



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DAÑO AL ADN Y CAPACIDAD DE REPARACIÓN EN
ADULTOS MAYORES CON HIPERTENSIÓN
ARTERIAL & DIABETES MELLITUS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA**

Héctor Hugo Pérez Magallanes

**Director de tesis: Dra. Raquel Retana Ugalde
Asesor de tesis: Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez**

Agosto, 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

Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN308411).

A todas las personas que con su tiempo y trabajo contribuyeron a la realización de esta investigación, que me permitió fortalecer mi aprendizaje.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde, quien dedico mucho tiempo y esfuerzo en la elaboración de esta tesis, y quien me fue guiando paulatinamente para que este trabajo sea digno de exponerse ante la comunidad científica.

Al Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez, que con sus observaciones, correcciones y la confianza brindada me permitieron realizar este trabajo de la manera seria y formal que a merita.

A la Dra. Mirna Ruiz Ramos, que siempre me brindó su apoyo y paciencia en laboratorio, además de sus puntuales observaciones en la revisión de la investigación.

A mis sinodales, El Dr. Rubén Marroquín Segura y la Mtra. Leonor Aguilar Santelises, gracias por sus correcciones y recomendaciones, así como a la Dr. Juana Rosado Pérez, quien me ayudo con la técnica de ELISA.

Y finalmente a mis amigos que siempre estuvieron conmigo y me apoyaron en todo momento, para la parte experimental de este proyecto: QFB Gie Bele García Discua, a la M. en C. Beatriz Hernández Monjaraz y al QFB Carlos E. García Águeda.

DEDICATORIAS

Infinitamente a Dios

Por dejarme llegar hasta este punto, por haberme dado salud y ecuanimidad para realizar mis sueños y objetivos, y que su infinito amor me ha mantenido de pie frente la adversidad.

A mis Padres

Don Alejandro y Doña Isabel, que con su gran amor, me han guiado por el buen camino, sus consejos y su incondicional apoyo, han hecho de mi lo que ahora soy, los amos padres míos.

A mi hermano

Marco Alejandro, gracias hermano, hay una frase que siempre recordare de ti, *“las cosas se hacen bien, o sino no se hacen”*, te amo hermano, aunque me hagas enojar.

A mis amigos.

Gie Bele sabes que eres infinitamente especial para mí, todas las pláticas que tuvimos y el apoyo que me has dado, me han fortalecido, te quiero como a nadie. Carlos amigo mío gracias por tu apoyo y consejos no ha sido fácil pero los amigos están en la buenas y en las malas, Bety tienes un lugar especial y privilegiado en mi corazón, tu amistad ha sido de lo más maravillosa que he tenido y espero que perdure por la eternidad, Priscila, Wendy y Nallely, que fueron parte de todo este proyecto y que conocí en la unidad de investigación, me dejan un buen sabor de boca, encontrar a chicos tan sorprendentes que tienen tantas ganas de superarse a sí mismos.

A todos mis amigos que no estuvieron conmigo físicamente pero que me apoyaron en la distancia con sus consejos y dándome ánimos, Tania, América, Susana, Patricia, y no menos importante mi primo Carlos que siempre me apoyado en todas mis locuras, gracias hermano.

Contenido

I.	RESUMEN.....	10
II.	INTRODUCCION	11
III.	MARCO TEORICO	14
3.1	Envejecimiento.....	14
3.2	Ciclo vital humano.....	15
3.3	Transición demográfica	16
3.4	Transición epidemiológica	17
3.5	Enfermedades crónicas no transmisibles.....	20
3.6	Diabetes mellitus.....	21
3.7	Hipertensión arterial.....	24
3.8	Estrés oxidativo.....	25
3.9	Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad.....	28
3.10	Diabetes mellitus y estrés oxidativo	29
3.11	Hipertensión arterial y estrés oxidativo.	34
3.12	Biomarcadores del daño oxidativo	36
3.12.1	Daño a lípidos.....	36
3.12.2	Daño a proteínas	37
3.12.3	Daño al ADN.....	37
3.12.4	Daño oxidativo al ADN	46
3.13.5	Biomarcadores de oxidación del ADN	54
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	63
V.	HIPÓTESIS	65
VI.	OBJETIVO	66
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	67
7.1	Tipo de estudio	67
7.1.2	Universo de estudio	67
7.1.3	Criterios de inclusión	67
7.1.4	Consideraciones éticas	67
7.2	Variables	68
7.2.1	<i>Clasificación</i>	68

7.2.2	<i>Operacionalización</i>	69
7.3	Técnicas.....	71
7.3.1	<i>Biometría hemática</i>	71
7.3.2	<i>Química sanguínea</i>	71
7.3.3	<i>Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa</i>	72
7.3.4	<i>ELISA 8-OHdG</i>	75
7.3.5	Análisis estadístico	80
VIII.	RESULTADOS	81
IX.	DISCUSION.....	88
X.	CONCLUSIONES.....	95
XI.	PERSPECTIVAS	96
XII.	REFERENCIAS	97
XIII.	ANEXO	102

Abreviaturas

EOx	Estrés Oxidativo
8-OHdG	8-Hidroxi Deoxiguanosina
DM 1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM 2	Diabetes Mellitus tipo 2
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
CONAPO	Consejo Nacional de Población
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
DMID	Diabetes Mellitus Insulino Dependiente
DMNID	Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente
NOM	Norma Oficial Mexicana
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
AO	Antioxidantes
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
AM	Adultos Mayores
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenina Trifosfato
G3PDH	Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa
PARP	Poli polimerasa de ADP ribosa
ADP	Adenina Difosfato
G3P	Gliceraldehído-3 Fosfato
NAD+	Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidada
NADPH	Nicotin-Adenin-Dinucleotido Fosfato Reducido
AGEs	Productos Finales de glucosilación no enzimática
CMLV	Células del Musculo Liso Vascular
Ang II	Angiotensina II
GTPasa	Guanosin trifostasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC-EC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector Electroquímico
LC-MS	Cromatografía de Líquidos Acoplado a Masas
GC-MS	Cromatografía de Gas acoplado a Espectrometría de Masa
CPD	Dímeros de Ciclobutano-pirimidina
ERNs	Especies Reactivas del Nitrógeno
HbA1c	Hemoglobina Glucosilada
LPO	Lipoperóxidos
SOD	Superóxido Dismutasa
GPx	Glutación Peroxidasa
CAT	Capacidad Antioxidante Total

PCR	Proteína C Reactiva
ELISA	Inmunoensayo Ligado a Enzima
ANOVA	Análisis de Varianza
RM	Razón de Momios
IC	Intervalo de Confianza
RL	Radicales Libres
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
MDA	Malonaldehído
UV	Ultra Violeta
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
NADH	Nicotin Adenin Dinucleótido Reducido
GAPDH	Gliceraldehído -3 fosfato deshidrogenasa
TAS	Tensión Arterial Sistólica
TAD	Tensión Arterial Diastólica
EDTA	Ácido Etilendiamintetracético
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad

Índice de cuadros y figuras.

Cuadro III.1 Principales causas de mortalidad en edad posproductiva (>65 años) en la República Mexicana, 2008.

Cuadro III.2 Clasificación Diabetes Mellitus

Cuadro III.3 Clasificación de la Hipertensión Arterial Sistémica

Cuadro III.4 Enfermedades vinculadas con el estrés oxidativo.

Cuadro III.5 Principales estudios referentes al daño al ADN y 8-OHdG

Cuadro VII.1 Operacionalización de las variables

Cuadro VIII.1 Parámetros bioquímicos, hematológicos y clínicos por grupo

Cuadro VIII.2 Migración por daño al ADN por grupos

Cuadro VIII.3. Frecuencia de daño al ADN por grupos

Cuadro VIII.4 Excreción urinaria de 8-OHdG por grupos

Figura III.1 Proyecciones de Población 2000-2050

Figura III.2 Ilustración simplificada de las relaciones entre EROs y los Antioxidantes.

Figura III.3 Tipos de daño al ADN.

Figura III.4 Formación de la 8-OHdG.

Figura III.5 Mecanismo propuesto para la oxidación de la 8-OHdG

Figura VII.1 Diagrama de seguimiento de los pacientes durante el estudio

Figura VII.2 Criterios de evaluación de daño al ADN

Figura VIII.1 Porcentaje de sujetos de células con daño por grupos

Figura VIII.2 Concentración de la excreción urinaria de 8-OHdG por grupos

I. RESUMEN

Introducción: El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio entre las moléculas de alto potencial oxidante derivadas del oxígeno conocidas como radicales libres (RL) y los sistemas antioxidantes, siendo un fenómeno transitorio que ocurre por el metabolismo normal, sin embargo se señala que durante el envejecimiento se intensifica por incremento de RL o deficiencia de los sistemas antioxidantes, la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) es uno de los marcadores más comúnmente utilizados para evaluar la capacidad de reparación de daño oxidativo del ADN. Lo que se traduce en daño al ADN con alteraciones en los mecanismos de reparación del mismo, provocando una predisposición a enfermedades crónico-degenerativas, entre los que destacan por su alta prevalencia la hipertensión arterial y la diabetes mellitus.

Objetivo: Determinar la frecuencia y grado de daño oxidativo al ADN así como la capacidad de reparación en adultos mayores con diabetes mellitus o hipertensión arterial.

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio transversal comparativo en una muestra de 207 adultos mayores: (i) 68 clínicamente sanos, (ii) 78 con hipertensión arterial y (iii) 61 con diabetes mellitus. El daño al ADN se midió por la técnica del ensayo cometa, los niveles de 8-OHdG se midieron por ELISA competitivo (Trevigen). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa SPSS V.15, aplicando como pruebas de comparación X^2 , ANOVA y, razón de momios (RM) e intervalo de confianza al 95% para cálculo de riesgos.

Resultados: El 59% del grupo de diabéticos y el 53% de los hipertensos presentaron daño oxidativo al ADN, en contraste con el 31% del grupo de ancianos sanos. Al evaluar a la diabetes como factor de riesgo de daño al ADN se encontró una RM de 3.2 (IC_{95%}, 1.6–6.7, $p < 0.05$). Asimismo, para la hipertensión arterial la RM fue de 2.5 (IC_{95%}, 1.3–4.9, $p < 0.05$). En cuanto a los niveles excreción de 8-OHdG, como marcador de reparación del ADN, se observó una disminución más acentuada en el grupo de hipertensos (sanos, 154.89; diabéticos 139.27; hipertensos, 118.98nM), cuya diferencia estadística fue limítrofe ($p = 0.06$).

Conclusiones: Nuestros hallazgos sugieren que la diabetes mellitus y la hipertensión arterial causan daño oxidativo al ADN y fisiopatológicamente afectan la capacidad de reparación, apoyando la propuesta de indicar suplementos antioxidantes como parte del tratamiento de la diabetes mellitus y la hipertensión arterial en la vejez.

II. INTRODUCCIÓN

Actualmente el proceso de envejecimiento ha tomado gran relevancia por tratarse de un proceso irreversible, progresivo, intrínseco y universal. De esta manera el envejecimiento es multifactorial, caracterizado por un desequilibrio homeostático provocado por los cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y psicológicos, que con el tiempo se presenta en todos los seres vivos a consecuencia de la interacción de la genética del individuo y su medio ambiente.

Por otro lado, el estrés oxidativo (EOx) es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y la capacidad antioxidante de las células con presencia excesiva de radicales libres (RL), lo cual con lleva a un daño a biomoléculas, lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Debido a que el ácido desoxirribonucleico (ADN) es de suma importancia en la información genética de un individuo, ha tomado importancia en el daño oxidativo que presenta y su relación con el envejecimiento, así como en el caso de las enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial.

Al respecto, se ha demostrado ampliamente que la hiperglucemia, tanto intracelular como extracelular, genera una mayor producción de radicales libres (RL), con ello se incrementa el daño por estrés oxidativo (EOx). El EOx es el promotor del desarrollo de las múltiples complicaciones asociadas a la diabetes mellitus (DM), así mismo el EOx está involucrado en la apoptosis (muerte celular programada) de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans y la

resistencia a la insulina, que se observan en la DM1 y la DM2, respectivamente. Al existir un producción elevada de RL que se producen excesivamente en la mitocondria cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta durante la fosforilación oxidativa. Estos RL ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena del DNA.

En el sistema cardiovascular, las especies reactivas de oxígeno (EROs) desempeñan un papel fundamental fisiológico en el mantenimiento cardiaco y vascular en la integridad de este, así como una disfunción asociada en condiciones tales como la hipertensión y la diabetes. La hipertensión es un factor de riesgo para muchas otras enfermedades vasculares como la aterosclerosis y la apoplejía. El desequilibrio provocado por producción de los EROs en la hipertensión arterial puede llevar un estado de estrés oxidativo, debido en gran medida, al exceso de O_2^- y la disminución de la liberación de NO (óxido nítrico) en la remodelación cardiovascular y en la vasculatura del riñón, mediado por los EROs.

Debido a la importancia en el aumento de adultos mayores en las próximas décadas en México y que muchos de ellos cursan con diabetes mellitus y/o hipertensión arterial, es importante encontrar mecanismos que permitan el control de las personas en la adultez, como podría ser el caso del ejercicio físico que contribuye a disminuir los efectos del envejecimiento y proporcionar beneficios en diferentes funciones.

Finalmente existen pocos estudios realizados sobre el tema, por lo que el presente estudio tiene como objetivo relacionar el daño al ADN y la capacidad de reparación en adultos mayores con hipertensión arterial & diabetes mellitus.

III. MARCO TEORICO

3.1 Envejecimiento

El envejecimiento lo definimos como un “proceso gradual y adaptativo, caracterizado por una disminución relativa de la respuesta homeostática, debido a las modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, propiciadas por los cambios inherentes a la edad y al desgaste acumulado ante los retos que enfrenta el organismo a lo largo de la historia del individuo en un ambiente determinado”. Es importante resaltar que el envejecimiento es un proceso multifactorial que involucra mecanismos biológicos, psicológicos y sociales, de ahí que su aparición y evolución sea individualizada. ¹

En la Unidad de Investigación en Gerontología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, considerando las evidencias científicas hemos definido al envejecimiento *como un proceso gradual y adaptativo, caracterizado por una disminución relativa de la respuesta homeostática, debida a las modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, propiciadas por los cambios inherentes de la edad y al desgaste acumulado ante los retos que enfrenta el organismo a lo largo de la historia del individuo en un ambiente determinado.* ¹

Acorde con el ciclo vital humano se ha establecido que el envejecimiento se inicia después de alcanzar la madurez biológica, psicológica y social, y no desde la concepción del nacimiento. Asimismo, después de la niñez, durante la adultez ocurre un proceso de consolidación psicobiológica que empieza a declinar en

términos generales a partir de la quinta década de la vida (aproximadamente a los 45 años), de ahí que se acepte que a partir esa etapa se inicia el proceso de envejecimiento o senescencia. ¹

3.2 Ciclo vital humano

Durante el ciclo de vital humano se presentan 4 fases bien delimitadas, cuya respuesta y carga alostática son diferentes. Al respecto, bajo el enfoque de la influencia del tiempo se ha señalado de manera errónea que el envejecimiento se inicia desde la concepción, no obstante, desde el punto de vista estructural y funcional, es inadecuado suponer que el embrión y después del nacimiento el niño cursa por un proceso de envejecimiento, cuando realmente los cambios que presenta están encaminados hacia el desarrollo morfológico, fisiológico y mental, el cual se alcanza al final de la adolescencia y se consolida en la adultez. Por tal motivo resulta ilógico, hablar de desgaste o envejecimiento en la niñez cuando no se ha alcanzado el máximo de desarrollo. ²

- 1) La fase de desarrollo se inicia desde la concepción y culmina en promedio alrededor de los 25 años de edad (segunda década), durante la cual se alcanza el nivel estructural y funcional óptimo (máximo) del organismo. ²
- 2) La etapa de madurez que inicia después de los 25 años y termina en promedio alrededor de los 44 años (cuarta década) en cuya fase se consolida estructural y funcionalmente el organismo. ²

- 3) En términos generales se considera que el envejecimiento comienza en la cuarta década de la vida y finaliza con la muerte, aunque no debemos olvidar que su inicio y características de presentación son individualizadas. Al respecto la esperanza de vida al nacer promedio de los países desarrollados es de 80 años, por lo que, en general se acepta que la etapa de envejecimiento abarca de los 45 a los 80 años. ²

- 4) La etapa de longevidad máxima potencial abarca de los 81 a los 130 años. En esta fase se presenta una atrofia y disminución fisiológica gradual en todos los tejidos y órganos, caracterizada por un decremento de la respuesta homeostática, debido a la carga alostática que se acumula con el tiempo ²

3.3 Transición demográfica

El envejecimiento poblacional secundario a la transición demográfica, repercute en las causas de morbilidad y mortalidad de la población. En México hasta 1970 figuraban como principales causas de muerte las enfermedades infecciosas (Figura III.1), las cuales han sido sustituidas por las crónicas no transmisibles, de ahí que se señale que el país está cursando por una transición epidemiológica.¹

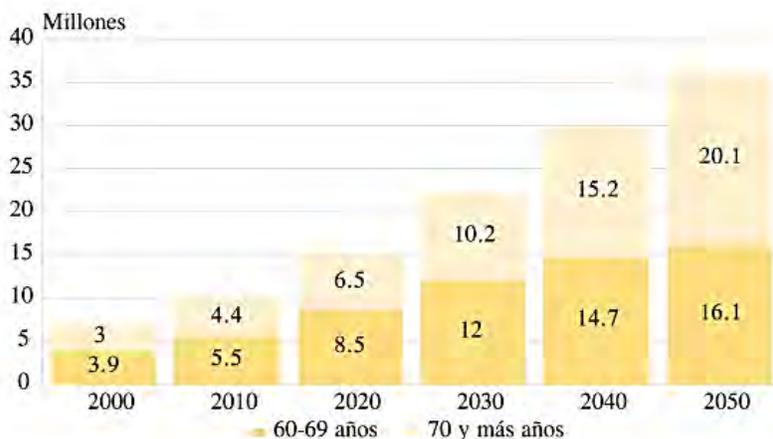


Figura III.1.Proyecciones de Población 2000-2050. Fuente CONAPO 2005 ³

3.4 Transición epidemiológica

El envejecimiento poblacional secundario a la transición demográfica repercute en las causas de morbilidad y mortalidad de la población. En México hasta 1970 las principales causas de muerte eran las enfermedades infecciosas, sin embargo al igual que en el resto del mundo han sido sustituidas por las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), de ahí que se señale que el país está cursando por una transición epidemiológica.

