

51262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DAÑO AL ADN Y CAPACIDAD DE REPARACION EN LINFOCITOS DE ANCIANOS CON RELACION AL INDICE DE MASA CORPORAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS HUMANOS)

P R E S E N T A

MARTHA PATRICIA LEON REYES

DE ESTUDIOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL MENDOZA NUNO

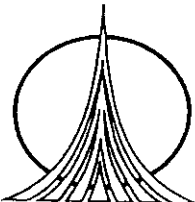


ZARAGOZA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES NOVEMBRE DEL 2001 INVESTIGACION

297865

MEXICO, D. F.



Unidad en la Diversidad: Zaragoza Frente al Siglo XXI



Universidad Nacional
Autónoma de México

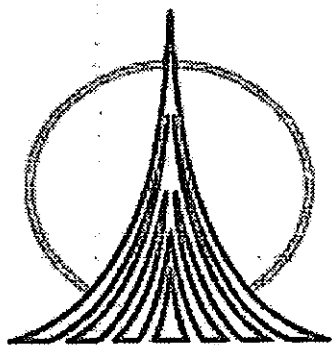


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Unidad en la Diversidad:
Zaragoza Frente al Siglo XXI

***A mis tres grandes e incalculables tesoros
Angel, Lizbeth y Javier,
las mejores bendiciones que DIOS me otorgo.***

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por haberme dado de principio a fin la fortaleza interior necesaria en este largo y difícil recorrido (02-1998 a 10-2001).

A mis amados padres **Sr. Ramiro León y Sra. Martha Reyes**, por que una vez mas me demostraron lo que yo significo para ustedes y juntos caminamos hasta obtener un éxito más.

Al Dr. *Víctor Manuel Mendoza Nuñez* por la asesoría prestada y la confianza depositada para la realización del presente trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial:

M. en IBSH Elia Roldan Reyes

M. en C. Bertha Molina Alvarez

Por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo y por las sugerencias hechas en los seminarios de investigación a lo largo del posgrado.

A los miembros del jurado:

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Por las grandes aportaciones hechas para la mejoría y complementación del escrito final.

A Raquel Retana Ugalde por su apoyo en el procesamiento de las muestras y su asesoría prestada para el conocimiento de la técnica del ensayo cometa.

Al Dr. *Xavier Chiappa Carrara*, Dr. *Edelmiro Santiago Osorio* y *Julio Roberto Cáceres Cortés Ph D* por su invaluable tiempo durante sus enseñanzas y asesoría proporcionadas, las cuales son reflejo de su gran capacidad intelectual.

COMITÉ TUTORAL

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez

M. en IBSH. Elia Roldan Reyes

M. en C. Bertha Molina Alvarez

JURADO DE EXAMEN

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez

M. en C. Bertha Molina Alvarez

M. en IBSH Elia Roldan Reyes

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" ZARAGOZA "**

División de Estudios de Posgrado e Investigación

**DAÑO AL ADN Y CAPACIDAD DE REPARACION EN LINFOCITOS DE
ANCIANOS CON RELACION AL INDICE DE MASA CORPORAL.**

El presente trabajo se realizó bajo el financiamiento de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP 1998-2000) y el apoyo financiero parcial del proyecto CONACyT 135580M.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	3
3.1 Transición Demográfica	3
3.2 Transición Epidemiológica	4
3.3 Cambios Biológicos Durante el Envejecimiento	8
3.4 Problemas Nutricionales del Adulto Mayor.....	8
3.4.1 Obesidad	12
3.4.2 Epidemiología de la Obesidad	13
3.4.3 Morbilidad y Mortalidad asociada con Obesidad	14
3.4.4 Etiología de la Obesidad	18
3.5 Teorías del Envejecimiento	22
3.5.1 Radicales Libres	23
3.5.2 Producción de RL en la Células	28
3.5.3 Daño a Biomoléculas	31
3.5.4 Defensas contra los RL	39
3.5.5 Envejecimiento y Estrés Oxidativo	45
4. Planteamiento del Problema	50
5. Hipótesis	51
6. Objetivo	51
7. Material y Métodos	52
8. Resultados	56
9. Discusión	65
10. Conclusiones	71
11. Referencias	72

1. RESUMEN

Antecedentes: El proceso de envejecimiento está asociado directamente con una mayor generación de radicales libres (R.L.) y consecuentemente con daño a biomoléculas entre las que se encuentra el ADN. Asimismo, en los últimos años varios estudios sobre el estado de nutrición y antioxidantes han reportado diversos beneficios en la prevención y/o recuperación de enfermedades crónicas degenerativas. De este modo, se señala en especial que la restricción calórica tiene varios efectos benéficos debido a que reduce el estado oxidativo y la generación de R.L., mejorando además el sistema antioxidante, procurando así un menor daño en el ADN y optimizando los mecanismos de reparación, de tal modo que el envejecimiento se curse con calidad de vida. Por lo anterior, es de suponerse que el sobrepeso propicie mecanismos opuestos a lo antes señalado, lo cual teóricamente se incrementa durante el envejecimiento, no obstante es necesario realizar investigación clínica con el fin de proponer recomendaciones a la población con sustento teórico científico.

Objetivo: Evaluar el nivel de daño y capacidad de reparación del ADN de una población de ancianos con sobrepeso y de peso bajo de la Ciudad de México.

Material y Métodos: Se llevó a cabo un estudio de tipo transversal y comparativo en una población de 130 ancianos mayores de 60 años (86 mujeres y 44 hombres) divididos en 3 grupos: 1. Peso normal (50 sujetos con IMC = 25.5 ± 0.9), 2. Peso bajo (30 sujetos con IMC = 22.3 ± 1.8) y 3. Sobrepeso (50 sujetos con IMC = 30.9 ± 3.01), a los cuales se les determinó el daño y capacidad de reparación de acuerdo a la técnica de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).

Resultados: Los datos más relevantes del estudio mostraron que el 56% de los hombres presentaron peso normal, mientras que en las mujeres el 55% presentó sobrepeso. Asimismo, el 42% de la población presenta daño al ADN siendo para sexo masculino el 57% y para el femenino el 35% con significancia estadística ($p = 0.01$).

Por otro lado, el 50% de los ancianos con peso normal y bajo, presentaron daño al ADN, mientras que los ancianos con sobrepeso solo el 30% presentó daño. Sin embargo, en la magnitud de daño al ADN el 13% de los sujetos con peso bajo y sobrepeso presentaron de 10 a 12% de células con daño a diferencia de los sujetos con peso normal donde solo el 4% presenta la misma magnitud. Los valores medio del núcleo y migraciones de la cola (sin núcleo) y total son semejantes en los 3 grupos de estudio, asimismo el sobrepeso no mostró ser un riesgo para presentar un daño en el ADN $\geq 40\%$.

Finalmente, en la capacidad de reparación, fueron los ancianos con peso bajo los que menor número de células con daño presentaron a los 120 minutos, no obstante los porcentajes de reparación son semejantes en la población de estudio, ya que no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Conclusiones: La mayoría de los ancianos no presenta daño al ADN sin embargo, la frecuencia de daño es similar en los 3 grupos de estudio. La capacidad de reparación en los ancianos con sobrepeso aunque un poco más lenta no es diferente de los sujetos con peso normal y bajo.

2. INTRODUCCION

El envejecimiento, se caracteriza por un declive progresivo en las funciones bioquímicas y fisiológicas de muchos órganos. Así, una de las teorías más notables que trata de explicar dicho declive es la teoría del envejecimiento por radicales libres, la cual propone que la pérdida del funcionamiento fisiológico asociado con el envejecimiento es debido a la acumulación de daño oxidativo en varias biomoléculas provocado por los radicales libres durante el transcurso de la vida. En este sentido, entre las biomoléculas afectadas por un estado oxidativo se encuentra el ADN cuya importancia homeostática es indiscutible, ya que es el almacén de la información genética que modula el funcionamiento armónico de todo el organismo. Asimismo, debido que la oxidación y producción de radicales libres son inevitables, ya que son parte integral del metabolismo celular, esta posee un complejo mecanismo de defensa denominado sistema antioxidante, que intenta controlar y/o minimizar la producción y acción de los radicales libres. Dicho balance oxidante – antioxidante se ve afectado por diversos factores entre los que se encuentran principalmente la dieta, el estado de nutrición, la actividad metabólica, las enfermedades, así como el envejecimiento. En este sentido, el exceso de peso corporal u obesidad esta asociada con un aumento en el riesgo de mortalidad prematura, así como en la incidencia de varias enfermedades crónico-degenerativas. Asimismo, un pre-requisito para el desarrollo de la obesidad es un balance energético positivo, trayendo como consecuencia una mayor actividad metabólica, la cual esta inversamente relacionada con la longevidad pero directamente unida con la generación de radicales libres y un estado oxidativo mayor en individuos envejecidos.

