedad hasta después de los 100 años. En nuestro estudio observamos que casi el 50% de la población tienen un perfil de longevidad retrasada, presentaron enfermedades (hipertensión, enfermedad cardíaca, diabetes, enfermedad cerebrovascular, cáncer de piel, osteoporosis, tiroides,

enfermedad de Parkinson, enfermedad pulmonar obstructiva crónica) y ya que la parte de la muestra que tuvieron más de 100 años fueron los menos, únicamente uno desarrolló demencia hasta los 101 años y este es el que pertenece al grupo de los que escaparon de la enfermedad.

De acuerdo a lo visto en este estudio la mayoría de los longevos excepcionales tienen menos enfermedades y los que tienen enfermedades éstas no son graves

Desde hace más de 50 años se estableció como una de las teorías asociadas al envejecimiento la de los radicales libres y el estrés oxidativo.

Esta es la parte que interviene tanto en factores genéticos como ambientales. En un estudio en gemelos homocigotos y en otro en hermanos de longevos se ha descrito que el factor genético únicamente compone del 20-25% de la longevidad y el resto son factores ambientales.²⁵

Estado nutricional

Dentro de los factores ambientales que tienen un impacto muy alto sobre la longevidad se ha descrito el estilo de vida.^{11, 34}

En nuestra población podemos observar que en cuanto a los marcadores de desnutrición o riesgo de desnutrición se identifica lo siguiente: el índice de masa corporal (IMC) está dentro de los parámetros de normalidad para decir que nuestros pacientes longevos excepcionales están bien nutridos, aunque por índices de riesgo de desnutrición como el MNA observamos que el 33% de nuestra población tiene un riesgo de desnutrición leve y el 16% se encuentra desnutrido, encontrándose diferencia significativa ($p < 0.001$) con el grupo control. En cambio ellos tienen un IMC alto, encontrándose en sobrepeso y sin riesgo de desnutrición.

Siendo que se ha sugerido que la restricción calórica es una fuente de longevidad podríamos sugerir que siendo que nuestros longevos tienen un riesgo de desnutrición moderado, se podría decir que tienen restricción calórica y este pudiera ser uno de los condicionantes para que alcancen esta edad. Con la

restricción calórica se mejoran los mecanismos moleculares que condicionan daño al ADN, hay mejoría en cuanto a los mecanismos de reparación y disminución en la acumulación de daño de las células.

Para corroborar esto y poder hacer estudios de correlación y factores de riesgo deberíamos extender la muestra y llevarla a otras poblaciones.

Daño y reparación al ADN

Daño basal

Como pudimos observar en este estudio cuando medimos el daño basal mediante ensayo cometa ambos grupos superaba las 100 unidades, es decir, se detectaba daño. Pero no encontramos diferencia significativa a nivel de daño basal con $p = 0.262$. Se había descrito que el daño es progresivo conforme avanza la edad. Se ha descrito en estudios previos como el de Barnett, et al, que el daño al ADN aumenta conforme a la edad y es progresivo, entre más años, mayor exposición a factores intrínsecos y extrínsecos que condicionan daño al ADN.

Dentro del estudio inicial de Barnett se observó que en grupos de 35 a 39 años comparado con un grupo de 75 a 80 años el daño al ADN no tuvo diferencia significativa medida en el tiempo 0, es decir el basal ($p = 0.42$), en comparación con el grupo de 65 a 69 años en donde comparado con el grupo de 75-90 años si hubo una diferencia significativa $p = 0.012$. Estos resultados no los corroboramos con nuestra población ya que a nivel basal de daño al ADN no hubo diferencia significativa, una de las razones por la que pudo deber esto fue la edad y el tipo de población estudiada.^{1, 16} Esta misma información se corrobora en otros estudios,¹³ donde el número de cadenas dañadas aumentaba conforme a la edad cuando se comparaban grupos de 63-70 años contra el grupo de 75-82 años, aumenta el daño conforme a la edad, mostrando resultados significativos.