En este sentido las tres principales causas de muerte en los adultos mayores en México y de manera articular en población de 65 años o más, se encuentra la Diabetes mellitus, enfermedades isquémicas del corazón y enfermedad cerebrovascular. Cuadro III.1 ³

Por otra parte destaca la prevalencia de diabetes en los grupos de edad avanzada de 60 a 69 años con un 26.3% en mujeres y un 24.1% en hombres y en el grupo

de edad de los 70 a 79 años con un 27.4 y 21.5% en mujeres y hombres respectivamente.⁴

Además la prevalencia de hipertensión arterial en los grupos de edad de 60 a 69 años marca un 20.4% y en el grupo de 70 a 79 años un 25.1%. Entre las primeras causas de morbilidad figura la hipertensión arterial, con una prevalencia de 50% de los hombres a partir de los 60 años se presenta hipertensión arterial, mientras que, en las mujeres, la afección se presenta en casi 60% para el mismo periodo de edad.⁵

Cuadro III.1. Principales causas de mortalidad en edad posproductiva (>65 años) en la República Mexicana, 2008.

Orden	Descripción	Defunciones	Tasa*	%
	Total	292 027	4,880.2	100.0
1	Diabetes mellitus	37 509	626.8	12.8
2	Enfermedades isquémicas del corazón	37 380	624.7	12.8
3	Enfermedad cerebrovascular	20 327	339.7	7.0
4	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	16 514	276.0	5.7
5	Enfermedades hipertensivas	9 521	159.1	3.3
6	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	8 966	149.8	3.1
7	Infecciones respiratorias agudas bajas	8 161	136.4	2.8
8	Nefritis y nefrosis	6 323	105.7	2.2
9	Desnutrición calórico proteica	6 136	102.5	2.1
10	Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	4 653	77.8	1.6
11	Tumor maligno de la próstata	3 992	66.7	1.4
12	Tumor maligno del hígado	3 161	52.8	1.1
13	Tumor maligno del estómago	3 086	51.6	1.1
14	Anemia	2 370	39.6	0.8
15	Tumor maligno del páncreas	2 169	36.2	0.7
16	Tumor maligno del colon y recto	1 948	32.6	0.7
17	Demencia y otros trastornos degenerativos y hereditarios del Sist. Nervioso Central	1 862	31.1	0.6
18	Úlcera péptica	1 754	29.3	0.6
19	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	1 624	27.1	0.6
20	Enfermedades infecciosas intestinales	1 587	26.5	0.5
	Causas mal definidas	7 876	131.6	2.7
	Las demás	105 108	1,756.5	36.0

* Tasa por 100,000 habitantes. Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

3.5 Enfermedades crónicas no transmisibles

Las enfermedades crónicas no trasmisibles o incapacitantes son aquellas que comúnmente se adquieren por medio de estilos de vidas inapropiados, aunque siempre hay que considerar que existen factores genéticos de naturaleza hereditaria que concierne a estas condiciones. La diferencia entre una condición crónica y una infecto-contagiosa se fundamenta sobre el hecho de que las enfermedades no transmisibles crónicas no son transmitidas mediante el contacto personal. ⁶

Las enfermedades crónicas tienen las siguientes características:

- Comúnmente estas enfermedades toman un período de tiempo prolongado para que se desarrollen.
- Estas enfermedades ocasionan una destrucción progresiva de los tejidos.
- Interfieren con la capacidad del cuerpo para funcionar de forma óptima.
- Algunas enfermedades no transmisibles crónicas pueden prevenirse; es posible minimizar los efectos de alguna enfermedad. ²

3.6 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM), comprende a un grupo heterogéneo de enfermedades sistémicas, crónicas, de causa desconocida, con grados variables de predisposición hereditaria y la participación de diversos factores ambientales que afectan al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas que se asocian fisiopatológicamente con una deficiencia en la cantidad, cronología de secreción y/o en la acción de la insulina. Estos defectos traen como consecuencia una elevación anormal de la glucemia después de cargas estándar de glucosa e incluso en ayunas conforme existe mayor descompensación de la secreción de insulina. Estas enfermedades se acompañan, en grado variable, de complicaciones con compromiso de vasos sanguíneos pequeños (microangiopatía) que se manifiesta como retinopatía, nefropatía, etc.⁷

Existe aceleramiento en el proceso de aterosclerosis (macroangiopatía), con mayor predisposición a infarto del miocardio, a obstrucción de las arterias cerebrales y de los miembros inferiores. Son comunes las lesiones de la piel (dermopatía), nervios (neuropatía) y el cristalino (cataratas).⁷

Hay dos tipos de diabetes mellitus, la diabetes mellitus-insulino de dependiente (DMID) o tipo 1, que se inicia generalmente durante la juventud y la diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID) o tipo 2 (ver cuadro III.3), de inicio en la etapa adulta, siendo esta última la que observamos con mayor frecuencia en los adultos mayores y por lo tanto, será la que se aborde en este trabajo.⁷

La DM tipo 2 puede causar lesiones graves en diferentes órganos, tales como ceguera, insuficiencia renal, cardiopatía isquémica, enfermedad vascular cerebral, enfermedad vascular periférica con gangrena y amputación de miembros de miembros superiores o inferiores. El proceso fisiológico común de dichas complicaciones involucra el endotelio vascular de los órganos afectados que son dañados de forma irreversible por los siguientes mecanismos:

- Incremento en la concentración de glucosa extracelular y consecuente aumento en flujo hacia el interior de las células que no requieren la participación de la insulina.
- Aumento en el proceso de glucosilación no enzimática.
- Incremento en el EOX causado por la glucosilación y la auto-oxidación de la glucosa.⁷

Cuadro III.2. Clasificación Diabetes Mellitus

Dependiente de insulina (Tipo I)	No dependiente de insulina (Tipo II)	Relacionada con desnutrición	Otras
Diabetes mellitus lábil	Diabetes mellitus con obesidad o sin obesidad.	Dependiente de insulina	Neonatal
De inicio en la juventud	De inicio en la edad adulta.	No dependiente de insulina	No dependiente de insulina
Con tendencia a la cetosis	De inicio en la madurez. No cetósico. Estable		Glucosuria del embarazo, parto y puerperio Tolerancia a la glucosa alterada Diabetes renal Tolerancia a la glucosa alterada Hipoinsulinemia postquirúrgica

Tomado de: NOM-015- SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria.⁷

3.7 Hipertensión arterial

La Hipertensión Arterial Sistémica (HAS) se define como el padecimiento multifactorial caracterizado por el aumento sostenido de la Presión arterial sistólica, diastólica o ambas, en ausencia de enfermedad cardiovascular, renal o diabetes >140/90 mmHg, en caso de presentar enfermedad cardiovascular o diabetes >130/80 mmHg y en caso de tener proteinuria mayor de 1.0 g e insuficiencia renal > 125/75 mmHg. ⁸

Cuadro III. 3 Clasificación de la Hipertensión Arterial Sistémica

Categoría	Sistólica mmHg	Diastólica mmHg
Optima	< 120	< 80
Presión arterial normal	120 a 129	80 a 84
Presión arterial fronteriza	130 a 139	85 a 89
Hipertensión 1	140 a 159	90 a 99
Hipertensión 2	160 a 179	100 a 109
Hipertensión 3	≥ 180	≥110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	<90

Tomado de: NOM-030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. ⁸

Debido a su etiología la HAS puede ser clasificada de la siguiente manera

- **Primaria o Esencial:** Se presenta en la mayor parte de los casos, no hay una causa orgánica identificable; entre otros mecanismos participan la herencia, alteraciones en el sistema nervioso simpático, el volumen sanguíneo, el gasto cardiaco, las resistencias arteriolares periféricas, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, la sensibilidad al sodio y la resistencia a la insulina. ⁸

- **Secundaria:** Se identifica una causa orgánica, que puede ser:
 - Renal: glomerulopatías, tubulopatías y enfermedades intersticiales.
 - Vascular: Coartación de la aorta, hipoplasia de la aorta, renovascular, trombosis de la vena renal, arteritis.
 - Endocrina: Enfermedades de la tiroides o de la paratiroides, aldosteronismo primario, síndrome de Cushing, feocromocitoma.
 - Del Sistema Nervioso Central: Tumores, encefalitis, apnea del sueño.
 - Físicas: Quemaduras.
 - Inducidas por medicamentos: Esteroides suprarrenales, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la ciclooxigenasa 2, anfetaminas, simpaticomiméticos, anticonceptivos orales, ciclosporina, eritropoyetina, complementos dietéticos.
 - Inducidas por tóxicos: Cocaína, orozuz (Regaliz), plomo.
 - Inducidas por el embarazo: Incluye pre-eclampsia y eclampsia

3.8 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la capacidad antioxidante de las células. En el paso a la vida oxigenada las células se dotaron de sistemas antioxidantes que pueden ser enzimáticos y por lo tanto involucran mecanismos algunas veces complejos, y no enzimáticos en los que participan biomoléculas que generalmente poseen menor peso molecular que las enzimas. ^{2,9-10}

La producción de especies reactivas del oxígeno se produce constantemente en la mitocondria. Entre 2 a 5 % del oxígeno que entra en la cadena respiratoria se reduce de forma univalente para dar radical superóxido. Las sustancias que participan en las reacciones de los sistemas de defensa antioxidante se inactivan o deterioran en determinadas situaciones. Este deterioro puede ser causado por alguna enfermedad crónica o transitoria que provoca incrementos sustanciales en la producción de oxidantes y prooxidantes. Figura III.2. ^{2,11-12}

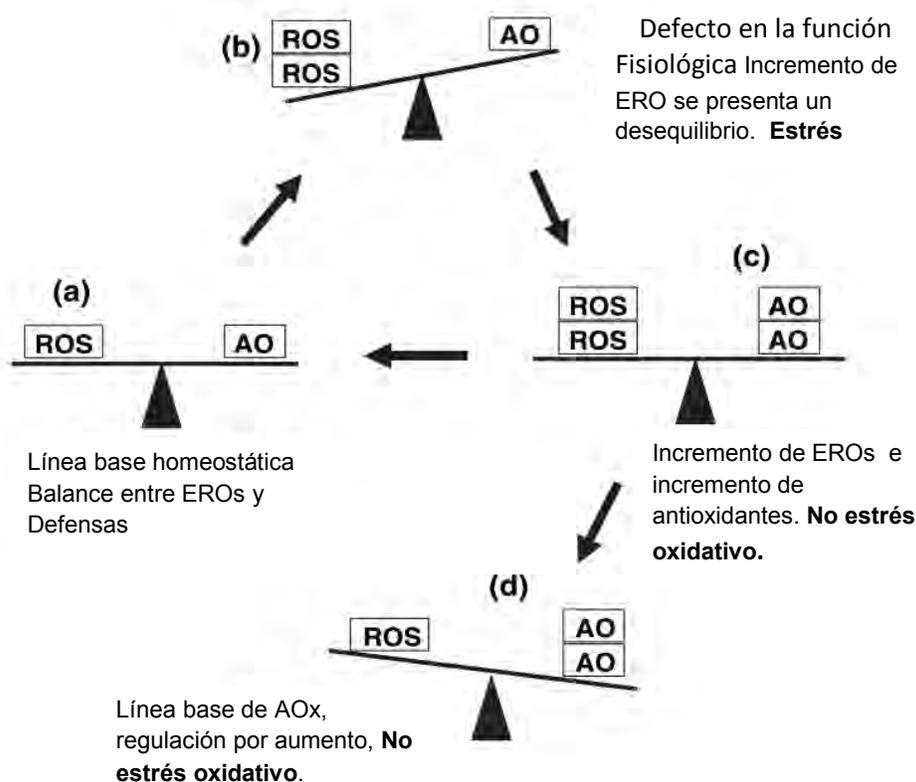


Figura III.2. Una ilustración simplificada de las relaciones entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes incluyendo cuando se presenta el estrés oxidativo. (a) En la línea base de la condición homeostática, tanto ROS y los niveles de antioxidantes (AO) son bajos, con defensas adecuadas para equilibrar la producción de ROS por lo que no hay estrés oxidativo. (b) Un aumento en la producción de ROS inicialmente puede exceder la capacidad del sistema antioxidante, lo que lleva a un período de estrés oxidativo. (c) Si el aumento de ROS es pequeño, puede ser acompañado por un mayor despliegue de antioxidantes, previniendo el estrés oxidativo adicional. Si la elevación de ROS es sólo temporal, entonces habrá un retorno a (a), la posición homeostática. (d) La exposición y la elevación más prolongada de ROS pueden inducir al organismo para aumentar permanentemente sus niveles de antioxidantes de línea de base, por lo que es más capaz de hacer frente a futuros eventos oxidativos. Tomado de Monaghan (2009)¹¹

3.9 Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad

Durante el envejecimiento se incrementa la generación de radicales libres (RL), de ahí que durante esta etapa de la vida, el estrés oxidativo (EOx) se observa como una condición normal desde el punto de vista estadístico, aunque no deseable desde el punto de vista biológico, ya que, los RL causan daño oxidativo a macromoléculas (ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos), favoreciendo la presencia o complicaciones de un gran número de padecimientos agudos y crónicos, entre los que destacan los procesos inflamatorios en general, la diabetes mellitus, la aterosclerosis, distintos tipos de cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma bronquial, cataratas, degeneración macular, infección por virus de inmunodeficiencia humana(VIH), artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, apnea obstructiva del sueño, infarto del miocardio, enfermedad cerebro-vascular, isquemia reperusión, sepsis, insuficiencia renal, pancreatitis aguda, cirrosis hepática, osteoporosis, enfermedad periodontal y caries entre otros (Cuadro III.4).²

Cuadro III.4. Enfermedades vinculadas con el estrés oxidativo.

I.	Cardiovascular
II.	Neurológico
III.	Infecciosos
IV.	Cáncer
V.	Isquemia-reperfusión
VI.	Respiratorio
VII.	Endocrino: diabetes mellitus
VIII.	Renal
IX.	Hepático
X.	Huesos y articulaciones
XI.	Ojos
XII.	Páncreas
XIII.	Bucodental
XIV.	Piel

Tomado de: Rodríguez (2003) ²

3.10 Diabetes mellitus y estrés oxidativo

Se ha demostrado ampliamente que la hiperglucemia, tanto intracelular como extracelular, genera una mayor producción de radicales libres (RL), principalmente el radical superóxido (O_2^-), y con ello se incrementa el daño por estrés oxidativo (EOx). El EOx es el promotor del desarrollo de las múltiples complicaciones asociadas a la DM, así mismo el EOx está involucrado en la apoptosis (muerte celular programada) de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans y la resistencia a la insulina, que se observan en la DM1 y la DM2, respectivamente. Los radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo ($-OH$) se producen excesivamente en la mitocondria cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta durante la fosforilación oxidativa. Estos RL ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena del DNA. No

obstante, el organismo posee enzimas antioxidantes para eliminar los RL, tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.^{1-2,13-14}

Varios estudios han sugerido que la disfunción de las células β es ocasionada por los altos niveles de glucosa y ácidos grasos libres o combinación de ambos. Las células β son particularmente sensibles a los EROs debido a que tienen bajos niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión oxidasa y la superóxido dismutasa. Por lo tanto la capacidad que tiene el estrés oxidativo de dañar las mitocondrias y la secreción de insulina no es sorprendente. Por ejemplo se ha demostrado que el estrés oxidativo generado a corto plazo en un preparación de células β en H_2O_2 , incrementa la producción de p21 y decrece la insulina del ARNm, ATP citosólico y el flujo de calcio en citosol y la mitocondria.¹³

Se han descrito varias rutas metabólicas vinculadas con el estrés oxidativo e implicadas en las complicaciones de la diabetes mellitus 2, entre ellas se encuentra la ruta del sorbitol (o de la aldosa-reductasa), la ruta de la glucosilación no enzimática de proteínas, la autoxidación de la glucosa, la modificación de la actividad de la protein-quinasa C, la pseudohipoxia, el metabolismo alterado de lipoproteínas y la alteración vía citocinas.¹⁴⁶⁻ De entre todas las mencionadas, las vías de la autoxidación de la glucosa, la del sorbitol y la glucosilación no enzimática de proteínas han sido las más estudiadas.¹⁴

Durante la autoxidación de la glucosa se generan productos oxidantes a partir de la enolización de la glucosa, de entre ellos se ha demostrado que el gliceraldehído en presencia de metales pesados, como el Fe^{+2} , puede formar el radical anión

superóxido, y éste puede ser convertido en agua a través de las enzimas antioxidantes o generar otros radicales más dañinos dependiendo de las condiciones.¹⁵