Por tal motivo, el presente estudio pretende evaluar la influencia del sobrepeso sobre el daño al ADN y capacidad de reparación en linfocitos de ancianos, para que los resultados permitan monitorear el estado de nutrición con el fin de lograr un envejecimiento exitoso.

3. MARCO TEORICO

El envejecimiento, un proceso biológico con múltiples incógnitas, se presenta de manera secuencial e irreversible en todos los organismos hasta hacerlo perder en su totalidad su capacidad de enfrentar las condiciones de su entorno, conduciendo a la muerte. No obstante, existen factores moduladores (principalmente los de tipo genético, social y ambiental) que en determinado momento pueden influir en la longevidad y las manifestaciones clínicas que caracterizan al anciano sano, de tal forma que el envejecimiento curse con calidad. Al respecto, el estado de nutrición constituye uno de los factores de mayor importancia para el mantenimiento de la homeostasis durante el envejecimiento.

Por tal motivo, a continuación se presenta la información teórica que permita analizar los problemas nutricionales en el contexto gerontológico, con el fin de precisar el problema y la hipótesis, respecto a la influencia de la obesidad sobre el posible daño al ADN en linfocitos de ancianos.

3.1 Transición Demográfica.

La transición demográfica se refiere al proceso por el cual una sociedad pasa de una situación de altas a bajas tasas de fecundidad y mortalidad, cuya consecuencia se traduce en una disminución de la mortalidad infantil y una redistribución de la pirámide poblacional.

De este modo, el reto que el mundo enfrentará en el siglo XXI en materia poblacional es incalculable, ya que a mediados de 1993 la población mundial total era de 5,579 millones y para el año 2000 se estima que habrá 8,260 millones de seres humanos, de los cuales aproximadamente el 14% serán mayores de 60 años¹. En números absolutos, la prospectiva demográfica para el año 2000 indican que en Latinoamérica, serán Brasil y México los lugares con mayor población anciana, siendo más de 20 millones para el primero y alrededor de 12 millones para el segundo².

Por su parte, la longevidad en el continente americano es muy heterogénea, ejemplo de ello son los contrastes mostrados en la esperanza de vida al nacer de 76 y 83 años para hombres y mujeres en Canadá en comparación con 47 y 52 para hombres y mujeres en Haití³. En nuestro país, dicho indicador sociodemográfico es de 70 años en hombres y 78 años en mujeres, por lo que México es considerado entre los países más longevos de América (Tabla 1)³.

La transición demográfica en nuestro país, muestra un incremento proporcionalmente mayor de la población anciana en las últimas décadas; en 1950 habitaban 1,419,685 personas mayores de 60 años, aumentando a 2,709,230 en 1970, a 5,969,643 en 1995, y teniendo 7,090,873 en el 2000, esperándose alrededor de 17 millones de ancianos para el año 2025^{4,5}.

Finalmente, el índice de envejecimiento definido como la cantidad de personas mayores de 60 años o más por cada 100 jóvenes menores de 15 años constituye un buen indicador de los cambios en la estructura poblacional, reportándose para México en 1997 un valor de 17 el cual se estima que se triplicara para el año 2025³.

3.2 Transición Epidemiológica.

Los cambios estructurales en la población debidos al aumento en la proporción de sujetos mayores de 60 años, generalmente acompañados por un incremento en las tasas de mortalidad a causa de enfermedades crónicas y degenerativas dejando en segundo plano los padecimientos infecto – contagiosos se denomina transición epidemiológica⁶.

En los países de América Latina y el Caribe, los patrones de morbilidad y mortalidad han cambiado ya que las enfermedades infecciosas y agudas están siendo superadas por las de tipo degenerativas. En este sentido, las

enfermedades cardiovasculares son la causa de mortalidad en 27 de los 37 países de América.

Tabla 1. Población y Esperanza de Vida en Países de América

País	Habitantes de 60 o más años		Porcentaje de 60 o más años		Años de esperanza de vida al nacer (1997)	
	1997	2025	1997	2025	Hombres	Mujeres
Argentina	4,946,759	8,303,040	13.8	17.2	71	78
Aruba	8,916	21,079	13.1	28.6	73	91
Barbados	34,047	67,718	13.2	24.3	72	77
Bolivia	488,412	1,202,703	6.4	10.0	57	63
Brasil	12,471,740	32,738,784	7.4	15.6	57	66
Canadá	4,947,621	10,521,953	16.3	27.7	76	83
Cuba	1,417,555	2,842,476	12.9	24.3	73	78
Ecuador	768,147	2,281,085	6.3	12.8	69	74
El Salvador	413,586	934,288	7.3	11.1	66	73
E.U.A	44,158,531	82,501,033	16.5	24.6	73	79
Guatemala	621,804	1,672,291	5.3	7.5	63	68
Guayana	46,769	95,957	6.6	13.5	57	62
Haití	418,916	721,246	6.3	7.1	47	52
Martinica	53,670	106,926	13.3	22.2	76	82
México	5,948,491	17,491,716	6.1	12.4	70	78
Nicaragua	184,598	607,172	4.1	7.5	64	69
Puerto Rico	526,307	975,438	13.8	23.1	71	80
San Vicente y Granadas	9,024	22,186	7.6	14.7	72	75

Fuente: Organización Panamericana de la Salud, 1998⁽³⁾.

En lo que respecta a México, en 1940 las enfermedades del corazón ocupa el noveno lugar de mortalidad y las seis primeras causas de muerte correspondían a padecimientos de tipo infeccioso (Tabla 2), las cuales han sido desplazadas por los padecimientos de tipo crónico degenerativo⁷, debido principalmente a la transición demográfica y a la sustancial mejoría en general en las condiciones de vida de la población.

Tabla 2. Evolución de las Principales Causa de Mortalidad Generales en México (1940 – 1990).

Orden	1940	1960	1980	1990
1	Diarrea y enteritis	Gastroenteritis y colitis	Accidentes	Enfermedades del corazón
2	Neumonía e influenza	Neumonía e influenza	Enf infecciosas intestinales	Tumores malignos
3	Paludismo	Enf proplas de la infancia	Neumonía e influenza	Accidentes
4	Sarampión	Enfermedades del corazón	Enfermedades del corazón	Diabetes mellitus
5	Homicidios	Accidentes	Tumores malignos	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal
6	Bronquitis	Tumores malignos	Enf cerebrovascular	Neumonía e influenza
7	Enfermedades del hígado y cirrosis billares	Homicidios	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	Enf infecciosas intestinales
8	Debilidad congénita, vicios de conformación congénitos	Bronquitis	Diabetes mellitus	Enf cerebrovascular
9	Enfermedades del corazón	Tuberculosis	Homicidios	Cirrosis y otras enf crónicas del hígado
10	Tuberculosis pulmonar	Cirrosis hepática	Bronquitis crónica, enfisema y asma	Homicidios

FUENTE: Secretaría de Salud, 1993⁽⁹⁾.

Por su parte, las principales causas de morbilidad en la población de mayores de 65 años (Tabla 3) son de tipo infeccioso, no obstante la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas demostró un alto porcentaje de subdiagnóstico de los padecimientos crónicos degenerativos^{8,9}, ejemplo de ello es una prevalencia del 54% de hipertensión arterial (HTA) en la población de 60 a 64 años, de los cuales únicamente el 17.9% sabían del diagnóstico, siendo esto además cercanamente similar para el grupo de 65 a 69 años cuya prevalencia de HTA fue del 58.5%.