De acuerdo a nuestros resultados posiblemente con una muestra mayor tendríamos resultados diferentes, lo que nos indica únicamente es una tendencia, aunque la explicación para esto pudiera ser que nuestra población se ha descrito

que como en el estudio NONA ésta se comporta a nivel de daño al ADN como una población joven ^{1,16}

Daño inducido

Cuando se induce un daño directo con radiación para causar apoptosis se observa que si aumenta el daño, pero esto pasa en ambos grupos, casi alcanzando el mismo nivel. No existe diferencia significativa entre ambos grupos con $p = 0.149$. Podríamos decir que el daño es casi igual al de personas mucho más jóvenes. Lo que podríamos pensar sobre estos resultados es que el ADN de los longevos excepcionales muestra una resistencia importante ante el estrés oxidativo. Estos resultados fueron parecidos al estudio de Barnett en donde se observa el mismo nivel de daño cuando se comparaban sujetos de 75-80 años en comparación con sujetos jóvenes de menos de 40 años. ¹⁶

Reparación al ADN

Cuando describimos la reparación al ADN es donde en nuestro estudio se encontraron diferencias significativas con $p = 0.018$ entre ambos grupos. Éstos resultados apoyan nuestra hipótesis en donde como en el estudio NONA (Nonagenarians Study) ^{1, 14,16} se observan diferencias significativas en cuanto al daño postapoptosis entre dos grupos que van de 40 a 60 y de más de 90 años ($p = 0.039$). En este último estudio los autores mencionan que esto pudo deberse a que los niveles de antioxidantes en los LE estaban más elevados en comparación con la población joven, lo que pudiera condicionar disminución del estrés oxidativo. En nuestra población se muestra que los pacientes longevos excepcionales tienen una mejor capacidad de reparación al ADN y tienen la capacidad de regresar a su estado inicial de daño al ADN. Esto nos hace pensar que ellos a pesar de que han estado más tiempo expuestos a factores intrínsecos y extrínsecos que pueden dañar el ADN tienen menos producción de estrés oxidativo. Esto puede estar condicionado por diferentes factores como los que se observaron en nuestro estudio: menor desarrollo de enfermedades crónicas

degenerativas, un riesgo nutricional moderado, que puede hacernos pensar que tienen restricción calórica, factor que se ha mostrado que promueve la longevidad.

Para poder hacer una correlación entre la capacidad antioxidante que se ha descrito que esta disminuida en el paciente longevo lo que falta solamente es medir los niveles de antioxidantes para poder hacer la correlación con el daño al ADN, y con ello poder corroborar esta teoría.

Con nuestros resultados se observa que el daño al ADN no aumenta conforme a la edad, ya que en los longevos excepcionales el daño se mantiene estable. Pero también observamos que cuando se induce un daño (como fue la radiación en este caso) los mecanismos de reparación son mejores y pueden reparar rápidamente el ADN, a partir de estos resultados podríamos sugerir que ante un evento agudo (infecciones, trauma etc.) los longevos excepcionales tienen mecanismos de reparación muy importantes y adecuado y logran reparar el daño que se ha hecho al ADN y por ello mantenerlos en buenas condiciones.

Con estos resultados podemos corroborar que el daño basal no aumenta con la edad, pero cuando inducimos daño se puede observar que los longevos excepcionales tienen probablemente mejores mecanismos de reparación. Éstos resultados nos sirven para poder aumentar la muestra, esperando que los resultados sean los mismos.

CONCLUSIONES

El grupo de longevos excepcionales muestra daño basal al ADN sin diferencia significativa con el grupo de adultos mayores.

Cuando se induce un daño directo que condiciona apoptosis lo que se observa es que el ADN de los participantes longevos excepcionales muestra una resistencia importante ante el estrés oxidativo que condiciona este daño, no hay diferencia significativa con personas más jóvenes.