Por otra parte, la producción excesiva de O_2^- inhibe la actividad de una de las enzimas limitantes de la glucólisis, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH). La inactividad de G3PDH se debe a modificaciones estructurales de la enzima causadas por la adhesión de polímeros de ADP ribosa sintetizados por la polimerasa poli [ADP ribosa] (PARP). La PARP reside en el núcleo en forma inactiva, pero cuando el DNA sufre algún daño se estimula su actividad. Este fenómeno ocurre cuando, en estado de hiperglucemia, se produce un exceso de O_2^- que rompe la cadena de DNA. Una vez activada la PARP, ésta fracciona a la molécula de nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD⁺) en sus 2 componentes, el ácido nicotínico y la ADP-ribosa, y posteriormente sintetiza polímeros de ADP-ribosa, estos polímeros se acumulan y adhieren a la G3PDH y otras proteínas nucleares provocando alteraciones en la estructura y función de dichas proteínas. Por esta razón, en diabéticos, el nivel del gliceraldehído-3 fosfato (G3P) se encuentra elevado al no poder ser metabolizado por la G3PDH, y la acumulación de G3P activa cuatro mecanismos diferentes de daño tisular: glucosilación de proteínas y formación de productos finales de la glucosilación avanzada; activación de las vías del sorbitol, de las hexosaminas y de la proteína cinasa C.^{1-2,16-24}

Con relación a la vía del sorbitol, se propone que dados los niveles altos de glucosa circulantes en la sangre, se sigue la vía metabólica de la enzima aldosa reductasa, ésta es de baja afinidad a concentraciones normales de glucosa,

genera sorbitol a partir de la glucosa y utiliza al NADPH (nicotinamida adenindinucleótido fosfato) como cofactor. Debido a que el potencial antioxidante del glutatión depende del suministro de NADPH (pues lo requiere para su regeneración), el flujo de este cofactor por otra vía, como la del sorbitol, altera el balance oxidantes-antioxidantes hacia el lado de los primeros propiciando EOX.^{14,}

25

Además, se ha demostrado que el sorbitol así generado tiene efectos sobre la fisiología de las células, que toman libremente la glucosa (y que contienen la enzima aldosa reductasa) como son el lente del cristalino, las neuronas, los glóbulos rojos y las nefronas, que sufren cambios osmóticos y en la permeabilidad por el incremento de sorbitol, propiciándose la opacidad en el cristalino, la disminución en la velocidad de conducción nerviosa, alteraciones de las funciones de la nefrona, etc. complicaciones típicas de los pacientes diabéticos.^{14, 24-26}

Por otra parte, la glicosilación no enzimática de proteínas, también denominada glicatación o reacción de Maillard, es conocida desde hace mucho tiempo por su aplicación a la industria de los alimentos, y tomó relevancia fisiológica cuando se descubrieron las partículas de hemoglobina glicosilada en sangre de sujetos sanos y su incremento en los diabéticos.²⁵ Químicamente hablando es una reacción que sucede en tres etapas, la primera se da por la adición de un grupo amino primario (de una proteína o de fosfolípidos) al grupo carbonilo del azúcar, formándose una base de Schiff, este es un compuesto poco estable pero si no disminuye la concentración de glucosa circulante puede avanzar hacia la segunda etapa de la

reacción con la formación de un compuesto que se ha llamado genéricamente como compuesto de Amadori, en el cual se da nuevamente un rearrreglo interno para mayor estabilidad pero que genera más carbonilos reactivos; hasta este punto la reacción es todavía reversible y puede regresar hacia la base de Schiff e incluso hasta la parte inicial si disminuye la concentración de glucosa; sin embargo, si la reacción no se revierte, los grupos carbonilos de los productos de Amadori son capaces de reaccionar nuevamente con grupos amino de proteínas y originar moléculas más grandes por el entrecruzamiento del azúcar con otras proteínas (tercera etapa), los compuestos así generados se han denominado productos finales de glicosilación no enzimática o AGEs (del inglés Advanced Glycosylation End Products) que son estructuras fluorescentes, que se forman lentamente en reacciones fuertemente desplazadas hacia la derecha, es decir hacia la formación de los productos y que se ven propiciadas por la presencia de oxígeno y metales reductores.^{14,24}

Esta reacción puede afectar la funcionalidad de las células, ya que la glicosilación afecta la actividad biológica de las proteínas, por medio de tres mecanismos generales: la modificación de proteínas extracelulares (de bajo recambio), el desencadenamiento de procesos intracelulares por unión a receptores extracelulares y alteraciones de proteínas intracelulares.^{25,27} En los sujetos diabéticos, donde se conjuntan las condiciones para que se generen los AGEs, se ha descrito la unión de éstos a receptores específicos del tipo de las gammaglobulinas, en la superficie celular de macrófagos, monocitos y células endoteliales, desencadenando la liberación de RL de oxígeno y EOX.^{38,42} Es así

como la hiperglucemia crónica se ha vinculado con el EOX en los pacientes diabéticos, en los cuales se han descrito niveles elevados de marcadores de oxidación, además de asociación con el control glucémico y los AGEs. Por otro lado, se ha vinculado al EOX con los niveles bajos de insulina en los pacientes diabéticos, ya que se ha demostrado que las células beta del páncreas no son inmunes al daño por los RL, así que ya instalada la enfermedad es posible que empeore la situación del sujeto diabético, dado que disminuye la secreción de insulina en el páncreas por interferencia de los RL sobre el proceso normal de producción y secreción de insulina.²⁸

3.11 Hipertensión arterial y estrés oxidativo.

En el sistema cardiovascular, las especies reactivas de oxígeno (EROs) desempeñan un papel fundamental fisiológico en el mantenimiento cardíaco y vascular en la integridad de este, así como una disfunción asociada en condiciones tales como la hipertensión, la diabetes, la aterosclerosis entre otros. En condiciones fisiológicas, las EROs se producen de manera controlada a bajas concentraciones y funcionan como moléculas de señalización que regulan la contracción y relajación de las células del músculo liso vascular (CMLV) y su crecimiento. Bajo condiciones patológicas donde se encuentran elevados los niveles de EROs provocan una disfunción endotelial, aumento de la contractilidad, crecimiento de las CMLV y apoptosis, migración de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación, y un aumento en la deposición extracelular de proteínas de

la matriz, que son los procesos principales que contribuyen al daño vascular en la enfermedad cardiovascular.²⁹

La hipertensión es un factor de riesgo para muchas otras enfermedades vasculares como la aterosclerosis y la apoplejía, la base molecular de la hipertensión es compleja; más de 50 genes han sido implicados en la regulación de la presión sanguínea. Recientemente la función del receptor AT1 en la hipertensión ha sido objeto de intensa investigación en modelos *in vitro* y animales. La Angiotensina II (Ang II) modula la hipertensión a través de su efecto sobre el sistema renina-angiotensina, y la estimulación de los receptores AT1 en la pared vascular que conducen a la activación de NADH/NADPH oxidasa en las células vasculares. El estrés oxidativo resultante se considera un mecanismo unificador para la hipertensión y la aterosclerosis. Además de su efecto indirecto sobre la activación NADPH oxidasa a través del receptor AT1, la Ang II también puede regular directamente la activación de la NADPH mediante la inducción rápida de una translocación de GTPasa rac 1 a la membrana celular, o mediante la fosforilación oxidativa y translocación de p47phox a la membrana celular. EL estiramiento mecánico, es un sello distintivo de la hipertensión arterial, recientemente se demostró por medio de la inducción de la membrana a través de p47phox la traslación y la NADPH oxidasa la activación de las células del músculo liso vascular (CMLV).³⁰⁻³¹

3.12 Biomarcadores del daño oxidativo

Una vez que se producen los radicales libres tanto como las especies reactivas del oxígeno, estos tienen la capacidad de difundirse a través de la célula y atacar diversos componentes celulares. Los blancos prominentes de las especies reactivas de oxígeno son: lípidos, proteínas y el ADN.

3.12.1 Daño a lípidos

Los lípidos tienen un papel importante y funcional en la estructura de la membrana, la lipoperoxidación (LPO) puede provocar alteraciones en la permeabilidad hasta la muerte celular. Los dobles enlaces que se encuentran en los ácidos grasos polinsaturados son blancos fáciles para el ataque de los RL; la abstracción de un átomo de hidrógeno de los dobles enlaces, se obtiene una especie que interactúa con el O₂ resultando el radical peróxido, el cual puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana formando más el RL y formar una reacción en cadena.^{11,32}

En la LPO, los radicales que se forman pueden causar también daño a las proteínas membranales, inactivando receptores o enzimas que se encuentran unidas a las membranas, así como la producción del pigmento de envejecimiento llamado lipofuscina, del mismo modo hay un efecto sobre las lipoproteínas plasmáticas; cuando hay un aumento en la lipoperoxidación se le asocia el proceso del envejecimiento.

3.12.2 Daño a proteínas

La acción de los RL sobre las proteínas se da en los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol (-SH) ³³; porque lo que los aminoácidos son fragmentados alterando sus estructura y su función. Dentro de los aminoácidos de la tirosina, fenilalanina, triptófano, metionina, histidina, el cual forma un entrecruzamiento por lo que pueden ser susceptibles a las enzimas proteolíticas debido a la formación del grupo carbonilo, la creación de grupos N-terminales o cambios conformacionales. ^{11, 34,35}

Otro mecanismo de oxidación es el llamado sistema de oxidación catalizada por metal que puede convertir algunos residuos de aminoácidos, como la prolina, arginina y lisina a grupos carbonilo; este se emplea como un indicador de daño oxidativo el cual suele ser irreversible llevando a la desnaturalización de la proteína.³⁴

3.12.3 Daño al ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN), es el material hereditario de los seres humanos y otros organismos está compuesto nucleótidos que a su vez están formados por tres componentes característicos: (1) una base nitrogenada. (2) una pentosa y (3) un fosfato. La molécula sin el grupo fosfato se denomina nucleosido. Las bases nitrogenadas derivan de dos compuestos parentales, pirimidina y purina. EL ADN contiene dos bases principales de purina, la adenina y la guanina y dos bases de pirimidinas la citosina y la timina, y finalmente una pentosa; 2'-desoxi-D-ribosa. Los tres componentes forman una doble hélice por uniones no covalentes. ³⁶⁻³⁷

Los efectos observados en los ácidos nucleicos por los radicales libres del oxígeno son por causa de fenómenos de hidroxilación de bases nitrogenadas, escisión de hebras de ADN y formación de uniones cruzadas. Esto ocasiona alteración en la duplicación y transcripción, que explican la asociación de la generación de radicales libres de oxígenos con la carcinogénesis y el envejecimiento.³⁸

Al encontrarse expuesto tanto a los factores ambientales como a las actividades metabólicas, el ADN puede sufrir daños que si no son reparados dará lugar a mutaciones y posiblemente a enfermedades. Estos daños se pueden dividir en:

- Daños endógenos: provocados por los RL (especies reactivas de oxígeno)
- Daño exógenos: radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma, etc.)
- Radiaciones UV (UV-C. UV-B)
- Sustancias químicas del ambiente (hidrocarburos)
- Sustancias naturales (aflotoxinas, producidas por hongos que contaminan la comida).

Se estima que los RL son responsables de aproximadamente 10 000 modificaciones de bases por célula al día²; lo cual puede generar mutaciones somáticas lo que conllevará a la síntesis de proteínas defectuosas, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, reordenamiento cromosómico y desmetilación de citosina que activa genes. Se debe de resaltar que el ADNmt es un mayor blanco al daño oxidativo que el ADNn³⁹⁻⁴⁰; esto es debido a que el ADNmt se encuentra cerca de los ERO's generados durante el transporte de electrones, y por la falta de proteínas histonas para proteger el ADN

de los ataques o la reparación ineficaz, por lo que ocurre una acumulación de daño a niveles superiores.^{11, 41}

Cuando es atacada una desoxirribosa por los RL, se oxida produciendo la ruptura de los enlaces entre el azúcar, siendo los carbonos 4 y 5 los sitios susceptibles del ataque, y el grupo fosfato del siguiente nucleótido en la cadena sencilla, que son reparados por medio de las enzimas adecuadas; si hay una gran cantidad de rompimientos de cadena sencilla se conduce a la formación de rompimientos de cadena doble, lo cual provocaría un daño permanente o mutagénesis.³⁴

Se ha visto que el daño oxidativo en el ADN mediado por 1O_2 es común, entre los componente de los ácidos nucleicos los derivados de la guanina son los más susceptibles a la oxidación pero los productos de degradación generados aún se desconoce su naturaleza; sus efectos se dan sobre la información genética, en la replicación del ADN y sobre la reparación de los productos de oxidación. Las mutaciones tienen lugar cuando la cadena de ADN dañada es copiada durante la duplicación; en el ADNmt se sugiere que se da tras la exposición de mutágenos ambientales, de los errores de la polimerasa, en la falla al momento de la reparación y de defectos en los mecanismos de degradación. El principal RL es el $O_2^{\cdot-}$ donde al encontrarse en la matriz mitocondrial se convierte de forma espontánea o enzimática con la ayuda del superóxido dismutasa en H_2O_2 ; por la permeabilidad de la membrana permite la difusión fácil del H_2O_2 y dándose la reacción de Fenton, donde se produce el radical hidroxilo dañando al ADNmt y obteniendo como resultado aductos como la 8hidroxiguanosina (8-OHdG) y 8-hidroxiguanina (8-OHG).^{11, 34, 42}

Estos dos biomarcadores muestran una alta especificidad, aunque el utilizado con mayor frecuencia es la 8-OHdG, dándose la oxidación del C-8 de la guanina resultando un daño por una mutación génica transversional G→T; este biomarcador se puede medir en los linfocitos, saliva, orina, plasma entre otros. Se pueden cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High-performance liquid chromatography), cromatografía de gas acoplado a espectrometría de masa (GC-MS, del inglés gas chromatography-mass spectrometry), cromatografía líquida acoplado a espectrofotometría de masa (LC-MS, del inglés liquid chromatography-mass spectrometry), HPLC con detección electroquímica (HPLC-ECD), anticuerpos utilizando el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) y la electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).^{11,32}

Aunque es conveniente la 8-OHdG como un marcador biológico para evaluar todo el cuerpo, también tiene sus limitaciones ya que en la orina puede dar valores que se ven modificados por la tasa metabólica (consumo de oxígeno) y además de ser un producto de la oxidación es también de reparación por escisión.^{46,59} Como ya se mencionó, hay distintas causas de daños al ADN pero estos daños se pueden dar principalmente por tres vías: ruptura de una sola cadena (del inglés single-strand break, SSB), ruptura de la cadena doble (del inglés double-strand break, DSB) y lesiones múltiples. Al contrario de los lípidos y proteínas, el ADN no puede ser reemplazado por lo que éste debe de ser reparado, si no se logra esto la célula muere por apoptosis; esta reparación es regularizada en la división celular, donde se ve detenida la proliferación para que se repare correctamente el daño. Estos

mecanismos de reparación se han estudiado mejor en *Escherichia coli* (*E. coli*) aunque se sabe que en las células eucarióticas hay más proteínas implicadas.^{36,}

41, 43,44

Tipos de daño y reparación del ADN

EL daño al ADN consiste en cualquier cambio que produzca una desviación en la estructura de la doble hélice. Hay tres clases mayores de daño al ADN: cambio de base, distorsión estructural, daño en la cadena principal.⁴⁵

Cambio de base o conversión

Afecta la secuencia del ADN, con un efecto menor en la estructura, por ejemplo el remplazamiento del grupo amino en la citosina con el oxígeno convierten a la citosina en uracilo y esta base solo se presenta en la cadena del ARN. Este tipo de conversión es proceso de la desaminación. La desaminación es el daño hidrolítico más frecuente e importante, y ocurre espontáneamente por acción del agua, o puede ser inducido por un cambio mutagénico (Figura III.3.A). Cuando un par de bases es remplazado UG por CG esto causa una distorsión estructural menor en la hélice de doble cadena del ADN. Este tipo de daño no bloquea completamente el proceso de replicación o transcripción, pero pueda producir ARN mutante o una proteína.