Por último, entre las principales causas de muerte en los mayores de 65 años se encuentran las enfermedades del corazón, los tumores malignos, la diabetes mellitus y la enfermedad cerebrovascular, en cuya fisiopatología actualmente se señala al estado de nutrición y la producción de los radicales libres presentes.

Tabla 3. Diez Principales Causas de Enfermedades en el Grupo de 65 y más Años de Edad (Estados Unidos Mexicanos, 1996).

No	Padecimiento	Casos	Tasa*
1	Infecciones respiratorias agudas	880,771	21,310.2
2	Infecciones intestinales	224,154	5,423.4
3	Hipertensión arterial	124,281	3,007.0
4	Diabetes mellitus	74,138	1,793.8
5	Amibiasis intestinal	59,185	1,432.0
6	Neumonías y bronconeumonías	28,376	686.6
7	Otras helmintiasis	26,360	637.8
8	Enfermedades isquémicas del corazón	23,143	559.9
9	Enfermedades cerebrovasculares	18,659	451.5
10	Asma	16,332	395.2

*Tasa por 100,000 habitantes

Fuente: Secretaría de Salud, 1997⁽¹⁰⁾.

3.3 Cambios Biológicos Durante el Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso universal, presente en todas las especies a diferentes ritmos, considerado como un fenómeno biológico intrínseco modificable por factores ambientales, progresivo y generalmente incapacitante hasta llegar a la muerte¹⁰.

Si bien, el envejecimiento puede definirse y/o describirse, no es posible sin embargo precisar su inicio, ya que hasta el momento no existe un consenso ni marcadores precisos que así lo establezcan. Asimismo, no existe un acuerdo internacional uniforme respecto a la edad cronológica que se debe aceptar para considerar a un individuo como anciano, ya que el acuerdo adoptado por las Naciones Unidas en 1979 en Kiev, establece que los sujetos nacidos en países desarrollados serían considerados como viejos a partir de los 65 años, mientras que en los países en vías de desarrollo serían a partir de los 60 años, conduciendo esto a problemas estadísticos y científicos de comparabilidad. Por tanto, es importante señalar que la edad cronológica es un indicador arbitrario de envejecimiento y no constituye un buen predictor de envejecimiento biológico y psicológico, ya que los factores genéticos y ambientales se combinan propiciando una individualización de dicho proceso¹¹.

Finalmente, es importante conocer los parámetros clínicos que permiten distinguir entre el envejecimiento normal y el patológico sin olvidar que este proceso es individualizado y los ancianos no necesariamente presentan todos los cambios fisiológicos y clínicos esperados para esta importante etapa de la vida (Tabla 4)¹²⁻¹⁴.

3.4 Problemas Nutricionales del Adulto Mayor

La nutrición, entendida como el conjunto de funciones armónicas y coordinadas entre sí, de tipo bioquímico y fisiológico, esta presente en cada una de las células, de la cuales dependen la composición corporal, la salud y

Tabla 4. Características Clínicas del Envejecimiento.

Organo o sistema	Cambios morfofisiológicos	Características clínicas
Piel	<ul style="list-style-type: none"> • Atrofia de la epidermis; de las glándulas sudoríparas; folículos pilosos y uñas. • Cambios pigmentario • Hiperqueratosis epidérmica • Degeneración del colágeno y de las fibras elásticas • Esclerosis arteriolar • Disminución de grasa subcutánea • Aumento de la fragilidad capilar 	<ul style="list-style-type: none"> • Arrugas, resequedad, susceptibilidad a los traumas y úlceras de decúbito, prurito, encanecimiento y caída de pelo. • Uñas frágiles, engrosadas, torcidas y de lento crecimiento. • Placas seborréicas • Disminución de las propiedades de aislamiento de la piel
Olfato, gusto y fonación	<ul style="list-style-type: none"> • Atrofia de las mucosas • Hipotrofia de papilas gustativas (las papilas se reducen en un 64% a la edad de 75 años) • Atrofia y pérdida de elasticidad de los músculos y cartílagos laríngeos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Deterioro del sentido del gusto y olfato • Disminución de la sensibilidad al reflejo de la tos y la deglución • Cambios en la voz
Sistema cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de elasticidad de la media arteria con hiperplasia de la íntima • Incompetencia valvular venosa • Calcificaciones en las válvulas cardiacas • Rigidez de las paredes venosas • Depósitos de lipofucsina y fibrosis del miocardio • Aumento de la resistencia periférica • Disminución del gasto cardiaco • Deterioro de la microcirculación 	<ul style="list-style-type: none"> • Dilatación y prominencia de la aorta • Presencia de soplos cardiacos • Predisposición a los eventos tromboembólicos • Disminución en la capacidad de la actividad física • Insuficiencia venosa, con el consecuente riesgo de estasis y úlceras tróficas • Transtornos de la microcirculación periférica
Sistema endócrino	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la tolerancia a glucosa • Disminución de la actividad funcional tiroidea • Cambios en la secreción de la hormona antidiurética 	<ul style="list-style-type: none"> • Predisposición a la descompensación en los enfermos diabéticos • Respuestas metabólicas lentas • Respuesta lenta a los cambios de la osmoralidad corporal

Tabla 4. Características Clínicas del Envejecimiento.

Organo o sistema	Cambios morfofisiológicos	Características clínicas
Sistema nervioso central	<ul style="list-style-type: none"> • Engrosamiento de las meninges • Hipotrofia cerebral (el peso del cerebro disminuye en 10%) • Disminución de los procesos dendríticos • Reducción de la sustancia blanca • Disminución de la velocidad de conducción • Aumento del tiempo de respuesta refleja 	<ul style="list-style-type: none"> • Lentitud en las respuestas intelectuales como agilidad mental y capacidad de razonamiento abstracto • Disminución de la memoria de corto plazo y alguna pérdida en la habilidad de aprendizaje • Entretorcimiento de la coordinación sensoriomotora que produce un deterioro en los mecanismos que controlan la postura, el soporte antigravitacional y el balance
Inmunidad	<ul style="list-style-type: none"> • Involución tímica • Inmunidad celular: disminución de la capacidad funcional de los linfocitos T y descenso de la secreción interleucina • Inmunidad humoral: descenso de la respuesta de anticuerpos • Aumento en los niveles de autoanticuerpos 	<ul style="list-style-type: none"> • Alergia cutánea • Aumento del riesgo de reactivación de tuberculosis y herpes zoster • Mayor incidencia de neoplasias • Menor respuesta a antígenos externos
Sistema locomotor, músculos, huesos y articulaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Atrofia muscular y disminución del impulso nervioso que mantiene el tono muscular • Osteopenia que puede llegar a la osteoporosis • Cambios degenerativos en ligamentos, tejidos periarticulares y cartílago • Engrosamiento sinovial 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de masa muscular • Predisposición de calambres musculares • Predisposición para el desarrollo de hernias • Debilidad muscular • Xifosis • Disminución de la estatura • Disminución de la elasticidad y resistencia de las articulaciones • Rigidez articular y predisposición al dolor

Fuente: Anzola 1993⁽¹²⁾; Lozano, 1992⁽¹³⁾; Salgado, 1996⁽¹⁴⁾.

por tanto, la vida misma, es consecuencia de factores biológicos, psicológicos y sociales^{15,16}.

La composición corporal también cambia con la edad, y se produce comúnmente una disminución en la masa magra y mineral, acompañada de un incremento en la proporción y acumulación de grasa en el organismo. Asimismo, la disminución de la masa magra e incremento de la grasa corporal que se observa durante el envejecimiento puede deberse a cambios hormonales, alteraciones metabólicas y cambios en la ingesta y gasto energético¹⁷⁻¹⁹.

Asimismo, en el ámbito social se han identificado diversos mitos con relación a los alimentos del anciano considerado como normal ciertos cambios alimentarios que son originados por normas culturales y/o problemas socioeconómicos, tales como el consumo de papillas, atoles, caldos y pan, generando una disminución o desbalance en la ingesta calórico – proteica, vitaminas y minerales, además de la influencia que el anciano tiene sobre la percepción de su estado de salud, el cual en gran medida determina la elección de sus alimentos lo que al final se ve reflejado en su verdadero estado nutricional²⁰⁻²³.