Sin embargo, los longevos excepcionales tuvieron una reparación al ADN más eficiente estadísticamente significativa en comparación con el grupo de adultos mayores.

De acuerdo a los resultados, este estudio da pie a que se puedan hacer estudios de extensión con una muestra más grande midiendo niveles de antioxidantes para poder hacer la correlación con el daño al ADN.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnett Y.A. King C.M An investigation of antioxidant status, DNA repairs capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutation Research* 1995;338:115-128
2. Borras C, Gambini J, Vina J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci* 2007;12:1008-1013
3. Chan Y.C, Suzuki M, Yamamoto DS. Dietary Collins A. Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 1997;375:183-193
4. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, McKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chron Dis* 1987; 40(5):373-383
5. Collins A. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mut Res* 2009;681:24-32
6. Evert J. Lawler E, Bogan H etal. Morbidity profiles of centenarians: Survivors, delayers and escapers. *J of Geron A: Biol sci and med sci* 2003;58A:232-237
7. Freitas A. Magalhaes J. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing *Mut Res* 2011;728:12-22
8. Fries JF, Aging, natural death, and the compression of morbidity. *NEJM*1980;303:130-135
9. Guigoz Y, Vellas B., Garry P., Assesing the nutritional status of the older person: The Mini Nutritional Assessment as part of the geriatric evaluation. *Nut Rev.* 1996;54:S59-S65
10. Jansen –Durr P Cell Death and Ageing –A question of cell type. *The sci wor j* 2002;2:943-948
11. Havemans-Nies A, De Groot LP, Burema J, Cruz JA, Osler M, Van Staveren WA. Dietary quality and lifestyle factors in relation to 10 year mortality in older Europeans: the SENECA study. *An J Epide* 2002;156:962-968

- 12.Hensurd D. Nutrition screening and assessment. *Med Clin of N Amer* 1999;83:1525-1546
- 13.Humphreys V. Collins A. Age related increases in DNA repair and antioxidant protection: A comparison of the Boyd Orr Cohort of the elderly subjects with a younger population sample *Age and ageing* 2007;36:521-526
- 14.Hyland P. Duggan O. et al. Nonagenarians from the Swedish NONA immune study have increased plasma antioxidant capacity and similar levels of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells compared to younger control subjects. *Gerontology* 2002;37:465-473
- 15.Kaneo T, Matsuo Mitsuyoshi, Tahara Shoichi. Non linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging *Mutation Research* 1996;316:277-285
- 16.King CM, Barnett Y.A. et al In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and ADN repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75- to 80-years-old humans. *Mutation Research* 1997;377:137-147
- 17.Lombard D. et al , DNA repair, genome stability and aging *Cell* 2005;120:497-512
- 18.Mahoney F. Barthel D Functional evaluation : The Barthel Index *Md State Med J* 1965;14:61-65
- 19.Mendoza–Nuñez V Total antioxidant levels, gender, and age as a risk factors for DNA damage in lymphocytes of the elderly *Mechanisms of aging and development* 2001;122:835-847
- 20.Monti D , Franceschi C. Salvioli S. Decreased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly and centenarians *Mechanisms of aging and development* 2000;121:239-250
- 21.Mutlu-Türkoglu Ümit , Uysal Müjdat, et al Age increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects *Clinical biochemistry* 2003;36:397-400