EL ADN es sujeto a daños por alquilación, oxidación y radiación. Los agentes alquilantes como las nitrosaminas dan lugar a la formación de O⁶-metilguanina (Figura III.3.B). En esta modificación a menudo ocurre un mal apareamiento de las bases con timina, ocasionando el daño cuando se cambia un

par de bases GC por el par AT cuando el ADN es replicado. Los agentes oxidantes generados por la radiación ionizante y por los gantes químicos generan radicales libres. Estas especies reactivas de oxígeno (por ejemplo O_2^- , H_2O_2 y OH^*) pueden generar la 8-oxoguanina (oxoG), un daño a la guanina que contiene un átomo de oxígeno extra (Figura III.3.C). La OxoG es altamente mutagénica, en un par de bases se puede producir la forma Hoogsteen con la adenina. Esto da origen a la transversión de GC por TA, lo cual es una de las mutaciones más comunes encontradas en las canceres humanos. ⁴⁵

Distorsión estructural

La luz ultravioleta (UV) tiene un efecto perjudicial sobre las células debido a la absorción selectiva de los rayos UV. Las bases absorben con mayor fuerza a una longitud de onda de cerca de los 260nm. Muy frecuentemente la luz UV induce lesiones en ADN induciendo la formación de dímeros de pirimidina entre bases de timina (Figura III.3.D). Esto también se denomina dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD), debido a que el anillo de ciclobutano forma enlaces entre los átomos de carbono 5 y 6 de las timinas adyacentes. Debido a los enlaces covalentes formados entre las timinas de la misma cadena, esto altera las bases complementarias para la formación de la doble hélice. Los dímeros de timina ocasionan un distorsión estructural del dúplex del ADN. La distorsión estructural puede impedir la transcripción y replicación por el bloque del movimiento de las polimerasas. Consecuentemente, la inducción de dímeros de pirimidina es más

grave que el cambio de bases. La irradiación UV también puede inducir dímeros de citosina y timina, llamado fotoproductos de pirimidina (6,4)-pirimidona.⁴⁵

Daño en la cadena principal

El daño en la cadena principal incluye la formación de sitios abásicos (la pérdida de un nitrógeno base del nucleótido) y ruptura de la doble hebra del ADN. Los sitios abásicos son generados espontáneamente por la formación de aductos de bases inestables. Por ejemplo, los nucleótidos de purina, los enlaces azúcar-purina son relativamente lábiles. La hidrólisis de los enlaces N-glicosil en la base de purina son lábiles a la acción del agua (-OH) ente sitio ocurre la depurinización del ADN. Las rupturas de la doble hebra pueden ser inducidas por la radiación ionizante (por ejemplo rayos X, materiales radioactivos) y una gran variedad de productos químicos. La radiación ionizante puede atacar (ioniza) al azúcar desoxirribosa de la hebra principal del ADN o indirectamente generando especies reactivas del oxígeno. El daño en la doble hebra es el tipo de daño más grave en el ADN.⁴⁵

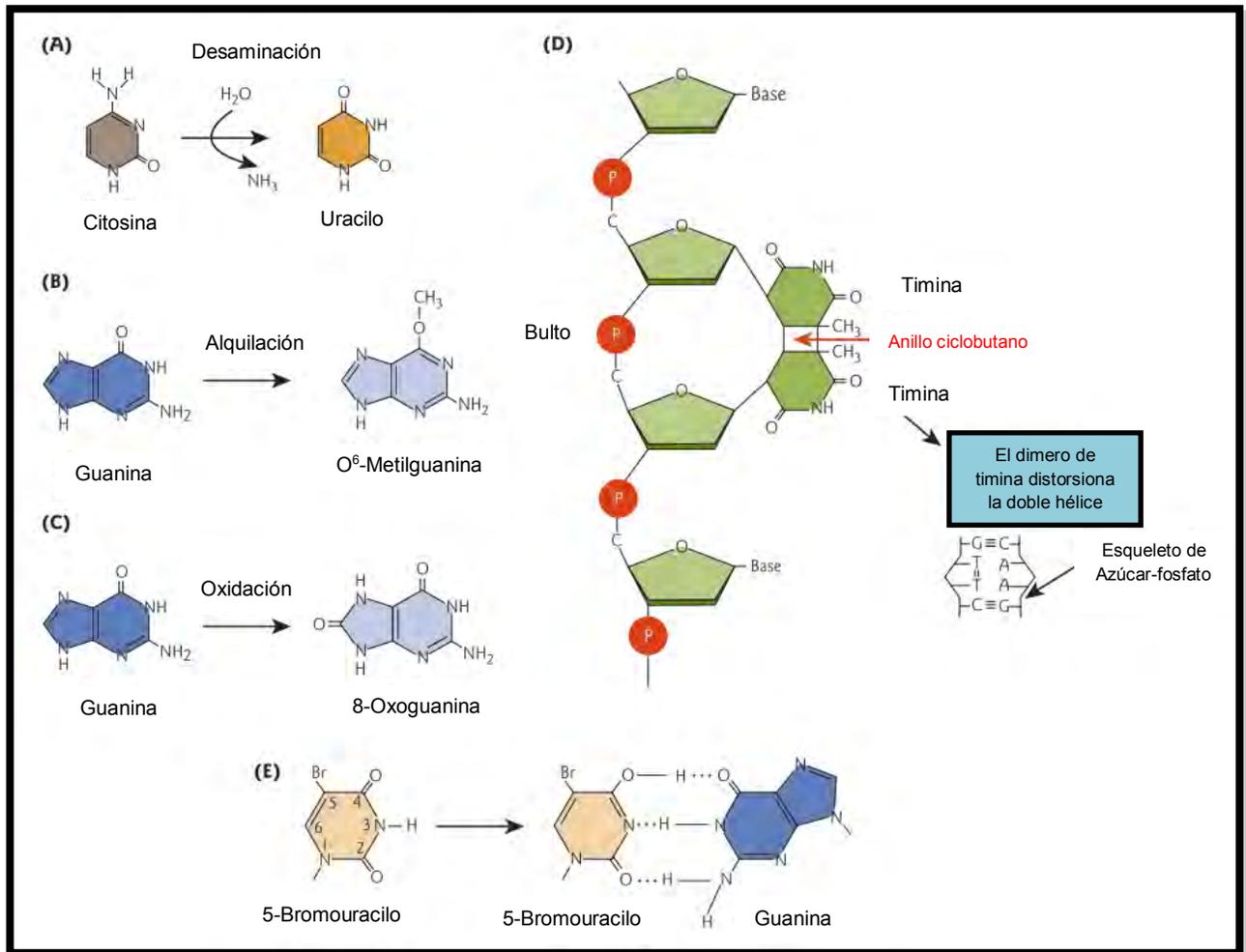


Figura III.3. Tipos de daño al ADN. (A) desaminación por cambio de bases de citosina a uracilo. (B) alquilación del oxígeno en la posición 6 del átomo de carbono que genera O⁶-metilguanina. (C) oxidación de la guanina generando 8-oxoguanina. (D) la radiación UV induce la formación del anillo de ciclo butano entre las timinas adyacentes, formando un dímero de timina. Esto ocasiona la distorsión estructural del dúplex ADN. (E) el 5-Bromouracilo, es un análogo de la timina, que puede ocasionar un apareamiento de base con la guanina. Tomado de Lizabeth A. Allison, Fundamental Molecular Biology.

Reparación del ADN

Los miles de cambios químicos aleatorios que producen cada día en el ADN de una célula humana, como el daño provocado por los RL, las radiaciones UV, agentes alquilantes, errores en la replicación, etc., son reparados por una variedad de mecanismos, cada uno catalizado por un grupo diferente de enzimas.⁴⁶

El camino básico para reparar el daño del ADN, comprende tres pasos:

1. EL DNA dañado es reconocido y eliminado por uno de los diferentes mecanismos. Estos involucran a las nucleasas, que escinden enlaces covalentes que unen nucleótidos dañados al resto de la molécula de ADN y deja un pequeño espacio en una de las cadenas de la doble hélice de ADN en esa región.⁴⁶⁻⁴⁸

2. Una ADN polimerasa de reparación se une al extremo 3' del hidroxilo y corta la cadena de ADN. Después llena el espacio al hacer una copia complementaria de la información almacenada en la cadena inalterada. Aunque es una enzima diferente de la ADN polimerasa que replica el ADN, la ADN polimerasa de reparación sintetiza las cadenas de ADN del mismo modo.⁴⁶⁻⁴⁸

3. Cuando la polimerasa que repara al ADN llenó el espacio, una ruptura se mantiene en el eje azúcar-fosfato de la cadena reparada. Esta mella en la cadena es sellada por la ADN ligasa, la misma enzima que une los fragmentos del ADN de la cadena retrasada durante la replicación del ADN.⁴⁶⁻⁴⁸

3.12.4 Daño oxidativo al ADN

Las mutaciones somáticas producidas por el daño oxidativo al ADN son reconocidas como uno de los factores de riesgo más importantes para diversos tipos de cáncer, de ahí que se reconozca a los EROs como elementos cancerígenos. Se estima que cada célula de rata recibe diariamente 100 000 reacciones o “golpes” (hits), mientras que las células humanas son sometidas a 10 000 lesiones potenciales. En ese sentido la mayoría de las lesiones o daños producidos por la acción de EROs son reparados por enzimas reparadoras del ADN, sin embargo, este daño oxidativo se ve acumulando con la edad, por lo que se calcula que la rata de 2 años tiene alrededor de 2 millones de lesiones por célula y las ratas jóvenes 1 millón de lesiones. En el humano los ancianos tiene 9 veces más mutaciones somáticas en los linfocitos por daño oxidativo al ADN que los neonatos. ¹

El daño oxidativo al ADN puede ser evaluado a través de marcadores biológicos como la electroforesis celular alcalina (ensayo cometa), cuya técnica es altamente sensible para detectar daño de hebra sencilla y doble, la 8-hidroxiguanina (8OHG) y su nucleótido la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG) excretada por orina. Al respecto se ha demostrado un daño significativamente mayor y niveles más altos de 8-OHG en sujetos con cáncer de pulmón, hígado y en miomas uterinos, así como la cantidad de 8OHdG eliminados por orina son más elevados en sujetos que sufren de cáncer de pulmón y mama en comparación con un grupo control. ¹

Daño en el ADN celular puede ser causado por las EROS generado bajo condiciones diferentes, y varias técnicas que se han desarrollado tienen la

capacidad para medir las modificaciones oxidativas de las nucleobases en el ADN. El daño oxidativo del ADN parece estar relacionada con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer más tarde en la vida. El ADN sometido al ataque por radical hidroxilo genera una amplia gama de bases y azúcares modificadas. Tales productos pueden ser medidos por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), GC-MS (cromatografía de gases acoplado a masas), LC-MS (cromatografía de líquidos acoplado a masas), y técnicas basadas en anticuerpos. Por lo general, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) se mide como un índice de daño oxidativo al ADN. Las ventajas de y artefactos producidos durante la medición de 8OHdG en el ADN celular se han revisado recientemente. Los métodos basados en anticuerpos también han sido desarrollados para detectar 8OHdG y tienen un uso útil para la visualización de los daños, pero parece probable que solo sean métodos semicuantitativos. El ADN también puede ser dañado por las ERNs (especies reactivas del nitrógeno), principalmente por la nitración y desaminación de las purinas. Los métodos para la medición de la nitración de bases del ADN y la desaminación productos se han desarrollado, pero puede necesitar más refinamiento y la validación antes de que puedan ser aplicados rutinariamente a los materiales humanos.³²

Ninguno de los métodos de análisis mencionados anteriormente identifica donde se encuentra el daño oxidativo del ADN. Otro problema en el estudio de daños en el ADN por EROs / ERNs es la limitada disponibilidad de tejidos humanos de donde obtener el ADN. La mayoría de los estudios se llevan a cabo sobre el ADN aislado a partir de linfocitos o leucocitos totales procedentes de la sangre de

humanos, y se supone (posiblemente) que los cambios se reflejan en otros tejidos.³²

La medición de 8OHdG en orina se ha utilizado para evaluar en "todo el cuerpo" el daño oxidativo del ADN. Esto puede ser alcanzado por HPLC y más técnicas MS. Sin embargo, la 8OHdG puede surgir de la degradación de dGTP oxidado en el grupo precursor del ADN, no sólo por la eliminación de oxidación de los residuos de guanina residuos del ADN por los procesos de reparación.³²

Además, hay muchos otros productos de oxidación de daño en el ADN. Por lo tanto, la 8OHdG urinaria es una medida parcial de daño a los residuos de guanina en el ADN y precursor de nucleótidos, y las concentraciones de 8OHdG no pueden realmente reflejar las tasas de daño oxidativo al ADN.³²

Sin embargo, los biomarcadores definidos para el estudio del estrés oxidativo, utilizando una aguda intoxicación por CCl₄ en roedores como un modelo para la medición del estrés oxidativo, se ha demostrado que 8OHdG en la orina es un candidato potencial biomarcador general de estrés oxidativo, mientras que los leucocitos ADN aductos MDA (malonaldehído) ni las rupturas de la cadena de ADN dan el mismo resultado con el tratamiento de CCl₄.³²

La situación con otras especies reactivas de oxígeno está presente menos clara. El oxígeno singlete es capaz de producir rupturas limitadas de cadenas en ADN aislado, y su capacidad para modificar las bases del ADN se limita al ataque selectivo de la guanina. El óxido nítrico (NO[•]) y de los productos derivados de este (NO₂[•], ONOO⁻, N₂O₃, etc.) puede causar nitración y la desaminación del grupo

amino en las bases del ADN que conducen a mutaciones puntuales. Los productos de desaminación de bases de purina incluyen a la xantina (de guanina) y hipoxantina (de adenina). La 8-nitroguanina puede ser un marcador útil de ataque en el ADN por las especies reactivas del nitrógeno (ERNs) como ONOO⁻.

49-50

Se ha reportado que los lípidos peroxidantes producen daño del ADN y también se descomponen para dar una amplia gama de productos que incluyen compuestos de carbonilo, tales como malondialdehído y la 4-hidroxi-2-trans nonenal, que han demostrado ser mutagénicos para células de mamíferos. Si estos aldehídos se generan en las proximidades de ADN, que puede ser capaz de combinar con él para formar productos distintivos.⁴⁹⁻⁵⁰

Otra explicación de la capacidad del estrés oxidativo para causar daño al ADN es la que desencadena una serie de eventos metabólicos dentro de la célula que conducen a la activación de enzimas nucleasas, que escinden el esqueleto de ADN sin daño en el ADN (por EROs y ERNs o por activación de nucleasas) no son mutuamente excluyentes, es decir, que ambos podrían tener lugar.⁴⁹⁻⁵⁰

El daño oxidativo del ADN puede ser reparado por la acción de una serie de enzimas, pero la existencia de un estado de bajo nivel constante de daño in vivo sugiere que estas enzimas pueden trabajar cerca de su capacidad. La reparación no específica de las enzimas del ADN se basa en la liberación de aductos especiales de los deoxinucleotidos, y la reparación específica del ADN por las glicosilasas en liberar bases.⁴⁹

Los deoxinucleotidos son enzimáticamente hidrolizados a deoxinucleosidos, los cuales usualmente no son metabolizados, y ambos son bases libres que pueden ser recuperadas en la orina. Las diversas modificaciones de las bases y nucleosidos del ADN dan lugar a diversos productos como 8-hidroxiadenina, 7-metil-8-hidroxi-guanina, timina glicol, timidina glicol, hidroximetiluracilo, 8-hidroxi-guanosina y 8-oxoguanina que han sido detectados en la orina de humanos y de otros mamíferos. La presencia de estos productos en la orina sugiere un daño oxidativo en las bases del ADN el cual ocurre *in vivo* y los sistemas de reparación son activados para escindir las bases modificadas del ADN. ⁴⁹⁻⁵⁰

8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG)

El más importante de los radicales libre del oxígeno que causa daño básico a las biomoléculas (proteínas, lípidos de membrana y ADN), es el radical hidroxilo (HO). El radical hidroxilo puede ser producido por varios mecanismos, especialmente por la reacción de Fenton del peróxido de hidrógeno (la cual ocurre dentro de los núcleos) y metales y otras endógenos y exógenos ROS. El HO ataca al ADN cuando este es producido adyacentemente al ADN celular o mitocondrial causando la adición de ADN bases con nuevos radicales, la cual produce una generación con variedad de productos de oxidación. ⁵¹

La generación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 por las vía de la cadena respiratoria, en las proximidades de los cúmulos de Cu y Fe de las membranas mitocondriales activa la oxido-reducción (redox), lo cual proporciona la condiciones necesarias para la reacción de Fenton que conduce a la formación del radical hidroxilo (HO^{\cdot}), por lo

tanto, y con la adición del radical OH^{\bullet} en la base desoxiguanosina del ADN da lugar a la formación de la 8-hydroxidesoxiguanosina.^{49, 52-53}

La interacción del OH con las nucleobases de la cadena de ADN, como la guanina, permite la formación de la C8-hidroxiguanina (8-OHGua) o este nucleótido de la forma desoxiguanosina (8-hidroxi-2-desoxiguanosina). Inicialmente, la reacción de adición del OH permite la generación de radicales aductos, por un abstracción de un electrón, la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) es formada (Figura III.4.).⁵¹⁻⁵²

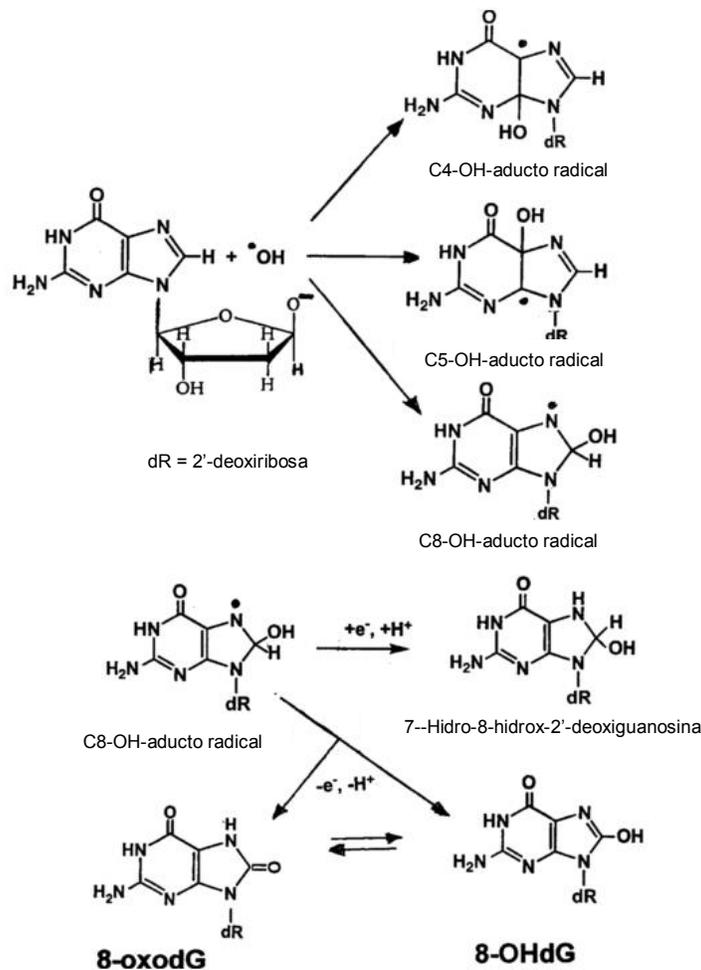


Figura III.4. Formación de la 8-OHdG. Reacción de la 2'-deoxyguanosina con los radicales hidroxilos, los radicales aductos siguen la reacción a 7-hidro-8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y por oxidación a la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) o su tautómero 8-oxo-7-hidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG). Tomado de: Valavanidis (2006) ⁵¹