Por otro lado, la malnutrición definida como un estado de equilibrio negativo entre el aporte de nutrientes a los tejidos y sus requerimientos mínimos, debido a una ingesta inapropiada (falta o exceso) en la dieta o bien a una utilización inadecuada de ésta por el organismo, puede clasificarse en dos grandes grupos²⁴⁻²⁶:

- I) Desnutrición: caracterizada por una carencia significativa de macro y micronutrientes.
- II) Obesidad: o sobre nutrición calórico – lipídica que puede acompañarse de carencias proteicas y micronutrientes.

Es importante señalar que la magnitud e impacto de los problemas nutricionales varían considerablemente dependiendo principalmente de la edad, el sexo, estado socioeconómico y país en que se radique.

3.4.1 Obesidad.

La obesidad causa o potencializa muchos de los problemas de salud, independientemente y / o en asociación con otras enfermedades. En particular, esta asociada con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, enfermedades coronarias, hiperlipidemias, hipertensión arterial, en el incremento de incidencia de ciertas formas de cáncer, complicaciones respiratorias (apnea del sueño obstructiva) y osteoartritis ^{27,28,29}; de tal forma que estudios epidemiológicos han confirmado que el aumento en los grados de sobrepeso u obesidad son importantes predictores para una disminución en la longevidad. Por tal motivo, la obesidad puede ser definida como una *enfermedad en la cual el exceso de grasa corporal fue acumulado de tal forma que la salud puede verse severamente afectada* ²⁷.

En la práctica clínica, la grasa corporal es muy común y simplemente determinada usando una fórmula que combina el peso y la talla. El fundamento de esta relación, basado en las principales variaciones en el peso para personas de la misma estatura es debido a la masa grasa y la fórmula más frecuentemente usada en estudios epidemiológicos es el índice de masa corporal (IMC). Este permite hacer comparaciones significativas del estado del peso dentro y entre poblaciones e identificar individuos y grupos de riesgo para morbilidad y mortalidad ^{27,28}. Los puntos de corte para la clasificación de sobrepeso, propuestos por un comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para todos los grupos de edad en adultos se presentan en la tabla 5 ^{27,30}. No obstante, para población gerontológica los puntos de corte se han modificado, considerándose como personas con peso normal aquellas que se presentan IMC en un intervalo de 24 a 27³¹.

3.4.2 Epidemiología de la Obesidad.

El sobrepeso y la obesidad, establecidos por un IMC de 25 a 30 kg/m² y de 30 Kg/m² o más respectivamente, han sido estimados en más de la mitad de la población adulta con edades entre 35 y 65 años que viven en Europa. En este sentido, el sobrepeso es más común entre los hombres que entre las mujeres pero la obesidad es más común entre las mujeres. Asimismo, la prevalencia de obesidad va del orden del 15%, con un intervalo del 10 al 20% en los hombres, mientras que en las mujeres es del orden del 22% con un intervalo del 15 al 25%³⁰.

Tabla 5. Puntos de Corte Propuestos por un Comité de la OMS para la Clasificación de Sobrepeso*

IMC (Kg/m ²)	Clasificación de la OMS	Descripción Popular
< 18.5	Bajo peso	Delgada
18.5 - 24.9	-----	Sana, Normal, Aceptable
25.0 - 29.9	Sobrepeso Tipo I	Sobrepeso
30.0 - 39.9	Sobrepeso Tipo II	Obesa
≥ 40.0	Sobrepeso Tipo III	Obesidad Mórbida

* Los datos aquí presentados son el reflejo de conocimientos adquiridos a lo largo de estudios epidemiológicos en países desarrollados.

Fuente: Kopelman, 2000⁽²⁷⁾; Seidell, 1997⁽³⁰⁾.

Por su parte, en los Estados Unidos de Norteamérica la prevalencia de obesidad ha aumentado del 12% en 1991 a 17.9% en 1998, con un constante incremento en todos los estados socioeconómicos, en ambos sexos y a través de los grupos de edad, razas y niveles de educación (Tabla 6)^{30,31}.

En México, por su parte, la información sobre este aspecto es muy escasa. En 1983, Álvarez señaló una prevalencia de 50 y 60% para población urbana y suburbana de nutrición inadecuada. Asimismo, se reporta que el 33.5% en hombres y 52.6% en mujeres de 60-69 años a nivel nacional presentan obesidad^{33,34}.

3.4.3. Morbilidad y Mortalidad asociada con Obesidad.

El exceso de peso esta acompañada tanto de una multiplicidad de problemas (Tabla 7) como de profundos cambios en la función fisiológica del organismo. Estos cambios hasta cierto punto, dependen principalmente de la distribución del tejido adiposo. En general, la obesidad produce alteraciones en el volumen total de sangre y la función cardíaca, mientras que la distribución de grasa alrededor de la caja torácica y abdomen limita la excursión respiratoria y, por tanto, altera la función respiratoria. La deposición intra-abdominal visceral de tejido adiposo, es el principal contribuyente para el desarrollo de hipertensión, concentraciones de insulina plasmática elevadas, resistencia a la insulina, desarrollo de diabetes millitus e hiperlipidemias^{27,35,36}.

Tabla 6. Cambios en la Prevalencia de Obesidad en Adultos*.

Característica	1991	1998	% de Aumento
SEXO			
Hombre	11.7	17.7	51.5
Mujer	12.2	18.1	47.4
EDAD			
18-29	7.1	12.1	69.9
30-39	11.3	16.9	49.5
40-49	15.8	21.2	34.3
50-59	16.1	23.8	47.9
60-69	14.7	21.3	44.9
≥ 70	11.4	14.6	28.6
RAZA			
Blanca	11.3	16.6	47.3
Negra	19.3	26.9	39.2
Hispánica	11.6	20.8	80.0
Otra	7.3	11.9	62.0

* Los datos son presentados como porcentajes medios.

Fuente: Mokdad, 1999⁽³²⁾.

En este aspecto, datos recientes sugieren que la población anciana generalmente suele ser obesa, debido a que tienden a ganar peso con el tiempo. Además, la localización de la grasa en los ancianos, se presenta comúnmente en el área de la cintura el cual es un importante determinante en

el índice de mortalidad. De igual manera, durante el proceso de envejecimiento, la grasa visceral (aquella que se deposita alrededor de los intestinos) es un problema particular de la población anciana, debido a que estudios longitudinales han demostrado que el envejecimiento esta asociado con una desproporcionado aumento en la grasa visceral comparada con la subcutánea, asociado además con una pérdida de masa muscular^{37,38}.

Por tal motivo, a continuación se describirán las interacciones de la obesidad con los principales problemas de salud presentes en el envejecimiento.

Tabla 7. Padecimientos Mórbidos Asociados con la Obesidad.

APARATO O SISTEMA	
Cardiovascular:	Mama:
<ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión - Enfermedad coronaria - Enfermedad cerebrovascular - Venas varicosas - Trombosis venosa intensa 	<ul style="list-style-type: none"> - Cáncer de mama - Ginecomastia masculina
Respiratorio:	Útero y Sistema Urológico:
<ul style="list-style-type: none"> - Apnea del sueño - Síndrome de hipoventilación 	<ul style="list-style-type: none"> - Cáncer endometrial - Cáncer cervical - Cáncer de próstata - Incontinencia urinaria
Gastrointestinal:	Piel y Músculo Esquelético:
<ul style="list-style-type: none"> - Hernia hiatal - Cálculos y coleditiasis - Cirrosis e hígado graso - Hemias - Cáncer colorectal - Hemorroides 	<ul style="list-style-type: none"> - Salpullido - Infecciones por hongos - Linfoedema - Celulitis - <i>Acanthosis nigricans</i> - Osteoartritis y Gota
Metabólicos:	Endocrino:
<ul style="list-style-type: none"> - Hiperlipidemias - Resistencia a la insulina - Diabetes mellitus - Hiperandrogenización - Irregularidades menstruales 	<ul style="list-style-type: none"> - Hormona del crecimiento reducida - Respuesta a la prolactina reducida - Hormonas sexuales alteradas - Cortisol urinario libre aumentado

Fuente: Jung, 1997⁽²⁸⁾.