22. Ostling K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1984; 123 (1):291-298
23. Passos J, Zglinicki T, Saretzki G. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Research* 2007; 35(22):7505-7513
24. Pearls T, Kunkel L, Puca A. The Genetics of exceptional human longevity. *J. Am Geriatr Soc* 2002;50:359-368
25. Richmond R, Law J, KayLamb F. Morbidity profiles and lifetime health of Australian centenarians *Australian Journal of ageing* 2012;31(4):227-232
26. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996;273:59-63
27. Rouse J, Jackson P. Interfaces the detection , signaling, and repair of DNA damage *Science* 2002;297:547549
28. Sohal RS. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clin Exp Res* 1993;5:3-17
29. Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging; a unifying hypothesis. *Exp Ger* 1990;25:499-522
30. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004;429:417–423
31. Viña J, Borras C, Pallardó F. Mitochondrial theory of aging: Importance to explain why females live longer than males. *Antioxidants & redo signaling* 2003;5:549-556
32. Viña J, Borrás C, Gambini J. Why females live longer than males : control of longevity by sex hormones *Sci Aging Knowledge Environ* 2005;23:pe17
33. Viña J, Sastre J, Pallardó FV. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Radic Res* 2006;40(12):1359-1265

34. Willcox ,DC, Willcox BJ, Todoriki H, Curb JD, Suzuki M Caloric restriction and human longevity ; what can we learn from the Okinawan's? *Biogerontology* 2006;7:173-177
35. Hensrud D. Nutrition screening and assessment. *Medical Clinics of North America* 1999;67:387-389

ANEXO 1

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:
DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN EN UN GRUPO DE LONGEVOS EXCEPCIONALES EN
COMPARACIÓN CON UN GRUPO DE ADULTOS MAYORES
(FEBRERO 2013)**

Investigador principal: Emilio José García Mayo

Dirección del investigador: Vasco de Quiroga # 15 Col Sección XVI. Del Tlalpan
CP 14000 México D.F.

Teléfono de contacto del investigador (incluyendo uno para emergencias): 56299800 Ext 5706

Investigadores participantes:

Elizabeth Paredes Salomón: Médico Internista. Residente primer año de Geriátría
Emilio Rojas del Castillo: Investigador titular C Departamento de medicina
genómica y toxicología ambiental UNAM Instituto de Investigaciones biomédicas
Mahara Angélica Valverde Ramírez: Investigador titular A asociado.
Departamento de genómica y toxicología UNAM Instituto de Investigaciones
Biomédicas

Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación: Febrero
2013

INTRODUCCIÓN:

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios que esto implica, con el fin de tomar una decisión informada. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al terminar de leer este documento se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o

intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado Sr. (a)_____

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición le invitan a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo determinar el daño y capacidad de reparación del ácido desoxirribonucleico o también llamado ADN, siendo este el que contiene todas las instrucciones genéticas que influyen en el desarrollo. Se hará la evaluación en tres grupos uno de longevos excepcionales y se comparara con un grupo de adultos mayores y otro de jóvenes.

El número aproximado de participantes será de 90 sujetos, divididos en 3 grupos. Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características: ser un sujeto mayor de 95 años o encontrarse entre los grupos de edad que van de 20-40 años y de 60-75 años

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Evaluación geriátrica y toma de muestras de sangre para obtención de material genético.

Su participación en el estudio consiste en: Deberá responder a las preguntas relacionadas a datos sociodemográficos, historial de enfermedades, medicamentos que toma actualmente y evaluaciones específicas del servicio de geriatría en caso de ser un sujeto geriátrico (de más de 70 años)

Posteriormente le pediremos que done una muestra de sangre de aproximadamente de 30 ml (menos de 2 cucharadas) para que los científicos hagan pruebas del ADN y medición de antioxidantes y otros componentes que tienen que ver con la longevidad.

Si el espécimen de sangre no es suficiente en cantidad y calidad, podría pedírsele que se repita la obtención de muestra de sangre.

Se calcula que la evaluación y la toma de muestra serán de menos de 1 hora. La evaluación y muestra se harán en las consultas programas de los sujetos y en caso de que esto no sea posible y al vivir en la zona metropolitana harán visitas domiciliarias para la evaluación y toma de muestra.