Aunque las otras nucleobases de ADN reaccionan con el HO de similar manera, la lesión 8-oxodG de la lesión más abundante del ADN debido a que esta es relativamente fácil formada y promutagenica, y por lo tanto es un biomarcador potencial. ⁵¹

El estrés oxidativo generado de forma fisiológica o patológica produce un daño a los constituyentes celulares incluyendo los lípidos de la membrana, proteínas y ADN. Respecto al estudio del daño celular se ha visto que el 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) es el producto oxidativo más abundante del ADN, que es capaz de reflejar pequeños cambios oxidativos del daño nuclear y, por tanto, se considera como un nuevo marcador para la investigación de su daño oxidativo. ⁵⁴⁻

55

Los radicales hidroxilo, dañan biomoléculas, tales como lípidos, proteínas y el ADN. En el ADN, estos radicales pueden inducir a la ruptura en uno o dos fragmentos y a la oxidación de las bases (adenina, guanina y timina), dando lugar a mutaciones. Cerca de 20 modificaciones en las bases por causa de los radicales hidroxilo han sido identificadas, de las cuales la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), es el producto más abundante (Figura III.5.). La 8-OHdG puede conducir a la mutagénesis. Por otra parte, durante el proceso de reparación por los daños causados, resulta en la eliminación de la 8-OHdG en la orina. ⁵⁴⁻⁵⁵

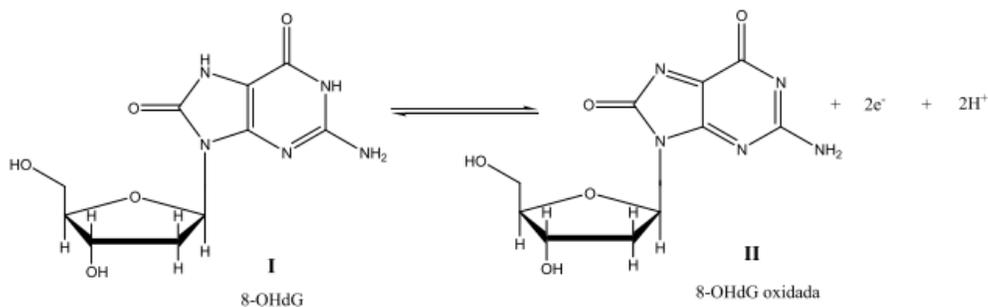


Figura III.5. Mecanismo propuesto para la oxidación de 8-OHdG. Tomado de: T. H. Li (2007) ⁵⁶

Los métodos más empleados para la determinación cuantitativa de la 8-OHdG, son los sistemas en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector electroquímico (HPLC-EC), electroforesis capilar con detector electroquímico (ECDE) y, con detección UV (ECUV), cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS), cromatografía de líquidos acoplado a masas (LC-MS). En la cuantificación con HPLC-EC, se presentan problemas en el electrodo de trabajo, debido a altos sobre-potenciales de oxidación de la 8-OHdG además de un envenenamiento paulatino del mismo, con la consecuente pérdida de señal o falta de reproducibilidad de las mediciones. ⁵⁴⁻⁵⁵

3.13.5 Biomarcadores de oxidación del ADN

8-OHdG

La 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) es uno de los marcadores más comúnmente utilizados para evaluar el daño oxidativo del ADN. Este compuesto también se refiere a veces como 8-oxi-7-hidroxideoxiguanosina (8-oxodG). ADN puede ser oxidado para producir muchos productos oxidativos, sin embargo la oxidación del C-8 de la guanina es uno de los más comunes eventos oxidativos, y los resultados es una lesión mutagénica que produce predominantemente la transversión de una G a T. La 8-OHdG se puede medir en muestras de ADN humano (por ejemplo, ADN, linfocitos, ADN de placenta, otros) y en la orina se ha sugerido como un posible enfoque para la evaluación de riesgo de cáncer debido a estrés oxidativo de un individuo. Varios métodos para la cuantificación de este biomarcador están disponibles. HPLC con detección electroquímica (HPLC / ECD) y cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC /MS) que son los métodos más ampliamente utilizados, aunque el ensayo inmunoenzimático ligado

a enzimas (ELISA), está siendo también empleados. Los métodos de HPLC y ELISA se compararon utilizando el ADN del tejido placentario. Los valores de ambos métodos correlacionan bien, pero los valores de ELISA fueron más altos que aquellos determinados por HPLC. Esto es probablemente debido a la cruz anticuerpos que reaccionan con otros compuestos de 8-OHdG.^{47, 50, 57-59}

La orina se obtiene fácilmente, y así muchos estudios epidemiológicos utilizan la 8-OHdG urinaria como un biomarcador de interés.

Aunque conveniente, este biomarcador también tiene sus limitaciones: la cantidad 8-OHdG en la orina puede estar influida por la tasa metabólica (consumo de oxígeno) también, la 8-OHdG en la orina es una función no sólo de la oxidación del ADN, sino también de reparación por escisión. Por esta razón, el uso de la 8-OHdG en orina como un biomarcador único debe realizarse con precaución, sobre todo en estudios con intervención, debido a que el aumento de los agentes de reparación aumentaría excreción de 8-OHdG en la orina, lo que podría ser mal interpretado como un aumento del daño del ADN. Algunos estudios epidemiológicos han medido 8-OHdG tanto en el ADN celular y en orina. Por ejemplo, Haegele y col. mide linfocitos 8-OHdG by HPLC/ECD y urinarios 8-OHdG a través de ELISA en un ensayo de intervención 14-d de frutas y verduras. Los resultados indicaron en el plasma que la luteína y B.-criptoxantina, ambos son los carotenoides xantofila, fueron significativamente inversamente correlacionados con la excreción urinaria de isoprostano (8-iso-PGF_{2a}) y con la 8-OHdG en ADN de linfocitos, pero no con la 8-OHdG urinaria. Los autores observaron deficiencias

en el ensayo de ELISA así como la variabilidad extrema en la preintervención de los valores de la 8-OHdG urinarios.^{47, 50, 57-60}

Anticuerpos contra ADN oxidado

Otro enfoque que se ha propuesto como un posible biomarcador del ADN oxidado es la medición de autoanticuerpos en suero que reconocen la 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina (HMdU), que es un producto oxidación de la timina. Frenkel et al. encontraron que los seres humanos pueden producir autoanticuerpos contra este compuesto, y los títulos de antiHMdU de los autoanticuerpos se puede medir en un ensayo simple de ELISA. Este marcador se evaluó en muestras de sangre de 169 mujeres, con las muestras obtenidas 0.5 - 6 y antes del diagnóstico de cáncer de mama, de colon o rectal. Los niveles de los autoanticuerpos anti-HMdU fueron significativamente mayores en los casos en comparación con los controles de la misma edad. La evidencia limitada sugiere que la dieta suplementación con unatocoferol (60 o 200 mg/d) puede reducir los niveles de este marcador biológico.^{50,}

^{59, 61}

Ensayo cometa

La mayor parte del material hereditario, DNA, se localiza en el núcleo celular como bases químicas, Adenina, Guanina, Citosina y Timina; el orden y secuencia de estas determina la información para construir y mantener un organismo. Existen diferentes tipos de daños al DNA que inducen ciertas lesiones introduciendo desviaciones a su conformación normal de doble hélice. Un agente genotóxico, es capaz de producir modificaciones de las características particulares del DNA; el H₂O₂ es un agente capaz de dar lugar a múltiples reacciones, llegando a producir un daño celular. El daño celular producido por estos agentes al encontrarse en

elevadas cantidades, ocurre sobre diferentes macromoléculas, tal es el caso de lípidos, proteínas y DNA, conociéndose a este daño como estrés oxidativo. En el DNA, el estrés oxidativo puede dar lugar a fenómenos como mutaciones y carcinogénesis. Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular donde el DNA está predominantemente en la etapa pre-sintética del ciclo celular, fase G₀. Los linfocitos humanos poseen un núcleo denso y citoplasma escaso. Se distinguen dos tipos principales de linfocitos, células T y B. El número total de linfocitos en un adulto saludable puede ser aproximadamente 500×10^9 , y alrededor del 2% (10×10^9) están presentes en la sangre periférica y el resto se ubican en otros tejidos, como en timo, nodos linfáticos, tejido linfático del intestino, bazo y médula ósea. Para interpretar aberraciones cromosómicas, es de gran importancia conocer si el grupo de linfocitos periféricos pertenece al grupo de redistribución; cerca del 80% de los linfocitos (400×10^9), pertenecen a este y el tiempo total de recirculación es de cerca de 12 horas. Empleando los linfocitos de sangre periférica como modelo experimental no solo puede detectarse el daño cromosómico que ha sido inducido en los linfocitos en la sangre periférica, sino también aquellos que han sido inducidos en cualquiera de los órganos donde estas células se distribuyen en el cuerpo. Singh y colaboradores (1988) introdujeron una técnica en microgeles que involucra la electroforesis alcalina (pH 13) para detectar el daño al DNA en células individuales; se refiere a la migración del DNA en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis, que al ser observada la célula al microscopio, por fluorescencia o tinción con plata, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza, región nuclear, y cola, formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo, por lo que es

conocido como Ensayo Cometa, debido al patrón de migración del DNA que se produce. Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, el Ensayo Cometa se distingue por: 1) Una demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al DNA, 2) Rápida realización, 3) Un análisis de los datos a nivel de células individuales, 4) Requerir un pequeño tamaño de muestra, 5) Flexibilidad y bajo costo, 6) y es aplicable a cualquier población de células eucariotas; Todo esto justifica su amplio uso en la evaluación genotóxica in vitro, de químicos industriales, agroquímicos, fármacos, así como, en el biomonitoreo ambiental y humano. ^{3,59, 62-65}

Finalmente se presenta la revisión sistemática de los estudios más relevantes sobre daño al ADN y su relación con la 8OHdG en pacientes diabéticos e hipertensos. Cuadro III.5. .

Cuadro III.5. Principales estudios referentes al daño al ADN y 8-OHdG

Autor - Año	Universo de estudio	Objetivos	Frecuencia y tiempo de intervención	Marcadores medidos	Hallazgos
Dandona et al. 1996 ⁶⁶	12 pacientes insulino dependientes (DM2) y 15 pacientes no insulino de pendientes (DM1) 26-39 años 40-71 años	Determinar el daño oxidativo al ADN en diabetes mellitus	Estudio transversal	Cuantificación de 8-oxodG en plasma por HPLC EC	Incremento de los niveles de la 8-oxodG contenida en DNA de células mononucleares en los pacientes diabéticos comparados con los controles.
King et al. 1997 ⁶⁷	31 hombres y mujeres con rango de edad entre los 75 y 80 años	Cuantificar daño al ADN en linfocitos.	Estudio transversal	Daño al ADN por ELISA, SOD, GPx, CAT, CPL	Aumento del daño relacionado con la edad y las mutaciones en linfocitos y Disminución de la capacidad de reparación del daño inducida por el H ₂ O ₂
Poulsen et al. 1998 ⁶⁸	182 hombres y mujeres de 35-65 años fumadores de más de 15 cigarros	Relación del daño oxidativo <i>in vivo</i> con la edad, antioxidantes en plasma, metabolismo de drogas, actividad de la glutatión-s-transferasa y la excreción urinaria de creatinina.	8 semanas con suministro de antioxidantes	Antioxidantes por HPLC Metabolitos urinarios por HPLC 8-oxodG por HPLC	El daño oxidativo al ADN no tiene relación con la edad, la glutatión s-transferasa y los antioxidantes en plasma. Correlación con la 8-oxodG excreción de urinaria de 24h.

Hinokio et al. 1999 ⁶⁹	53 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y 39 pacientes sanos como control	Investigar el daño oxidativo al ADN en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, midiendo la 8-oxodG en orina y células mononucleares.	Estudio transversal	Determinación la 8-OHdG por HPLC EC	Reportan un asociación directa entre el daño oxidativo al ADN y la DM tipo 2. Establecen que la 8-OHdG en orina y en células mononucleares es un biomarcador útil para la evaluación del estrés oxidativo en pacientes diabéticos.
Rehman et al. 1999 ⁷⁰	17 hombres y 21 mujeres no insulino dependientes con rango de edad de 55.4 ± 6.6 años	Cuantificar el daño oxidativo al ADN en pacientes diabéticos tipo 2	Estudio transversal	Cuantificación del ADN por GC y MS	Niveles aumentados de daño oxidativo en el ADN de pacientes diabéticos comparado con los controles.
Foksinki et al. 2003 ⁷¹	81 humanos; 66 hombres y 15 mujeres con rango de edad 44 a 83 años	Determinar los niveles de 8-OHdG en orina y su relación con el ADN	Estudio transversal	Cuantificación de 8-OHdG por HPLC EC	No se encontró correlación entre la 8-OHdG urinaria y el daño oxidativo al ADN. Los niveles de 8-OHdG no dependen de la dieta en el caso de seres humanos. 8-OHdG puede reflejar la implicación de los mecanismos de reparación.

Wu et al. 2004 ⁷²		<u>Revisión</u> 8-OHdG: un marcador de estrés oxidativo al ADN y factor de riesgo para cáncer, aterosclerosis y diabetes	8-OHdG en tejido y orina por HPLC y ELISA	Niveles elevados de 8-OHdG en orina y daño oxidativo al ADN en diabéticos correlacionado con nefropatía diabética, cáncer y pacientes con placas ateroscleróticas
Al-Baker et al. 2005 ⁷³	Modelo celular <i>in vitro</i> con células envejecidas y senescentes	Analizar el daño y la reparación inducidos por rayos UV en jóvenes y adultos en fibroblastos dérmicos	Células con crecimiento de 3 a 4 días, fueron irradiadas con rayos UV durante 15min y analizadas con el ensayo cometa.	Daño al ADN por ensayo cometa Las células senescentes generan mayores cometas que las células jóvenes en la primera etapa de la reparación o bien que las células senescentes soportan más daño por genoma que las células jóvenes.
Pilger, Rüdiger. 2006 ⁶¹		<u>Revisión</u> 8-OHdG como marcador de daño oxidativo al ADN relacionado con la ocupación y exposición ambiental	Determinación de la 8-OHdG en el ADN por HPLC EC	La excreción de 8-OHdG es probable que refleje daño al oxidativo del ADN y la reparación desde todas las células en el organismo.

Goodarzi et al. 2010 ⁷⁴	32 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y 48 controles sanos.	Evaluar la relación entre el daño oxidativo al ADN y la glicación de proteínas en pacientes con diabetes tipo 1.	Estudio de casos y controles	Medición de la 8-OHdG por ELISA, HbA1c, proteína de suero glucosilada (SGP), MDA mediante ensayo bioquímico.	8-OHdG, HbA1c, MDA en el plasma y los niveles de SGP fueron mayor en los pacientes diabéticos que en los controles. Correlación significativa entre la 8-OHdG y HbA1c.
Thukral et al. 2012 ⁷⁵	72 pacientes, de los cuales 44 hipertensos y 28 normotensos	Estudiar el daño al ADN, perfil lipídico e hipertensión esencial.	Estudio de casos y controles	Daño al ADN se evaluó mediante el ensayo cometa Perfil lipídico mediante ensayo bioquímico.	Aumento de daño en al ADN en los pacientes hipertensos comparado con los controles. El daño al ADN también fue positivamente correlacionado con la dislipidemia.
Gür et al. 2013 ⁷⁶	31 pacientes con hipertensión arterial y 20 pacientes normotensos	Investigar daño en el ADN de linfocitos y el estado antioxidante total.	Estudio de casos y controles	Daño al ADN se evaluó mediante el ensayo cometa Antioxidantes totales se determinaron mediante método automatizado.	Se encontró mayor daño al ADN en el grupo de los hipertensos que en el grupo control. Se encontró una correlación negativa entre el daño al ADN y los antioxidantes totales.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las generaciones más numerosas, las nacidas entre 1960 y 1980, ingresarán al grupo de 60 años y más a partir de 2020. Esto refleja en el aumento de las proporciones de adultos mayores en las próximas décadas. En 2000 la proporción de adultos mayores fue de alrededor de 7.0%. Se estima que este porcentaje se incrementa a 12.5% en 2020 y a 28.0% en 2050. ³

La Diabetes Mellitus en la actualidad se considera como un problema de salud pública en el ámbito mundial y México al igual que otros países no escapa a esta problemática. La prevalencia en la población mexicana de 20 años y más es de 10.75%, alrededor de 5.1 millones con diabetes y el 34 %, 1,7 millones desconoce padecer la enfermedad. ³

La implicación del estrés oxidativo en diversas patologías, ha sido demostrada; entre ellas se encuentran la diabetes mellitus. En el transcurso de las dos últimas décadas, la Diabetes ha venido ocupando un lugar importante en la morbilidad y mortalidad de nuestro país, actualmente se ubica en el tercer lugar como causa de muerte, en la mortalidad general y como causa única de muerte ocupa el primer lugar. ³

En los pacientes que padecen de diabetes mellitus se producen cambios en indicadores bioquímicos que evidencian una situación de estrés oxidativo: disminuyen las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E, se incrementa la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido

tiobarbitúrico (del inglés las siglas TBARS), se incrementa la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación, menor capacidad antioxidante total del plasma y se daña el material genético. ¹⁷⁻¹⁹

En cuanto los pacientes que padecen hipertensión arterial (HTA), esta se considera un factor de riesgo cardiovascular, donde la hipertensión es un síndrome de anormalidades metabólicas y estructurales, en el que las especies reactivas de oxígeno (EROs) juegan un papel fisiopatológico preponderante en su desarrollo. Esto se debe, en gran medida, al exceso de O_2^- y la disminución de la liberación de NO (óxido nítrico) en la remodelación cardiovascular y en la vasculatura del riñón, mediado por los EROs. En la hipertensión humana, los marcadores biológicos del estrés oxidativo sistémico están elevados.⁵⁴

Debido a la importancia en el aumento de adultos mayores en las próximas décadas en México y que muchos de ellos cursan con diabetes mellitus y/o hipertensión arterial, es importante encontrar mecanismos que permitan el control de las personas en la adultez, disminuir los efectos del envejecimiento y proporcionar beneficios en diferentes funciones.