Diabetes Mellitus: Muchos de los pacientes diabéticos no insulino dependientes presentan sobrepeso, siendo alrededor del 75% en muchos estudios. Asimismo, el IMC es el predictor dominante para el riesgo de desarrollar diabetes. En mujeres el riesgo se eleva por encima de un IMC = 22, siendo de 5 veces para un IMC de 25, 28 veces para un IMC de 30 y 93 veces mayor para un IMC de 35. Por su parte, la tasa de prevalencia para mujeres con edad de 55 años o más es de 5.8 con un intervalo de confianza de 4.2 – 7.4. Al mismo tiempo, comparado esto con mujeres de peso estable, una ganancia de 8 a 10.9 Kg aumenta el riesgo de diabetes en 2.7 veces más. De igual forma, estos riesgos se han encontrado de manera semejante en hombres y para todos los niveles de IMC de 24 o más, pero con una tasa de prevalencia de 3.4 y un intervalo de confianza de 1.1 a 8.3 ^{28,39}.

Enfermedad Cardiovascular: Un número de factores de riesgo cardiovascular están influenciados por el sobrepeso incluyendo la hipertensión, dislipidemias, factores homeostáticos. Hasta hace poco, se sabía que únicamente severos grados de exceso en el peso corporal aumentaban el riesgo de presentar enfermedad coronaria. Sin embargo, evidencia reciente ha mostrado una clara asociación con una modesta ganancia de peso. Así, en el estudio de Nurses', Willett encontró que el riesgo de enfermedad coronaria se incrementa 2 veces más en mujeres con un IMC entre 25 y 28.9 y 3.6 veces para aquellas con IMC de 29 o más ³⁹. En hombres por su parte, un 10% de aumento en el peso incrementa el riesgo de enfermedad coronaria en un 38%, mientras un 20% de peso aumentado corresponde con un 86% mayor de riesgo ²⁸.

Problemas Respiratorios: Un incremento en la cantidad de tejido adiposo en el tórax y abdomen tiene un efecto predecible sobre las propiedades mecánicas del tórax y el diafragma, conduciendo a una excursión respiratoria durante la inspiración y expiración, reduciendo el volumen del pulmón y alterando el patrón de ventilación de cada región. En resumen, el aumento de la masa grasa conduce a una disminución en el complicado sistema respiratorio de todo el cuerpo ^{27,28}.

Cáncer. Existen diversas evidencias entre el desarrollo de cáncer y el exceso de peso corporal (Tabla 8). Si bien, la relación entre el cáncer de mama y la obesidad no es del todo clara, la Sociedad Americana de Cáncer encontró que aunque la tasa de mortalidad para dicho cáncer no fue significativa, la edad sí presentó un impacto significativo sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama. De este modo, las mujeres obesas premenopáusicas tuvieron el mismo riesgo que las mujeres delgadas, pero en las postmenopáusicas, las mujeres obesas exhibieron un riesgo mayor ^{41,42}, además de que la obesidad abdominal y una historia familiar positiva incrementan este riesgo²⁸.

Tabla 8. Riesgo de Mortalidad por Cáncer y Obesidad*.

Tipo de Cáncer	Hombres	Mujeres
En cualquier sitio	1.33	1.55
Colorectal	1.73	-----
Próstata	1.29	-----
Vesícula y Vías Biliares	-----	3.58
Endometrio	-----	5.42
Cerviz	-----	2.39
Ovario	-----	1.63

* Los riesgos presentados son comparados de aquellos que ganaron 140% o más del peso ideal (100%) con aquellos que ganaron entre 90 y 109% del ideal.

Al mismo tiempo, un estudio longitudinal por 12 años realizado en 750,000 hombres y mujeres en los Estados Unidos reveló que el cáncer colorectal fue el principal causante de mortalidad excesiva por cáncer en hombres obesos (tasa relativa de 1.73 en hombres y 1.22 en mujeres), mientras que en las mujeres, la alta prevalencia fue del cáncer de vesícula y vías biliares (mortalidad relativa de 3.6). Asimismo, la tasa de mortalidad para el cáncer de estómago y páncreas fue mayor para los hombres obesos (1.86 y 1.62 respectivamente) que para las mujeres, donde la tasa de mortalidad para el cáncer de estómago es de 1.03 y para el páncreas 0.61. De igual modo, se encontró que el riesgo relativo para el cáncer endometrial es más del doble en mujeres de 60 - 69 años con un índice de masa corporal entre 25 y 29 Kg/m² y que este se incrementa 5.4 veces más en aquellas con obesidad significativa ^{28,40}. Por último, el riesgo de mortalidad para el cáncer de próstata fue de 1.29

en hombres obesos, mientras que el de cervix y ovarios en las mujeres obesas es de 2.39 y 1.63 respectivamente²⁸.

Por lo anteriormente mencionado, es necesario reiterar que la obesidad no es un estigma social sino una enfermedad actual presente en todas los tipos de sociedades, edades y grupos étnicos la cual, compromete seriamente la homeostasis de los individuos.

3.4.4 Etiología de la Obesidad.

La obesidad no es un desorden sencillo, sino un grupo de condiciones heterogéneas con múltiples causas, cada una de las cuales son expresadas finalmente como un fenotipo obeso. Dentro de los determinantes etiológicos se pueden mencionar ^{27,43}.

- I) Desórdenes endócrinos e hipotalámicos
- II) Condiciones genéticas
- III) Factores ambientales e influencias psicosociales
- IV) Mediadores fisiológicos (consumo y gasto energético)

I) Desórdenes endócrinos e hipotalámicos: Se ha establecido que un número de desórdenes pueden contribuir al desarrollo de la obesidad, no obstante estos representan únicamente una muy pequeña proporción de los casos totales. El más común y sencillo de los desórdenes de este grupo es el hipotiroidismo, en el cual la ganancia de peso ocurre primeramente como una consecuencia en la disminución del gasto energético. Otros desordenes incluyen al Síndrome de Cushing's así como alteraciones en el metabolismo de los corticoesteroides, desordenes de las hormonas sexuales, insulinoma y deficiencia en la hormona de crecimiento. Asimismo, los tumores hipotalámicos o daño en esta parte el cerebro como una consecuencia de irradiación, infección o trauma puede también conducir a la obesidad aparentemente debido a un defecto en el control del apetito y subsecuentemente hiperfagia ⁴³.

II) Consideraciones genéticas: A nivel poblacional, el componente genético de la obesidad es expresado en términos de herencia. Este, se refiere a la proporción de la variación total de un carácter el cual es atribuido a factores genéticos. La heritabilidad de la obesidad puede ser considerada tanto en términos de adiposidad total del individuo o de la distribución de la grasa corporal⁴³. De tal forma, que datos del Estudio Familiar de Quebec sugieren que el tamaño de las fuentes de grasa interna son más poderosamente influenciadas por factores genéticos que por depósitos de grasa subcutánea. El análisis familiar sugiere que los factores genéticos pueden explicar el 37% de la varianza en la tasa del grosor de los pliegues cutáneos en las extremidades y el tronco⁴³.

La evidencia combinada de estos análisis genéticos sugieren que la obesidad es un desorden poligénico y que una considerable proporción de la variabilidad es no aditiva. Asimismo, estas influencias genéticas parecen operar a través de genes susceptible, los cuales incrementan el riesgo para desarrollar una característica, pero no son esenciales para su expresión o por sí mismos, suficientes para explicar el desarrollo de la enfermedad^{27,43}.

Por su parte, los genes candidatos, definidos como la parte del ADN que dirige la síntesis de una cadena polipeptídica específica cercanamente asociada con una enfermedad particular, pueden ser elegidos para su posible efecto sobre la composición de la grasa corporal, distribución anatómica de la grasa, consumo de alimentos y gasto energético. Los genes candidatos los cuales son asociados con el fenotipo de obesidad incluyen: receptor β_3 adrenergico, lipoprotein lipasa, receptor D_2 de la dopamina, receptor de los glucocorticoides, factor de necrosis tumoral (TNF) y apolipoproteínas B, D, así como el gen *ob* que codifica para la leptina^{27,43,44}.