La muestra de sangre se usará para el análisis del ADN y medición de marcadores bioquímicos que puedan prolongar la vida. Los resultados de las pruebas no se le darán debido a que la información sólo es útil para investigación y no es diagnóstico. La participación en este estudio de investigación no es un sustituto para la atención médica habitual.

Este estudio puede tener extensión para medición de genes y se le puede llamar para hacer un seguimiento en un periodo de 2 años

La alternativa de este estudio es negarse a la participación.

La información recolectada para la investigación y la muestra de sangre se guardarán durante los siguientes años para estudios de extensión y para el análisis y el seguimiento. Por lo tanto nos está permitiendo acceso a esta información indefinidamente y el almacenaje de su muestra de sangre indefinidamente.

El beneficio de la investigación no será directo para usted, la razón por la que pudiera querer participar es ayudar a los investigadores a hacer descubrimientos que podrían beneficiar a otras personas en el futuro.

No existe costo monetario para usted, los costos de visitas domiciliarias y análisis de las muestras serán cubiertas por los investigadores y la institución.

El único riesgo del estudio es la formación de hematoma en el sitio de punción

La información obtenida únicamente se revisará por el investigador y subinvestigadores. Todos los proyectos de investigación se revisan por un comité de supervisión antes de que se permita que los investigadores usen la información o muestras almacenadas. Los colaboradores no recibirán información de identificación personal. Las muestras se manejarán por un número y no por nombre o expediente. Su nombre e información personal será retirada y guardada en un archivo por separado. Se mantendrán privados los expedientes de estudio que lo identifiquen. Para salvaguardar su privacidad, su información genética se mantiene en una base de datos por separado de su información médica personal

En caso de que ocurra una complicación posterior a la punción puede llamar a los siguientes contactos para cualquier duda o aclaración

Investigador principal Dr. Emilio García Mayo. 5487 0900 ext 5706

Subinvestigador Dra. Elizabeth Paredes Salomón 5487 0900 ext 5701

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas me han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas, muestra de sangre para obtención de ADN para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere colectar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
g. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo al participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no cumplió con los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Declaración del paciente:

Yo, _____
 declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto _____. Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el coordinador del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Carlos A. Aguilar Salinas. Teléfono: 54870900 ext 2318 o 2321). He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer

preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Nombre del Participante Firma del Participante Fecha

Coloque su huella digital si no sabe escribir

Nombre del representante legal Firma del representante legal
Fecha
(si aplica)

Nombre del Investigador Firma del Investigador Fecha
que explicó el documento

Nombre del Testigo 1 Firma del Testigo 1 Fecha
Relación con el participante:

Dirección: _____

Nombre del Testigo 2 Firma del Testigo 2
Fecha



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

MÉXICO, D.F., A 18 DE FEBRERO DE 2013.

DR. EMILIO JOSÉ GARCÍA MAYO
INVESTIGADOR PRINCIPAL
SERVICIO DE GERIATRÍA
PRESENTE

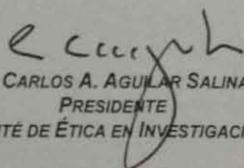
Por este medio, me permito informarle que la Comisión de Ética en Investigación, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, **ha revisado y aprobado** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

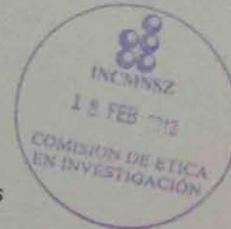
**“DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN EN UN GRUPO DE LONGEVOS EXCEPCIONALES EN
COMPARACIÓN CON UN GRUPO DE ADULTOS MAYORES Y JÓVENES”**
REF. 810

La vigencia de la aprobación termina el día 18 de febrero de 2014. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

Sin más por el momento quedo de Usted.

ATENTAMENTE,


DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Investigación Rubén Lisker Y., Director de Investigación.
C.P. Martha Arredondo Urzúa, Jefe del Depto. C.F.E.I.

Tradición Servicio
CAAS/MRG
Asistencia Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

20007700