Por lo anterior, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la relación del daño al ADN y capacidad de reparación en adultos mayores diabéticos o hipertensos?

V. HIPÓTESIS

Algunos estudios han demostrado que la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, propician estrés oxidativo, y consecuentemente daño al ADN aunado a disminución en la capacidad de reparación, de ahí que se infiera que los adultos mayores con dichas enfermedades, presentarán mayor frecuencia y grado de daño oxidativo al ADN y niveles significativamente más bajos de 8-OHdG con respecto a los ancianos sanos.

VI. OBJETIVO

General

- Determinar la frecuencia y grado de daño oxidativo al ADN y la capacidad de reparación en adultos mayores con hipertensión arterial o diabetes mellitus.

Específicos

- Determinar el daño en el ADN utilizando la técnica del ensayo cometa en adultos mayores sanos, hipertensos o con diabetes mellitus.
- Evaluar el grado de reparación al ADN utilizando como marcador la excreción de la 8-OHdG en adultos mayores sanos, hipertensos o con diabetes mellitus.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional, prolectivo, transversal y comparativo, con una muestra de 207 adultos mayores residentes del estado de Hidalgo.

7.1.2 Universo de estudio

El estudio se realizó en una población de 207 adultos mayores Los cuales se dividieron en tres grupos:

1. Adultos mayores sanos (n=68)
2. Adultos mayores diabéticos (n=61)
3. Adultos mayores hipertensos (n=78)

7.1.3 Criterios de inclusión

- Individuos que acepten participar en el estudio
- Adultos mayores que se encuentren en el rango de edad de 64±5 años
- Adultos mayores clínicamente sanos
- Adultos mayores con hipertensión arterial
- Adultos mayores con diabetes mellitus
- Sin el hábito de tabaquismo en los últimos 2 años.
- Ambos sexos

7.1.4 Criterios de exclusión

- Individuos que no acepten participar en el estudio

7.1.5 Consideraciones éticas

Los individuos que aceptaron participar en este estudio firmaron una carta de consentimiento informado (anexo)

7.2 Variables

7.2.1 Clasificación

Variables independientes

- Diagnóstico médico
 - Pacientes sanos
 - Pacientes con Diabetes Mellitus
 - Pacientes con Hipertensión Arterial

Variables dependientes

- Daño al ADN
- Concentración de 8-OHdG

7.2.2 Operacionalización

Cuadro VII.1 Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	CATEGORÍA
Daño al ADN	Lesiones que se producen por sustancias químicas y por agentes físicos que causan rompimiento en la cadena de ADN, modificación de las bases, uniones cruzadas ADN-ADN y uniones cruzadas ADN proteína.	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	Promedio de migración en micrómetros (μm). Sin daño: <40% de migración Con daño \geq 40% de migración.
8-OHdG	Marcador de estrés oxidativo, producido por la oxidación de nucleosidos del ADN	Cuantitativa continua	Cantidad secretada en [nM].
Diagnóstico médico	Parte de la medicina que tiene por objetivo identificar una enfermedad basándose en los síntomas que presenta el paciente, el historial clínico y los exámenes complementarios.	Cualitativa nominal	Pacientes Sanos Pacientes Diabéticos Pacientes Hipertensos

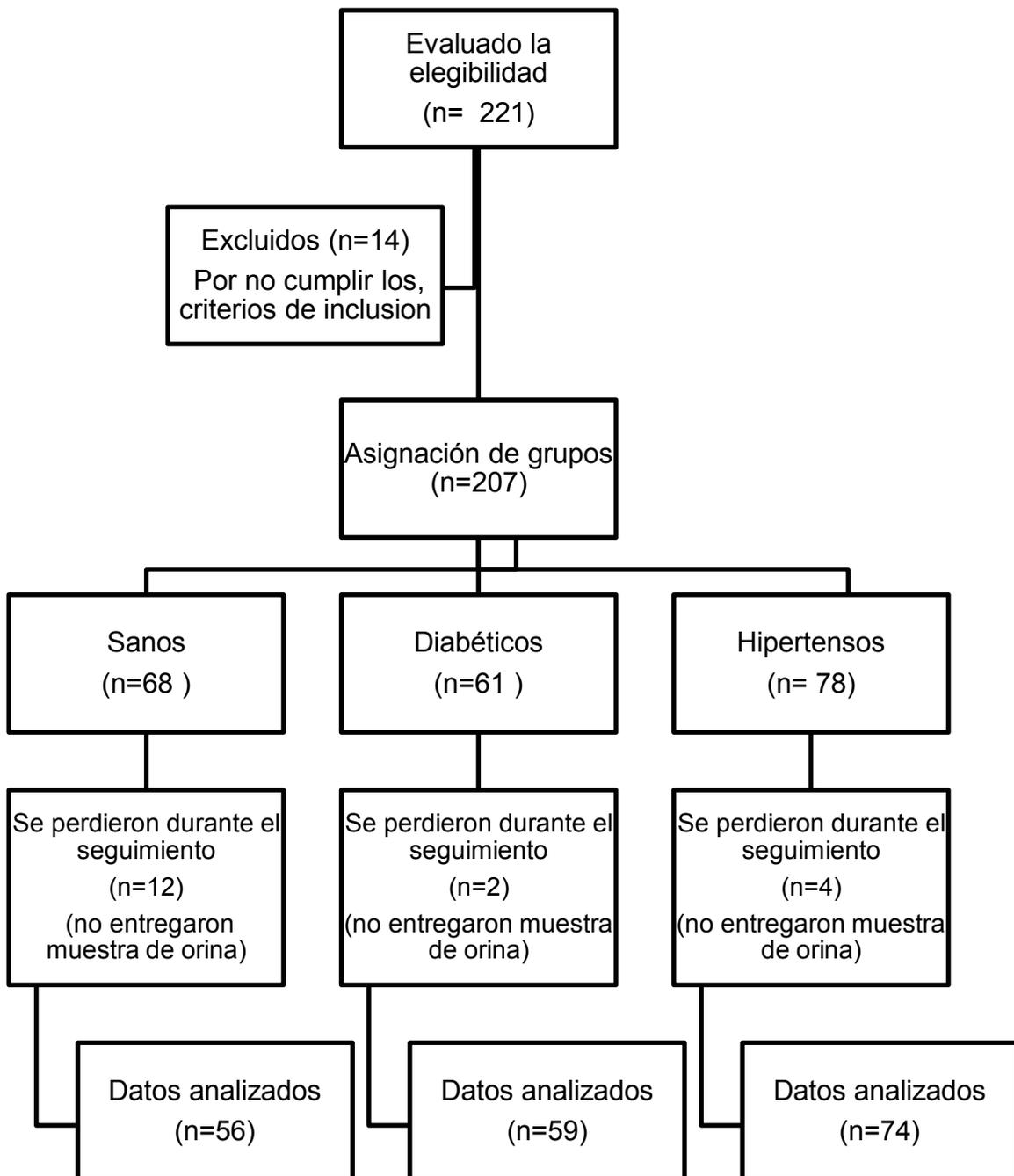


Figura 7.1 Diagrama de seguimiento de los pacientes durante el estudio.

7.3 Técnicas

Previo consentimiento informado y ayuno de 12 horas se llevó a cabo la toma de muestra para la biometría hemática, química sanguínea y daño al ADN.

7.3.1 Biometría hemática

La biometría hemática se realizó en el equipo automatizado Culter Beckman, obteniendo la concentración de hemoglobina (valores de corte: hombres, 12.17-17.26 g/dL, mujeres, 11.48-16.25 g/dL); la determinación del hematocrito (valores de corte: hombres, 38-52%, mujeres, 36-51%), y la cuenta de leucocitos (puntos de corte: 3500-10650/ mm³).

7.3.2 Química sanguínea

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

El colesterol se analizó usando la técnica de CHOD-PAP (valores de corte: 168–200 mg/dL), y los triglicéridos por la técnica de GPO-Trinder (valores de corte: 89-190 mg/dL), para la medición de las HDL se utilizó la misma técnica de colesterol

después de realizar la precipitación de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad utilizando una solución ácido fosfotústico/cloruro de magnesio (valores de corte: 42-77 mg/dL).

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

7.3.3 Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa

Es una técnica que permite cuantificar el daño al genoma de manera independiente en cada célula de una población, mediante la detección de rompimientos de cadenas sencillas de ADN.

Se prepararon laminillas en portaobjetos esmerilados a los cuales se les colocó una capa de 120µl de agarosa regular (0.75% disuelta en PBS libre de Ca⁺² y Mg⁺²), se dejaron hasta que solidifiquen. A continuación 10µl de cada muestra de sangre se mezclaron con 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (0.5% disuelta en PBS libre de Ca⁺² y Mg⁺²) y se colocaron sobre los portaobjetos preparados con la capa anterior, una vez solidificada la mezcla se agregó otra capa de 75µl de agarosa de bajo punto de fusión. Finalmente las laminillas se sumergieron en solución fresca de lisis fría (1% lauril sarcosianato de sodio, 2.5M NaCl, 100mM Na₂ EDTA, 10mM Tris-HCl pH 10, 1% tritón X-100 y 10% DMSO se añadieron a la solución recién preparada) y se colocaron a 4°C por lo menos una hora.

Posteriormente las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis, la cual contiene un amortiguador pH 13 (1mM Na₂ EDTA, 300mM NaOH) que cubría totalmente las laminillas permitiendo que el ADN se desenrollara por 20 minutos, después se ajusta la fuente de poder a 25 volts y 300 miliampers para efectuar la electroforesis por 20 minutos (es importante señalar que los pasos anteriores se realizarán protegido de la luz). Una vez apagada la fuente de poder se retiró cuidadosamente las laminillas de la cámara de electroforesis y se lavaron tres veces con amortiguador de neutralización (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) durante 5 minutos.

Se escurrieron las laminillas del exceso de amortiguador y se colocaron por 5 minutos en metanol absoluto, dejaron secar al aire y posteriormente tiñeron con 50µl de bromuro de etidio 1x (1mL de “stock” 10x [1mg/10mL] con 9mL de H₂O) cubriendo cuidadosamente con un cubreobjetos, para su observación al microscopio de fluorescencia.

Las laminillas se observarán al microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 microscope (Nikon, Japan) con un filtro de excitación de 515-560nm utilizando un aumento de 40X. Finalmente con un ocular graduado y calibrado, se midió el diámetro del núcleo y la longitud de la estela del cometa de 100 células.

El control positivo se realiza utilizando 200µL de sangre total que se colocó en 1mL de solución de Hanks (libre de Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) que contenía 200µM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por 30 minutos, sumergida en agua fría. Al final del periodo

de tratamiento se elimina el sobrenadante y el botón celular se utilizó para realizar la prueba.

La migración se calculó como la diferencia entre la longitud de las estelas de los cometas y el diámetro del núcleo.

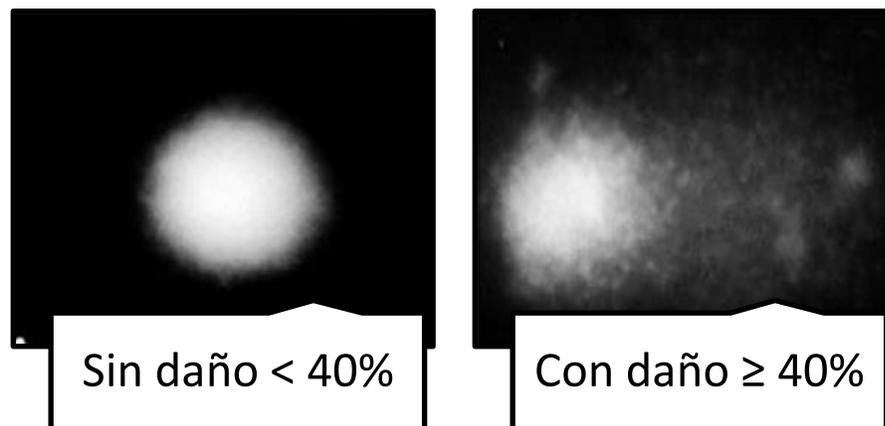


Figura VII.2 Criterios de evaluación de daño al ADN. Del lado izquierdo se presenta el núcleo de una célula que no presenta daño después de haberse sometido por la prueba del ensayo cometa, donde destacan sus características de núcleo condensado y con forma circular delimitada, del lado derecho se presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza, región nuclear, y cola, formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo.

7.3.4 ELISA 8-OHdG

Preparación de los reactivos

PBS + 0,1% de Tween 20 Solución de lavado (PBST)

Preparar 500 mL de PBST que contenía 1X PBS y 0,1% de Tween 20 en una botella de lavado para el lavado de los pocillos de tiras.

Estándar 8-OHdG

El kit contiene 20 µL de 8-OHdG estándar (Cat # 4380-096-01) a una concentración de 20 µM. Centrifugar el frasco estándar antes de abrir la tapa. Dividir en partes alícuotas y evitar una repetición de congelación / descongelación ciclos. Diluciones seriadas del estándar con el diluyente de ensayo (N ° 4380-096-02) justo antes de su uso. El volumen de cada dilución debe ser de 150 µL o mayor. Las concentraciones recomendadas finales son 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM y 3,13 nM. La curva estándar requiere 25 µL / pocillo de cada dilución de 8-OHdG realizarlo por triplicado. La Tabla 1 describe un protocolo de dilución en serie de normas 8-OHdG. Diluido 8-OHdG estándar debe utilizarse inmediatamente y se desecha el resto.

Anti-8-OHdG Monoclonal Antibody

Justo antes de su uso, diluir anti-8-OHdG anticuerpo monoclonal (Cat # 4380-096-03) 250 veces con diluyente de ensayo (Cat # 4380-096-02). Un

total de 25 μ L/ pocillo de diluido anti-8-OHdG anticuerpo monoclonal se requiere en el ensayo. Para 96 pocillos, diluir 12 μ L de anti-8-OHdG anticuerpo monoclonal en 3 mL de diluyente de muestra y añadir 25 μ L/ pocillo con una pipeta multicanal

Goat Anti-Mouse-IgG-HRP Conjugate

Justo antes de su uso, diluir de anti-IgG cabra de ratón-HRP (Cat # 4380-096-04) 500 veces con diluyente de ensayo (Cat # 4380-096-02). Un total de 50 μ L / pocillo diluida de cabra anti-IgG de ratón-HRP conjugado se requiere en el ensayo. Para 96 pocillos, diluir 12 μ L de cabra anti-ratón-HRP conjugado en 6 ml de diluyente de muestra y añadir 50 μ L / pocillo con una pipeta multicanal.

TACS-Sapphire™

Pre-caliente-TACS Sapphire™ (Cat. # 4822-96-08) a temperatura ambiente antes de su uso.

TACS-zafiro es un sustrato colorimétrico que se vuelve azul en presencia de peroxidasa de rábano (HRP). La adición de un volumen igual de 0,2 M HCl o 5% de ácido fosfórico se detiene la reacción para generar un color amarillo que se puede leer a 450 nm. Un total de 50 μ L se requiere por pocillo. Para 96 pocillos, distribuir 6 mL de sustrato con una pipeta multicanal.

Preparación de la muestra

Las muestras de orina:

1. Recoger la orina de acuerdo con el procedimiento estándar en un recipiente estéril.
2. Para aclarar centrífuga 2.000 x g durante 15 minutos, o de filtro utilizando un filtro de 0,45 micras para eliminar el precipitado.
3. Ensayo inmediatamente o almacenar a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ en alícuotas para su uso posterior. Evitar repetidos ciclos de congelación y descongelación.

Protocolo de ensayo

1. Retire pre pocillos recubiertos con tiras de la bolsa de papel de aluminio y llevar a temperatura ambiente. Consulte la sección Apéndice XII para el diseño de la muestra plato.

Nota: Si es menos de 96 pocillos recubiertos con pre-se necesitan, eliminar el exceso de marco tiras y volver a frustrar bolsa y almacenar a 4°C con desecante. (Rendimiento de datos se verá comprometida si ocurren cambios regenerativos de color de azul a rosa).

2. Preparar diluciones seriadas del estándar de 8-OHdG (Sección V punto 2) y muestras (Sección VI). 150 μL volúmenes finales se recomienda el ensayo por triplicado.

NOTAS:

- i. Clarificados muestras de plasma, orina y saliva diluida 1:10 en diluyente de ensayo es una dilución inicial recomendada.
 - ii. Si las muestras de generar valores mayores que el estándar de 200 nM, en un ensayo de dilución de la muestra superior. Si las muestras deben generar valores menores que el estándar 3,13 nM, ensayo a una dilución de la muestra inferior.
3. Añadir 25µL de 8-OHdG estándares y las muestras aclaradas a los pozos apropiados. Añadir 25µL de diluyente de ensayo a 0 nm 8-OHdG en blanco y pozos (control de fondo). Consulte la sección Apéndice XII para el diseño de la muestra plato.
4. Añadir 25µL de anti-8-OHdG solución monoclonal (Sección V punto 3) a todos los pocillos excepto los pocillos del blanco. Añadir 25µL de diluyente de ensayo a pocillos de blanco en su lugar. Mezclar bien sin causar burbujas de aire. Cubrir los pocillos con sellador de película y se incuba a 25 ° C durante 1 hora.
5. Retire con cuidado el film sellador y lavar los pocillos cuatro veces con PBST (300µL / pocillo). Asegúrese de líquido se elimina por tapping placa sobre toallas de papel.
6. Añadir 50µL de diluido de cabra anti-IgG de ratón-HRP (sección de elementos 5 ítem 4) a todos los pocillos excepto los pocillos del blanco.