III) Factores ambientales: Los factores ambientales pueden jugar un papel crítico en el desarrollo de la obesidad, ya sea por un enmascaramiento genético o por susceptibilidades metabólicas. Así, interacciones genéticas ambientales pueden sugerir que las diferencias en la susceptibilidad genética dentro de una población pueda determinar cuales individuos son más

probables de ser obesos. De tal modo, que tales efectos pueden incluir una alterada sensibilidad gastrointestinal en la actividad del sistema nervioso simpático o patrones espontáneos de actividad física por lo que, las influencias ambientales actúan vía un aumento en el consumo energético y/o disminución del gasto energético^{27,43,45}.

IV) Mediadores Fisiológicos:

* Gasto energético.- Estudios en animales han sugerido que durante la sobrealimentación un incremento significativo en la tasa metabólica puede disipar el exceso de energía reduciendo así, la ganancia de peso por debajo de los valores teóricos. Al mismo tiempo, animales genéticamente obesos ganan más peso que los controles delgados aún cuando ellos sean alimentados a la par, implicando esto una gran eficiencia metabólica. Un posible mecanismo para dicho efecto es una disminución en la termogénesis inducida por la dieta, el cual es atenuado en modelos animales para obesidad debido a una disminución en la actividad simpática del tejido adiposo. Estos efectos inequívocos sobre el gasto de energía en animales obesos, contrastan con la escasa evidencia en humanos. Sin embargo, en humanos obesos, ha habido persistentes reportes de una anomalía baja en el consumo energético, el cual indirectamente implica que allí debe haber un defecto del gasto energético. Asimismo, la tasa basal metabólica (definida como la energía consumida por un individuo en reposo, seguido de un ayuno nocturno, a una temperatura ambiental confortable dentro de un rango termoneutral), es mayor en los sujetos obesos que en sus contrapartes delgadas. Además, la actividad física, representando el mayor componente variable del gasto energético y el cual puede llegar a representar del 20 – 50 % del gasto total energético, en sujetos obesos con IMC > 35 esta grandemente reducida⁴³.

* Consumo energético.- El fracaso para identificar un defecto en el control metabólico del gasto energético, y la observación contraria de altos niveles de dicho gasto en sujetos obesos ha conducido al enfoque sobre el consumo de alimentos para explicar la etiología de la obesidad. El incremento en el gasto energético asociado con el desarrollo de la obesidad

automáticamente ayudaría a prevenir la continua ganancia de peso y por tanto, el fallo en este sistema auto-regulatorio sugiere que ahí debería ser considerado el error en la regulación del consumo de energía. Además, las personas delgadas habitualmente son capaces de regular el consumo a la par de sus requerimientos energéticos dentro de un gran rango, mientras que los individuos obesos parecen ser incapaces de lograr este balance ⁴³.

El progreso en el entendimiento del papel del consumo de energía en la etiología de la obesidad han sido seriamente confundidos por la profunda inconsistencia de los reportes, la cual es en la actualidad ampliamente reconocida como una característica de la obesidad. Dicha inconsistencia en los reportes puede deberse al número de causas, aunque la más comúnmente señalada es debido a que los individuos cambian sus hábitos alimenticios como una consecuencia de la presión para recordar el consumo de sus alimentos. No obstante, existe una buena evidencia de que los macronutrientes individuales (proteínas, grasas y carbohidratos) ejercen diferentes efectos sobre el comportamiento alimenticio predominantemente por el resultado de sus efectos sobre la saciedad. Estudios experimentales en la manipulación de alimentos y análisis retrospectivos de recordatorios dietéticos, sugieren que las proteínas son las principales saciadoras, seguidas de los carbohidratos y por último las grasas. Asimismo, sujetos en situaciones experimentales fácilmente sobrecomen cuando están presentes ante alimentos ricos en grasas, lo cual puede ocurrir dentro de una simple comida y ha sido descrito como una alta hiperfagia de grasas o un sobreconsumo pasivo ^{27,46}.

Finalmente, la obesidad es probablemente una de las enfermedades más complejas con respecto a su etiología. La visión simplista de que la obesidad se desarrollara únicamente cuando el consumo de energía excede al gasto energético sobre un periodo prolongado ocultaría las múltiples influencias que sobre ellas hay e ignoraría el potencial de la predisposición genética y cultural.

3.5 TEORIAS DEL ENVEJECIMIENTO.

El envejecimiento es la acumulación de cambios responsables de una secuencia de alteraciones que acompañan el avance de edad, los cuales están asociados en un progresivo aumento en el cambio de enfermedad y muerte. Estos cambios pueden ser atribuidos a enfermedades, medio ambiente, disfunción inmune y al nacimiento de un nuevo proceso, el envejecimiento. Así, dichos cambios son aparentemente inalterables con una tasa de aumento exponencial conforme avanza la edad⁴⁷. De este modo, existen muchas teorías (más de 300) que han sido propuestas para tratar de explicar el fenómeno del envejecimiento, sin embargo, ninguna es generalmente aceptada. De hecho, se duda que una sola teoría pueda explicar todos los mecanismos del envejecimiento (Figura 1)⁴⁸⁻⁴⁹.

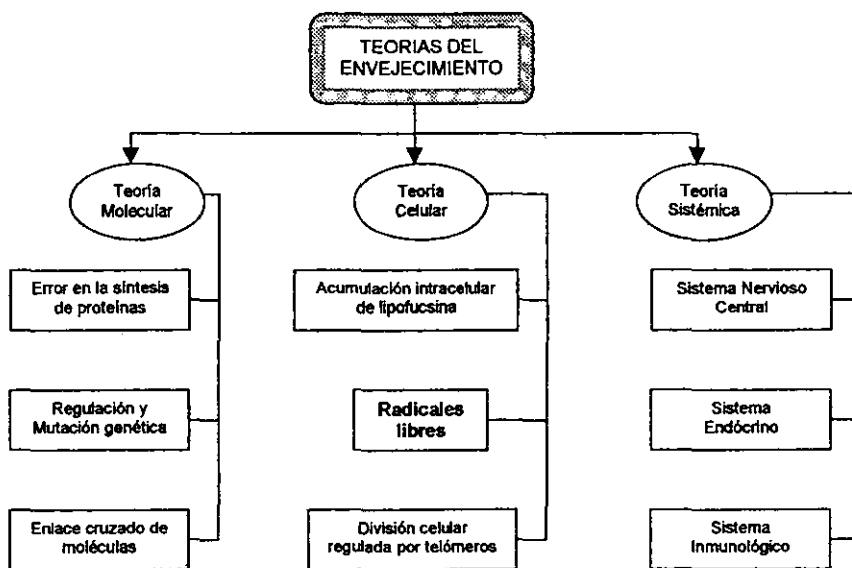


Figura 1. Teorías del envejecimiento.

Fuente: Brink, 1995⁽⁴⁸⁾.

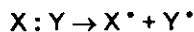
De entre las diversas teorías, la de daño por radicales libres muestra una esperanza de aplicación en la actualidad. Esta fue primeramente propuesta por Harman en 1956, la cual se basó en la premisa de que un simple proceso, que es modificable por factores genéticos y ambientales, fuera el causante del envejecimiento y la muerte de los seres vivos⁵⁰. La teoría postula que el envejecimiento es causado por reacciones de radicales libres que pueden estar involucrados en la producción de cambios asociados con el ambiente, las enfermedades y el proceso intrínseco de envejecer^{47,50}.

De este modo, la obesidad la cual esta asociada con un aumento en el riesgo de mortalidad prematura, así como en la incidencia de varias enfermedades crónico – degenerativas se caracteriza por la presencia de una mayor actividad metabólica, la cual esta inversamente relacionada con la longevidad pero directamente unida con la generación de radicales libres, que a la par con el proceso de envejecimiento genera un estado oxidativo mayor en individuos envejecidos^{51,52}. Por tal motivo, es importante considerar como la producción de radicales libres puede afectar la pérdida del funcionamiento fisiológico del organismo, asociado con el envejecimiento, debido al daño oxidativo crónico acumulado en las biomoléculas.

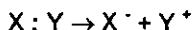
3.5.1 Radicales Libres.