Añadir 50µL de diluyente de ensayo a pocillos de blanco. Cubrir los pocillos con sellador de película y se incuba a 25 ° C durante 1 hora. Coloque TACSSapphire™ a 25 ° C y pre-caliente.

7. Retire con cuidado el film sellador y lavar los pocillos cuatro veces con PBST (300µL / pocillo). Asegúrese de líquido se elimina por tapping placa sobre toallas de papel.

8. Añadir 50µL de pre-calentado TACS-Sapphire™ sustrato colorimétrico a todos los pocillos y se incuba en la oscuridad, durante 15 minutos a 25 ° C. Detener la reacción añadiendo 50µL 0,2 M HCl o 5% de ácido fosfórico a todos los pocillos mezclando bien.

9. Inmediatamente leer la absorbancia a 450 nm.

10. Los resultados obtenidos se procesaron utilizando la hoja de cálculos en el sitio web Trevigen: [<http://www.trevigen.com/8-OHdGELISA.php>], para obtener la concentración de 8-OHdG.

7.3.5 Análisis estadístico

Los resultados de daño al ADN y la 8-OHdG obtenidos se procesaron utilizando el programa SPSS V.15, analizando estadística descriptiva por frecuencias, porcentajes y valores promedio \pm desviación estándar (DE). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) utilizando como prueba post hoc Dunnet con $p < 0.05$. Y evaluando el riesgo por medio de la razón de momios con un intervalo de confianza del 95%.

VIII. RESULTADOS

En el cuadro VIII.1. Se presentan los valores promedio de los parámetros bioquímicos y clínicos de los grupos de estudio. En este sentido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas excepto en los parámetros de glucosa para los diabéticos y la presión arterial para el grupo de hipertensos.

Respecto al porcentaje de sujetos con daño oxidativo al ADN relativo al estado de salud, se observó que el 59% de los diabéticos y el 53% de los hipertensos muestran células con daño oxidativo al ADN, en contraste con el 31% de los ancianos sanos, cuyas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.01$) (Cuadro VIII.2).

Por otro lado, los valores promedio de migración por daño al ADN en el ensayo cometa fueron significativamente más altos en el grupo de ancianos con hipertensión arterial en comparación con el grupo de sanos (hipertensos, 27.32 ± 8.00 vs. sanos 24.30 ± 5.07 , $p < 0.05$). Igualmente, el grupo de diabéticos mostró mayor migración por daño al ADN en comparación con los sanos, aunque la significancia estadística fue limítrofe (diabéticos, 26.94 ± 7.87 vs. sanos 24.30 ± 5.07 , $p = 0.06$) (Cuadro VIII.3.).

En el análisis del estado de salud como factor de riesgo de daño oxidativo al ADN, la diabetes mellitus constituye un factor de riesgo significativo para presentar daño al ADN (RM= 3.2, IC_{95%} 1.6 a 6.7, $p < 0.05$), al igual que la hipertensión arterial (RM= 2.5, IC_{95%} 1.3 a 4.9, $p < 0.05$) (Figura VIII.1).

Con relación a la excreción de la 8-OHdG [nM] en orina, se observó una concentración más alta en el grupo de adultos mayores sanos respecto a los grupos con DM2 o HTA, sin embargo la diferencia respecto al grupo de diabéticos no fue estadísticamente significativa (sanos, 154.89 ± 98.22 vs. diabéticos, 139.27 ± 116.36 , $p > 0.05$), y diferencia con grupo de hipertensos fue limítrofe (sanos, 154.89 ± 98.22 vs. hipertensos, 118.98 ± 85.56 , $p = 0.06$) (Cuadro VIII.4 y Figura VIII.2).

Cuadro VIII.1. Parámetros bioquímicos, hematológicos y clínicos por grupos

PARÁMETROS	SANOS n=63	DIABETICOS n= 60	HIPERTENSOS n=45
Hemoglobina (g/dL)	16.71±1.73	16.11±2.17	16.58±1.68
Hematocrito (%)	48.55±4.51	47.25±7.16	48.06±4.18
Glóbulos rojos (x10 ³ /mm ³)	5.10± 0.47	4.87± 0.58	5.07± 0.49
Glóbulos blancos (x10 ⁶ /mm ³)	6.26± 1.43	7.30± 6.44	6.65± 1.83
Glucosa (mg/mL)	115.97±32.89	165.20±76.63*	106.02±14.45
Urea (mg/dL)	33.09±11.52	39.20±19.84	38.00±13.70
Creatinina (mg/mL)	3.05±2.03	3.36±1.97	2.94±1.98
Ácido Úrico (mg/dL)	2.13±1.90	2.88±4.80	2.35±2.11
Colesterol (mg/mL)	215.78±48.81	214.70±42.44	211.14±40.30
Triglicéridos (mg/mL)	161.60±91.03	187.81±93.30	162.84±77.17
HDL (mg/dL)	54.03±13.32	53.46±12.84	56.00±15.35
Albúmina (mg/mL)	4.52±0.26	4.51±0.28	4.52±0.22
HbA1c (%)	5.90±1.26	7.85±2.02*	5.69±0.65
TAS (mmHg)	124±16	138±24*	139±20*
TAD (mmHg)	74±10	80±10*	82±11*

Los datos se presentan en promedios ± DE. *Prueba ANOVA de un factor Post hoc Dunnett, p<0.0001, **p<0.05. HDL: lipoproteína de alta densidad. HbA1c: hemoglobina glicosilada, TAS: Tensión arterial sistólica, TAD: Tensión arterial diastólica.

Cuadro VIII.2. Frecuencia de daño al ADN por grupos

Porcentaje de daño	Sanos n= 68	Diabéticos n= 61	Hipertensos n= 78
Sin daño	47 (69%)	25 (41%)	37 (47%)
Con Daño	21 (31%)	36 (59%)*	41 (53%)*

Los datos presentados son número de sujetos con células con o sin daño al ADN detectado a través del ensayo cometa Prueba de χ^2 , p=0.005

Cuadro VIII.3. Migración por daño al ADN por grupos

Diagnóstico	Promedio de migración (μm)	Valor de p
Sanos (n=68)	24.30 \pm 5.07	
Diabéticos (n=61)	26.94 \pm 7.87	0.068
Hipertensos (n=78)	27.32 \pm 8.00	0.021*

Los datos se presentan en promedios \pm DE. Prueba ANOVA de un factor Post hoc Dunnett.

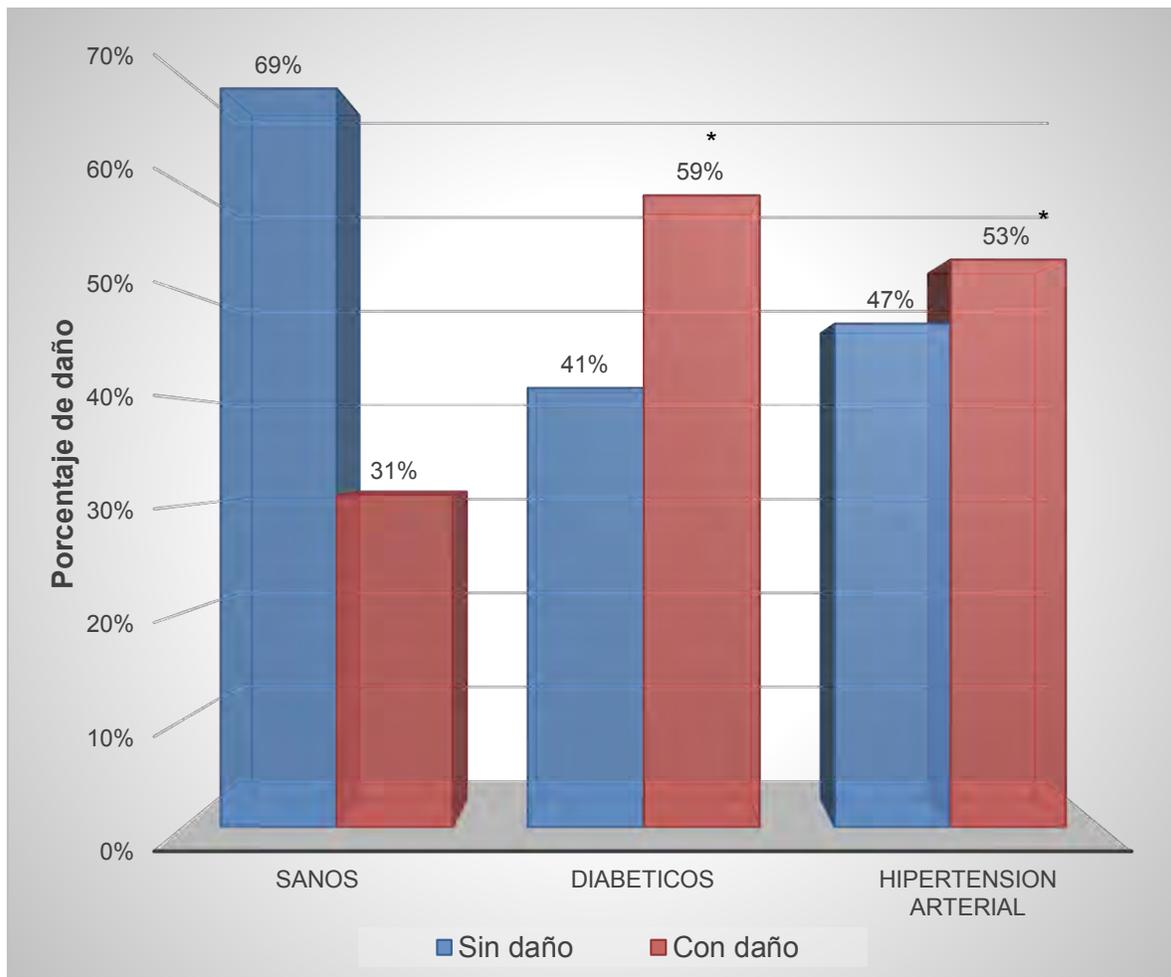


Figura VIII.1. Porcentaje de sujetos con células con daño al ADN por grupos. El 59% del grupo de diabéticos, el 53% del de hipertensos y el 31% de los sanos presentan daño al ADN. La diabetes y la hipertensión arterial son un factor de riesgo para daño al ADN: Diabetes: RM=3.2 (IC_{95%} = 1.6- 6.7, p<0.05); Hipertensión arterial: RM= 2.5 (IC_{95%} = 1.3-4.9, p<0.05).

Cuadro VIII.4. Excreción urinaria de 8-OHdG por grupos

Diagnostico	8-OHdG (nM)	Valor de p
Sanos (n=63)	154.89±98.22	
Diabéticos (n=59)	139.27±116.36	0.592
Hipertensos (n=74)	118.98±85.56	0.067

Los datos se presentan en promedios ± DE. Prueba ANOVA de un factor Post hoc Dunnett.

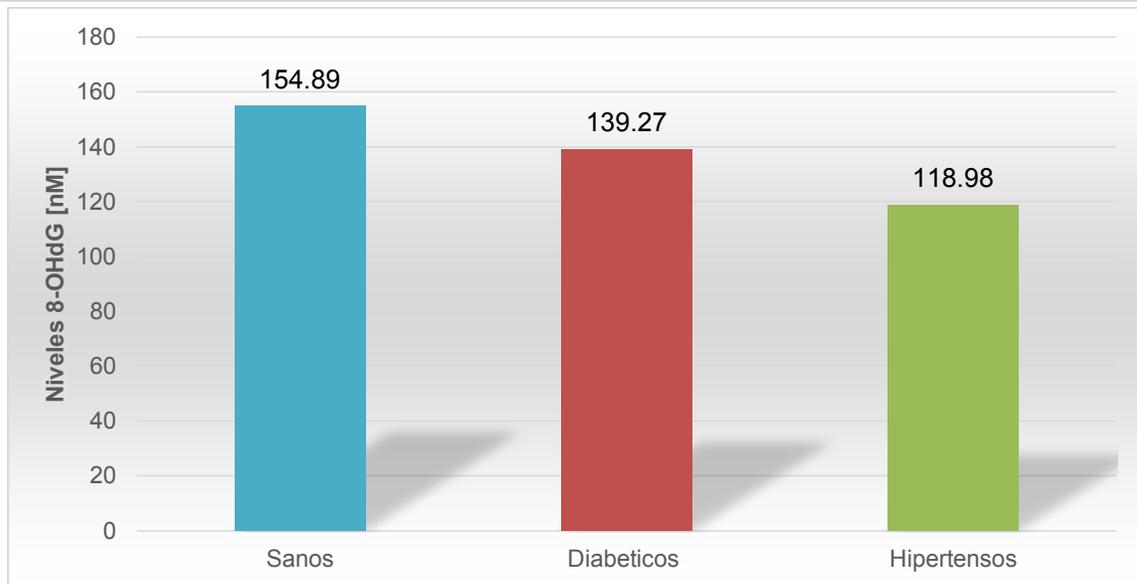


Figura VIII.2. Concentración de la excreción urinaria de 8-OHdG por grupos. El grupo de sujetos sanos mostró una concentración promedio de la excreción urinaria de 8-OHdG de 154.89 ± 98.22 , el grupo de diabéticos de 139.27 ± 116.36 y el de hipertensos de 118.98 ± 85.56 .

IX. DISCUSIÓN

Desde el punto de vista biológico el envejecimiento es consecuencia de la acumulación de daños genéticos aleatorios que limitan o afectan la síntesis del ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos. Este daño altera el funcionamiento de las células, tejidos, órganos y sistemas, y por lo tanto, se incrementa la vulnerabilidad a la enfermedad, lo cual se asocia a las manifestaciones características del envejecimiento, tales como, la pérdida de masa ósea y muscular, disminución en el funcionamiento de todos los sistemas, alteración en el oído y la visión, y la disminución en la elasticidad de la piel. Aunque inevitable, el envejecimiento no es un proceso estrictamente programado genéticamente, ya que, es multifactorial. En este sentido no se poseen instrucciones genéticas, que le indiquen al organismo cómo y cuándo envejecer y morir, por lo tanto, se puede aseverar que el envejecimiento, la esperanza de vida y la longevidad son consecuencia de la interacción de factores genéticos, ambientales y de los estilo de vida.¹

En 1956 se propuso que el envejecimiento es provocado por el estrés oxidativo según Harman, por lo que conforme aumenta la edad se incrementa la generación de radicales libres (RL), que causan daño oxidativo a las macromoléculas (ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos) favoreciendo la presencia o complicaciones de un gran número de enfermedades agudas y crónicas, entre los que destacan la diabetes mellitus y la hipertensión arterial dentro. Para prevenir la formación de moléculas oxidantes y para reparar el daño oxidativo a los tejidos y biomoléculas, todos los organismos aeróbicos poseen un complejo armónico de defensas

antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. El balance entre la producción de RL y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo.¹

En el presente estudio se evaluó la relación del estado de salud, en específico la presencia de diabetes mellitus o hipertensión arterial con el daño oxidativo al ADN en los linfocitos. En este sentido, los valores de los parámetros bioquímicos de los grupos de estudio nos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas excepto en la glucosa para el grupo de diabéticos y la presión arterial para los hipertensos, lo cual nos confirma la comparabilidad entre grupos.

Se ha demostrado ampliamente que la hiperglucemia, tanto intracelular como extracelular, genera una mayor producción de radicales libres (RL) y con ello se incrementa el daño por estrés oxidativo (EOx) que es promotor del desarrollo de las múltiples complicaciones asociadas a la diabetes mellitus (DM). Los radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo ($\cdot OH$) se producen excesivamente en la mitocondria cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta durante la fosforilación oxidativa. Estos RL ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena del ADN.¹⁻²

De esta manera cuando existe un exceso de superóxido (O_2^-) en estado de hiperglucemia, que rompe a la cadena de ADN, se activa la enzima poli [ADP ribosa] polimerasa] (PARP). Una vez activada la PARP, ésta fracciona a la molécula de nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD^+), en ácido nicotínico y ADP-ribosa, formándose polímeros de ADP-ribosa que se acumulan y se adhieren a la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH)

ocasionando su inactividad de forma estructural, siendo esta enzima importante por su función limitante en glucolisis. Por esta razón los niveles del gliceraldehído-3 fosfato (G3P) en diabéticos se encuentran elevados, al no poder ser metabolizado por la G3PDH, y la acumulación de G3P activa cuatro mecanismos diferentes de daño tisular: glucosilación de proteínas y formación de productos finales de la glucosilación avanzada; activación de las vías del sorbitol, de las hexosaminas y de la proteína cinasa C.^{1-2,16-21}

El daño al ADN es uno de los marcadores importantes de daño oxidativo, ya que el ADN se encuentra expuesto a los ataques de los EROs, principalmente por el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producen rompimientos tanto en las cadenas sencillas como de cadena doble, oxidación de las bases y fragmentación de los azúcares.^{28,29} .En este sentido, en nuestro estudio los promedios de migración de daño al ADN fueron significativamente mayores en el grupo de hipertensos respecto a los sanos, seguido del grupo de diabéticos cuya diferencia fue limítrofe. Estos hallazgos son congruentes con lo reportado por Maise *et al*, quién señala que muchas de las rutas celulares que conducen a la complicaciones de la diabetes y la resistencia a la insulina han sido vinculada a la generación de radicales libres y oxidantes. Aunque los primeros efectos de la glucosa elevada puede aumentar la presencia de posibles vías de protección, el tiempo exposición más prolongado de glucosa elevada puede dar lugar origen a los EROs y puede ser perjudicial incluso si los niveles de glucosa son controlados.⁷ Así mismo los grupos de adultos mayores diabéticos e hipertensos presentaron daño oxidativo al ADN en más del 50%, en contraste

del 31% del grupo de sanos, lo cual apoya la propuesta de que la diabetes mellitus y la hipertensión arterial son factores de riesgo significativos de daño al ADN en la vejez.