Un radical libre (RL) es una molécula o átomo que contiene uno o más electrones desapareados. Este electrón desapareado altera la reactividad química de la molécula o átomo, haciéndola mucho más reactiva que su correspondiente no radical, la reactividad química de los radicales varía enormemente⁵³⁻⁵⁵. Como tal los RL pueden ser formados por 3 vías:

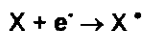
1. Ruptura homolítica de una enlace covalente en una molécula normal, donde cada fragmento retiene a uno de los electrones (e^-) apareados:



2. Fisión heterolítica, en la cual los e^- del enlace covalente son retenidos por sólo uno de los fragmentos de la molécula, aunque esto no origina propiamente un RL sino iones, los cuales se encuentran cargados:



3. Transferencia de electrones, donde se presenta la adición de un e^- solitario a una molécula normal, esta transferencia de e^- es más común en los sistemas biológicos que la fisión homolítica, la cual generalmente requiere de alta energía o de altas temperaturas, luz U.V o radiaciones ionizantes:



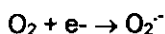
Los RL pueden estar cargados positivamente, negativamente o ser electricamente neutros. Los e^- no apareados y la naturaleza radical de las especies son indicadas convencionalmente con un punto (\bullet) a manera de superíndice. Ejemplos de moléculas RL incluyen^{56,57}:

- Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)
- Hidroxilo (OH^{\bullet}) e hidropéroxilo (HOO^{\bullet})
- Peroxilo (RO_2^{\bullet})
- Alcoxil (RO^{\bullet})
- Óxidos de nitrógeno (NO , NO_2 , $ONOO^{\bullet}$)
- Tioil o con centro de azufre (RS^{\bullet})

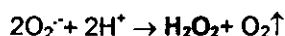
En general los RL pueden reaccionar con otros radicales y con moléculas no radicales. Cuando dos radicales se llegan a encontrar, ellos pueden combinar sus e^- desapareados y formar un enlace covalente. Cuando los RL reaccionan con moléculas no-radicales lo hacen casi siempre de 3 maneras: i) *un radical puede donar el e^- desapareado a un no-radical (reducción del radical)*, ii) *puede tomar un e^- de otra molécula y aparearse (oxidación del radical) o iii) simplemente juntarse a un no radical*. Cualquiera de estos 3 tipos de reacciones que ocurran, las moléculas no-radicales se convertirán en radicales. Una característica de las reacciones de los RL con no

radicales es que tienden a actuar como reacción en cadena, donde un radical da origen a otro ^{54,58}.

Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).- Los RL más importantes dentro de los sistemas biológicos son los radicales con centro de oxígeno y su interacción con especies nitrogenadas. La reacción del oxígeno por transferencia de un e⁻ producirá el anión radical libre superóxido (O₂⁻) ^{64,65,68}:



Sin embargo, las reacciones dañinas no son creadas por el superóxido sino por el radical hidroxilo (OH^{*}) y el anión peroxinitrito (ONOO⁻). En soluciones acuosas el superóxido puede reaccionar con óxido nítrico y formar anión peroxinitrito y/o producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por medio de una reacción de dismutación (los reactantes RL producen productos no radicales):



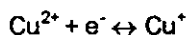
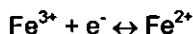
Esta reacción puede tener lugar de manera espontánea, pero "in vivo" es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El H₂O₂ no es un RL sino que cae dentro de la categoría de especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen no sólo radicales libres de oxígeno sino también derivados oxigenados no-radicales que están involucrados en la producción de radicales de oxígeno.

El H₂O₂ es un importante componente en la bioquímica de los RL ya que si no es eliminado por las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa, pueden producir el más reactivo y dañino de los RL generados en presencia de iones de transición: el radical hidroxilo (OH^{*}) ^{53,55}:

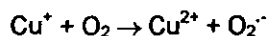
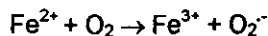


La reacción de arriba se le conoce como reacción de Fenton catalizada por hierro. El radical hidroxilo, puede también abstraer átomos de hidrógeno de muchas moléculas biológicas, incluyendo los tioles, resultando en la formación de radicales con centro de azufre (radicales thyl), los cuales pueden combinarse con el oxígeno y generar radicales oxisulfuro como $\text{RSO}_2\cdot$ y $\text{RSO}\cdot$, los cuales dañan moléculas biológicas.

Asimismo, los iones metálicos de transición que poseen números de oxidación variable como el hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}) y el cobre (Cu^+ y Cu^{2+}) combinan estados de oxidación que involucra la aceptación y donación de electrones simples:



De este modo, los iones metálicos de transición son notablemente buenos promotores de reacciones de radicales libres. El hierro ferroso (Fe^{2+}) y el cobre cuproso (Cu^+) son mucho más reactivos con el H_2O_2 que sus contrapartes oxidados, férrico (Fe^{3+}) y cúprico (Cu^{2+}) respectivamente. Además la auto-oxidación de dichos metales reducidos también puede generar anión superóxido ^{54,55,58}.



De esta manera las reacciones de los iones metálicos de transición con el oxígeno pueden ser consideradas como reacciones redox reversibles y son extremadamente importantes en la producción de RL (Figura 2)⁵⁹.

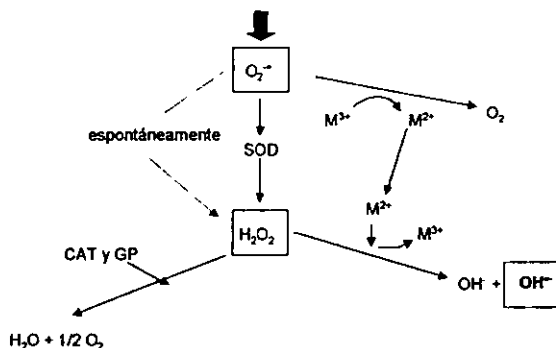


Figura 2. Interacción de las especies de oxígeno activas.

M = metal iónico; SOD = superóxido dismutasa; CAT = catalasa; GP= glutatión peroxidasa.

Fuente: Anderson. 1996⁽⁵⁸⁾.

En resumen, se puede decir que el anión superóxido, aunque es un RL no es una especie particularmente dañina, es principalmente un reductor en esencia y su principal significancia es como fuente de H_2O_2 y como reductor de metales iónicos de transición. EL H_2O_2 es un agente oxidante no especialmente reactivo y su papel principal es el de generar al radical hidroxilo en presencia de metales de transición. En ausencia de catalizadores el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 son fácilmente eliminados y virtualmente inofensivos^{54,55,60}.

El radical hidroxilo, el más importante de todos, es un radical oxidante extremadamente reactivo que reacciona con la mayoría de las biomoléculas a tasas de difusión controladas. Por lo tanto, no difundirá a una distancia significativa dentro de la célula antes de reaccionar, además tiene un $t_{1/2}$ extremadamente corto pero es capaz de causar un gran daño dentro de un radio pequeño desde su sitio de producción^{54,55,60}.

3.5.2 Producción de RL en las Células.

Con la excepción de circunstancias inusuales tales como la influencia de radiación ionizante, los RL son generalmente producidos en las células por transferencia de e^- , estos pueden ser mediados por la acción enzimática o no enzimática.

El radical superóxido es generado *in vivo* como un producto normal de diversos procesos metabólicos (Tabla 9)⁵³, por ejemplo los fagocitos activados generan anión superóxido como parte de su papel fisiológico, ya que constituye un mecanismo necesario para combatir infecciones. Aunque los RL son producidos únicamente en la interfase de la membrana plasmática del fagocito y la bacteria, algunas pérdidas de superóxidos, peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas oxigenadas son inevitables, las cuales pueden difundir y atacar a las diferentes biomoléculas (Figura 3)^{54,55,61}.

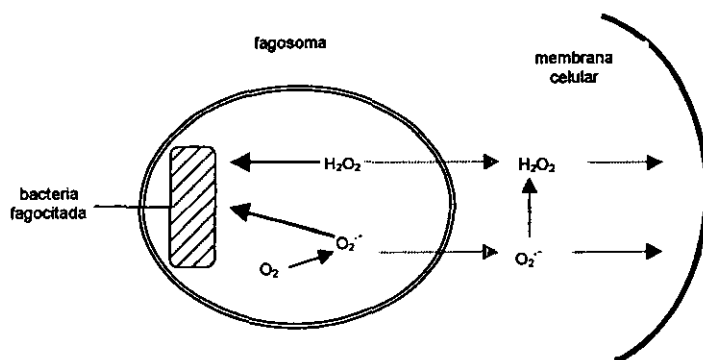


Figura 3. Formación de radicales de oxígeno bactericidas en el interior de una célula fagocitaria.