Actualmente se considera que la hipertensión arterial (HTA) es un síndrome de anormalidades metabólicas y estructurales (genéticas y adquiridas). En este sentido, han surgido evidencias que indican que las especies reactivas derivadas de oxígeno (EROs) juegan un papel fisiopatológico en el desarrollo de la hipertensión arterial. Mecanismo que está relacionado con un exceso de los principales EROs como son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$), y la disminución de la liberación del óxido nítrico (NO).⁵⁴ En el sistema cardiovascular, los EROs desempeñan un papel esencial fisiológico en el mantenimiento cardíaco y de la integridad vascular y un papel fisiopatológico en la disfunción cardiovascular asociada con condiciones tales como la hipertensión. En condiciones fisiológicas, los EROs se producen de manera controlada a bajas concentraciones y la función como moléculas de señalización que regulan las células del músculo liso vascular. Bajo condiciones patológicas se incrementa la producción de EROs llevando a cabo la disfunción endotelial, aumento de la contractilidad, el crecimiento de las células del músculo liso vascular, apoptosis, migración de monocitos, la peroxidación de lípidos, en la inflamación y aumento de la deposición extracelular de proteínas de la matriz, los procesos principales que contribuyen a al daño vascular en la enfermedad cardiovascular.¹⁶

Al respecto los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que los adultos mayores con hipertensión arterial tienen un porcentaje mayor de daño alto al ADN (19%) comparado con el grupo de sanos (15%), cuyos resultados son acordes con lo reportado por Ore *et al.*, Yildiz *et al.*, y Lee *et al.* que indican que la producción excesiva de EROs y la insuficiente capacidad de reparación de las lesiones producidas así como la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes produce como consecuencia daño al ADN en este tipo de pacientes.^{54-55, 77}

De lo anterior, el promedio de migración en los pacientes con HTA fue mayor respecto a los sanos, cuya diferencia fue estadísticamente significativa, lo cual sugiere que el daño al ADN causado por EROs es más frecuente en los pacientes hipertensos que en los normotensos.

En consecuencia, la evidencia experimental y clínica apoya el papel fisiopatológico de EROs y el estrés oxidativo en el desarrollo y la progresión de hipertensión y el daño asociado de los órganos diana.⁷

Por otro lado, el fundamento para la medición de la 8-OHdG en orina se basa en la existencia de sistemas de reparación específicos para la eliminación de daño oxidativo del ADN (2000 Cooke *et al.*). Los plásmidos que contienen 8-OHdG solo se replican en una tasa del 25% en reparación por escisión en células humanas deficientes en comparación con la tasa de células proeficientes que muestra una frecuencia de tres a cinco veces aumentando la frecuencia de transversiones de Guanina: Citosina a Timina: Adenina (Klein *et*

al. 1992). Esto sugiere que la reparación por escisión de nucleótidos es esencial para la eliminación de 8-OHdG en los seres humanos.

La medición de la 8-OHdG urinaria ofrece algunas ventajas: (1) el método no es invasivo (2) no hay producción de artefactos durante el procedimiento de muestreo o derivatización, (3) 8-OHdG no experimenta más metabolización y muestra una alta estabilidad en la orina (Poulsen et al. 1998), y (4) la excreción de 8-OHdG es probable que refleje el daño oxidativo del ADN y la reparación desde todas las células en el organismo. Por ejemplo, una cantidad de 14 nmol 8-OHdG en orina de 24 h apuntaría a 140 guaninas dañadas-oxidadas y reparadas por cada célula del cuerpo humano (6×10^{13} células) por día. Se ha argumentado que la muerte celular podría ser una fuente de lesiones urinarias de ADN, pero recientemente Cooke et al. (2005) llegó a la conclusión de que los niveles urinarios 8-OHdG son independiente de la muerte celular. ^{78,79,81}

Además los niveles de bases oxidadas podría cambiar no solo por el aumento de daño oxidativo al ADN, sino también por una alteración de la tasa de reparación. Por ejemplo, un agente que aumenta las tasas de excreción 8-OHdG podría interpretarse como “malo” si se cree que incrementa el daño del ADN, pero podría de hecho ser “bueno” si estimula la reparación y por lo tanto disminuye los niveles estacionarios de la 8-OHdG en el ADN como menciona Halliwell. ⁸² En este sentido la 8-OHdG puede atribuirse como un marcador de reparación al ADN. ⁸⁰⁻⁸¹

De esta manera, en nuestra investigación los niveles de excreción urinaria de la 8-OHdG en el grupo de adultos mayores sanos se observó una concentración más alta con respecto a los pacientes diabéticos e hipertensos; los niveles bajos de excreción de la 8-OHdG en el grupo de diabéticos e hipertensos sugiere una capacidad de reparación disminuida vinculada a la fisiopatología de la enfermedad, por lo que la 8-OHdG podría ser un biomarcador de reparación del daño oxidativo al ADN,⁷⁸ con utilidad pronóstica.

Finalmente, es importante resaltar como limitaciones del estudio el ser de tipo transversal y que el tamaño de la muestra no es representativa, por lo que será necesario llevar a cabo estudios longitudinales con muestra representativas para confirmar nuestros hallazgos. No obstante, apoyan la propuesta de indicar suplementos antioxidantes como parte del tratamiento de los ancianos con diabetes mellitus o hipertensión arterial.

X. CONCLUSIONES

Hipótesis

Algunos estudios han demostrado que la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, propician estrés oxidativo, y consecuentemente daño al ADN aunado a disminución en la capacidad de reparación, de ahí que se infiera que los adultos mayores con dichas enfermedades, presentarán mayor frecuencia y grado de daño oxidativo al ADN y niveles significativamente más bajos de 8-OHdG con respecto a los ancianos sanos.

Conclusiones

- Nuestros hallazgos sugieren que la diabetes mellitus y la hipertensión arterial causan daño oxidativo al ADN y fisiopatológicamente afectan la capacidad de reparación, apoyando la propuesta de indicar suplementos antioxidantes como parte del tratamiento de la diabetes mellitus y la hipertensión arterial en la vejez.
- La medición de excreción urinaria de 8-OHdG podría ser un biomarcador pronóstico para la diabetes mellitus e hipertensión arterial en la vejez.

XI. PERSPECTIVAS

- Es recomendable continuar con esta línea de investigación, diseñando estudios de tipo longitudinal con muestras de población representativas, que permitan evaluar los marcadores de EOX de manera más amplia, considerando algunos marcadores como las enzimas antioxidantes, SOD, GPx, CAT, así como realizar cinética de reparación en ADN con el fin de confirmar nuestros hallazgos.
- Por otra parte es importante explorar los factores protectores de daño al ADN, en diferentes poblaciones y zonas geográficas, considerando la influencia de sexo (femenino) así como los estilos de vida (ejercicio físico, alimentación, sueño, autoestima, entre otros).

XII. REFERENCIAS

1. Mendoza-Núñez VM, Retana-Ugalde R. Estrés oxidativo e inflamación. México: FES Zaragoza, UNAM; 2009.p. 31-45.
2. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. México: FES Zaragoza, UNAM; 2003.p. 15-7, 23,31,45.
3. CONAPO. El envejecimiento de la población en México. México D.F.2005 [20 de Octubre de 2012]. Available from: <http://www.conapo.gob.mx/publicaciones/enveje2005/enveje02.pdf>.
4. Gutiérrez JP, Rivera J, Shamah T, Oropeza C, Avila MH. Encuesta nacional de salud y nutrición 2012. Resultados nacionales. Instituto Nacional de la Salud Publica. 2012.
5. Abúndez CO. Encuesta nacional de salud y nutrición 2006. Instituto Nacional de Salud Publica. 2006.
6. Capote KR, Miranda EC. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Cubana Invest Biomed.* 1999;18(2):67-76.
7. Norma oficial mexicana, NOM-015- SSA2-1994, "para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria". 1994
8. Norma oficial mexicana. NOM-030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. 2009:1-40.
9. Guerra JIE. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna.* 2001;18(6):326-35.
10. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996;273(5271):59-63.
11. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters.* 2009; 12:75-92.
12. Sohal RS. Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(1):37-44.
13. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? the common soil hypothesis revisited. *J AHA.* 2004;24:816-23.
14. Rosado-Pérez J, Mendoza-Núñez VM. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 2007; 32(2):58-69.
15. Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. B-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;Suppl 1:119-24.
16. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Hou J. Novel Avenues of Drug Discovery and Biomarkers for Diabetes Mellitus. *J Clin Pharmacol.* 2010; 51:128-52.
17. Beristáin-Pérez AS, Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Mendoza-Núñez VM. Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertension arterial, en adultos mayores. *Bioquímica.* 2006; 31(1):13-22.
18. García AEZ, Argones AF. Diabetes mellitus y estrés oxidativo. *Bioquímica.* 1999; 24(3):75-9.

19. Ibarra MLR, González CMB, Meda BCG, Pérez ALZ. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Inv Salud*. 2006;8(1):7-15.
20. Hernández SC. Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2000; 19(3):191-5.
21. Al-Dallen SM, Rodríguez TC, Sánchez GM. El equilibrio redox en la Diabetes y sus complicaciones. *Acta Farm Bonaerense*. 2004; 23(2):231-42.
22. Hernández JC, Puig MEL, García PH, Marcel EAA, Quesada MY. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*. 2011; 58(1):4-15.
23. Guerra JIE. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna*. 2001; 18(6):326-35.
24. Altamirano GA, Leon MGFd, Reyes-Montes MdR, Hernández VV, Cuenca JAS. Radicales libres y mecanismos de daño tisular en la diabetes mellitus *Rev Fac Med de la UNAM*. 2011; 54(3):46-53.
25. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *JAOA*. 2000; 100(10):622-34.
26. Mantilla MET. La hiperglucemia y sus efectos toxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*. 2001;2(2):131-41.
27. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Internal Medicine*. 2002; 251:87-101.
28. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in B-Cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 2003; 52:581-7.
29. Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Hypertension Reports*. 2000; 2:98-105.
30. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Artheroscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:29-38.
31. Zalba G, Jose GS, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, et al. Oxidative stress in arterial hypertension role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 2001; 38:1395-9.
32. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(4):601-23.
33. Orhan H, Holland BV, Krab B, Moeken J, Vermuelen NPE, Hollander P, et al. Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Rad Res*. 2004; 38(12):1269-79.
34. Gonzales-Torres, Cristina M, Betancourt-Rule, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 2000; 25(1):3-9.
35. Stadman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9:315-25.
36. David L. Nelson, Michael M. Cox. *Principios de Bioquímica Lehninger*. 3a ed. Barcelona: Omega; 2001. p. 326-327.
37. Reddy VP, Perry G, Cooke MS, Sayre LM, Sayre MA. Mechanisms of DNA damage and repair in Alzheimer disease. *Nucleic Acids Res* 2006:98-113.

38. Gastell PLP, Alejo JLPd. Métodos para medir el daño oxidativo Rev Cubana Med Milit.29 (3):192-8.
39. Gutiérrez JRV. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cubana Med Milit. 2002; 31(2):126-33.
40. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology 2000; 149: 43-50.
41. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J. 1996; 313:17-29.
42. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res. 2009; 37(8):2539-48.
43. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, Souza-Pinto NCd, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage association with cancer and aging. Carcinogenesis. 2009; 30(1):2-10.
44. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 2003; 17:1195-214.
45. Lizabeth A. Allison. Fundamental Molecular Biology. USA: Blacwell Publishing; 2007. p 156-158
46. Bruce Alberts, Dennis Bray. Introducción a la biología celular. 3a ed. Madrid España: Panamericana; 2010. p 211,215-216
47. Reddy VP, Perry G, Cooke MS, Sayre LM, Sayre MA. Mechanisms of DNA damage and repair in Alzheimer disease. Nucleic Acids Res 2006:98-113.
48. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009; 461:1071-8.
49. Giammarioli S, Filsesi C, Sanzini E. Oxidative stress markers: specificity and measurement techniques. Ann Ist Super Sanita. 1999; 35(4):563-76.
50. Mayne ST. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. J Nutr. 2003; 133:933-40.
51. Wu LL, Chiou C-C, Chang P-Y, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clin Chim Acta. 2004; 339:1-9.
52. Wu LL, Chiou C-C, Chang P-Y, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clin Chim Acta. 2004; 339:1-9.
53. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med. 2000;29(3/4):222-30.
54. Oré R, Valdivieso R, Suárez S, Huerta D, Nuñez M, Durand J. Marcadores de estrés oxidativo en hipertensión leve. An fac med 2007; 68(4):351-5.
55. Yildiz A, Gür M, Yilmaz R, Demirbag R, Celik H, Asian M, et al. Lymphocyte DNA damage and total antioxidant status in patients with-coat hypertension and sustained hypertension. Arch Turk Soc Cardiol. 2008; 36(4):231-8.
56. Touyz RM, Shiffirin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol. 2004; 122:339-52.

57. Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(7):875-85.
58. Kasai H, Hirano T, Kawai K, Tsurudome Y, Itoh H, Himeji D, et al. Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as marker of oxidatively damaged DNA in relation to carcinogenesis and aging. *Nucleic Acids Res* 2007:178-86.
59. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta.* 2005; 365:30-49.
60. Kasai H. Analysis of form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.* 1997; 387:147-63.
61. Pilger A, Rüdiger HW. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006; 80:1-15.
62. Ayala MC, Hernández YG, Piñeiro JCG, González EP. Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por el peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas. *Acta Farm Bonaerense.* 2004; 23(3):277-84.
63. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health, Part C: Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2013; 27(2):120-39.
64. Silva Jd, Freitas TROd, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol.* 2000; 23(1):241-5.
65. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 2004;26(3):249-61.
66. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *The Lancet.* 1996;347:444-5.
67. King CM, Bristow-Craig HE, Gillespie ES, Barnett YA. In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75- to 80-year-old humans. *Mutat Res.* 1997; 377:137-47.
68. Poulsen HE, Loft S, Prieme H. Oxidative DNA damage In Vivo: relationship to age, plasma antioxidants, drug metabolism, glutathione-S-transferase activity and urinary creatinine excretion. *Free Rad Res.* 1998;29:565-71.
69. Hinokio Y, Suzuki S, Chiba M, Hirai A, Toyota T. Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. *Diabetologia.* 1999; 42:995-8.
70. Rehman A, Zadeh JN, Möller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Letters.* 1999; 448:120-2.
71. Foksinki M, Gackowski D, Rozalski R, Olinski R. Cellular level of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA does not correlate with urinary excretion of the modified base/nucleoside. *Acta Biochimica Polonica.* 2003;50(2):549-53

72. Wu LL, Chiou C-C, Chang P-Y, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004; 339:1-9.
73. Al-Baker EA, Oshin M, Hutchison CJ, Kill IR. Analysis of UV-induced damage and repair in young and senescent human dermal fibroblasts using the comet assay. *Mech Ageing Dev* 2005; 126:664-72.
74. Goodarzi MT, Navidi AA, Rezaei M, Babahmadi-Rezaei H. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type diabetes. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(2):72-6
75. Thukral K, Sharma R, Chandey M, Gandhi G. Essential Hypertension, DNA damage and dyslipidemia in two ethnic groups. *Int J Hum Genet*. 2012;12(2):105-11.
76. Gür M, Elbasan Z, Sahin DY, Koyunsever NY, Seker T, Ozaltun B, et al. DNA damage and oxidative status in newly diagnosed, untreated, dipper and non-dipper hypertensive patients. *Hypertens Res*. 2013;36(2):166-71.
77. Lee J, Lee M, Kim J-U, Song KI, Choi YS, Cheong S-S. Carvedilol Reduces Plasma 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Mild to Moderate Hypertension: A pilot study. *JAHA*. 2005:986-90.
78. Pilger A, Rüdiger HW. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006; 80:1-15.
79. Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(12):1601-14.
80. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutrition Reviews*. 1999; 57(4):104-13.
81. Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, et al. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutant Res*. 2005;574:58-66.

XIII. ANEXO



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA
PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN**



**RELACIÓN DE LA 8-OHdG Y DAÑO AL ADN COMO MARCADORES
INDIRECTOS DE LA OXIDACIÓN EN ADULTOS MAYORES DIABÉTICOS E
HIPERTENSOS.**

Antecedentes y Objetivo

El estrés oxidativo (EOx) es un estado donde la célula se encuentra alterada por la homeostasis entre prooxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros causando daño en las biomoléculas. Debido a que el ácido desoxirribonucleico (ADN) es de suma importancia en la información genética de un individuo, ha tomado importancia en el daño oxidativo que presenta y su relación con el envejecimiento, así como en el caso de las enfermedades crónico degenerativas entre ellas la diabetes mellitus y la hipertensión arterial.

Procedimiento

Se seleccionarán 207 adultos mayores no fumadores de ambos sexos pertenecientes entre 60 a 69 años del Estado de Hidalgo. Una vez seleccionados a los Se les tomarán 3 tubos de sangre con anticoagulante estado basal. Así como un frasco que contenga la primera orina de la mañana.

Condiciones para ingresar al estudio

- Personas que deseen participar en el estudio
- Adultos mayores de ambos sexos entre 60 a 69 años
- Sin el hábito de fumar o que consuman 2 o menos cigarrillos a la semana

Riesgos

No existe ningún riesgo agregado para su salud, las tomas de muestras sanguíneas serán llevadas a cabo por personal altamente capacitado y con experiencia, con agujas nuevas desechables en tubos al vacío.

Beneficios

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

Confidencialidad

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

Preguntas

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

Derecho a rehusar

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

CONSENTIMIENTO

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

Nombre y firma del participante _____

Nombre y firma de un familiar (testigo) _____

Nombre y firma del investigador (testigo) _____

México, D.F. a ____ de _____ del _____.

En caso de no saber leer y escribir, poner huella digital