—→ Ataque; —→ Difusión.

Fuente: Huberman, 1996⁽⁶¹⁾.

Bajo circunstancias normales, la mayor y principal fuente de radicales libres en la célula es por pérdida de electrones por los complejos transportadores de electrones dentro de la mitocondria y el retículo endoplásmico.

Tabla 9. Algunas Fuentes Fisiológicas de Anión Superóxido.

FUENTE	OBSERVACION
Auto-oxidación de oxihemoglobina	$\text{Hem-Fe}^{2+}\text{-O}_2 \rightarrow \text{Hem-Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot -}$
Reticulo Endoplásmico	El $\text{O}_2^{\cdot -}$ es formado durante la oxidación de una variedad de sustratos endógenos y exógenos por el sistema citocromo P450 y b5.
Acción enzimática (xantina-oxidasa)	Particularmente importante durante la reperfusión del tejido después de la isquemia: $\text{xantin} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ác. úrico} + \text{O}_2^{\cdot -}$
Auto-oxidación de moléculas pequeñas	Una gran variedad de moléculas pequeñas capaces de sufrir reacciones de oxidación – reducción como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas, etc son productores de $\text{O}_2^{\cdot -}$
Estallido respiratorio	$2 \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow \text{O}_2 + \text{NADP}^+ + \text{O}_2^{\cdot -}$
Cadena transportadora de e- en la mitocondria	Pérdida de electrones de sitios importantes; NADH-coenzima Q reductasa se reduce y formando coenzima Q: $\text{O}_2 + \text{NADP}^+ + \text{O}_2^{\cdot -}$

Fuente: Bunker, 1992⁽⁵³⁾.

Generación mitocondrial de especies de oxígeno reactivas y radicales libres.- En la mitocondria normal, la maquinaria de producción de energía consiste fundamentalmente en la cadena transportadora de electrones: una serie de cuatro complejos moleculares grandes y dos pequeños. Los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) captan las moléculas NADH y FADH_2 provenientes del metabolismo las cuales contienen

a los electrones y los envían, a través de una serie de reacciones a la **ubiquinona**, el lugar de mayor generación de radicales libres⁶⁰.

La ubiquinona, por su parte transfiere los electrones en sentido descendente por el resto de la cadena (complejo III) hasta llegar al complejo IV (citocromo c oxidasa) donde interaccionan con el oxígeno molecular e iones hidrógeno para formar agua: $e^- + O_2 + H^+ \rightarrow H_2O$. Así mismo, el flujo de electrones provee un gradiente de protones (H^+) necesarios para activar al complejo V (ATP sintetasa), el cual emplea la energía suministrada por los protones para fabricar ATP^{60,62}.

En este sentido, los radicales libres se forman a partir de los electrones que se escapan de la cadena transportadora de electrones, muestra de ello es la región ubisemiquinona-citocromo b, lugar donde se forman la mayor cantidad del radical anión superóxido y la generación de peróxido de hidrógeno (Figura 4)^{60,63,64}.

La producción de radicales en la mitocondria ocurre principalmente debido a que la coenzima Q semireducida dona su electrón al oxígeno, el cual es abundante en la mitocondria, conduciendo esto a la generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Subsecuentemente la reducción de un electrón del radical anión superóxido por otra coenzima Q semireducida y/o por la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn resultará en la producción de H_2O_2 , el cual puede difundir fácilmente a través de la mitocondria y llegar a otras membranas celulares, por lo que si no es eliminado puede interaccionar con el hierro en la clásica reacción química de Fenton resultando en la producción del radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el cual puede atacar una gran variedad de macromoléculas (como el ADN) causando daño oxidativo. Además, durante el proceso de envejecimiento la tasa de generación mitocondrial de $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ aumenta, pasando del 1-5% al 15-50% contribuyendo esto con un aumento concomitante de daño oxidativo mitocondrial así como de otros componentes celulares⁶⁵.

GENERACION DE RADICALES LIBRES EN LA MITOCONDRIA.

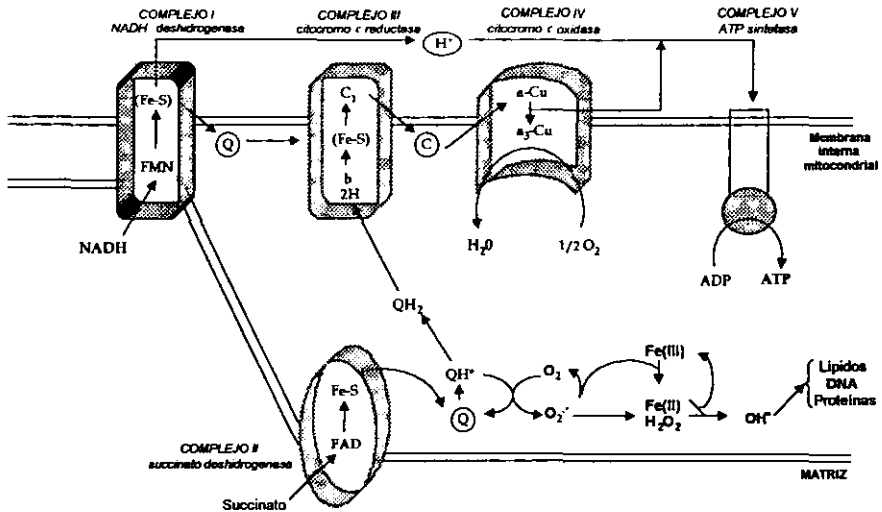


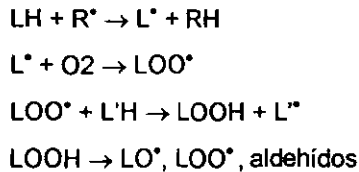
Fig. 4. Modelo por el cual, el succinato induce la generación de radicales en la mitocondria. Los equivalentes reducidos generados en la conversión del succinato a fumarato por el complejo II de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria causa una reducción secuencial del transportador de electrones liposoluble, llamado ubiquinona (Q). Una reducción de un electrón del oxígeno por la ubiquinona semireducida (QH[•]) resulta en la producción del radical superóxido, el cual conduce a una subsecuente generación de especies oxigenadas reactivas.

Fuente: Gabbita, 1997⁽⁶⁴⁾.

3.5.3 Daño a biomoléculas.

Una vez producidos los radicales libres, así como las especies de oxígeno reactivas, estos tienen la capacidad de difundir a través de la célula y atacar diversos componentes celulares. Los blancos prominentes de las especies reactivas de oxígeno son: ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y ADN⁶⁶.

Peroxidación lipídica.- Las membranas celulares son fuentes ricas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido araquidónico, los cuales son fácilmente atacados por radicales libres. El proceso general de peroxidación de lípidos puede entenderse bajo el siguiente esquema:



donde LH es el PUFA blanco y R[•] el radical oxidante de iniciación. L[•] es un radical ácido graso y LOO[•] es un radical ácido graso peroxil, LOOH son hidroperóxidos lipídicos y LO[•] es un radical lipídico alcoxil⁵⁴.

Cuando el radical hidroxil (OH[•]) es formado adyacente a la membrana, es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno (H[•]). A pesar de que el radical OH[•] ha sido inactivado, un radical ácido graso ha sido formado (L[•]) el cual después de un arreglo molecular (dieno conjugado) puede reaccionar con el oxígeno formando el radical ácido graso peroxil (LOO[•]). Los radicales peroxil son los transportadores de la reacción en cadena y pueden, por tanto, oxidar otras moléculas PUFA e iniciar nuevas cadenas, produciendo hidroperóxidos lipídicos (LOOH) los cuales pueden formar peróxidos cíclicos y fragmentarse en presencia de iones metálicos de transición o en reacciones análogas con H₂O₂ produciendo más radicales lipídicos (peroxil y alcoxil) así como una amplia gama de compuestos, especialmente aldehídos^{53,54,67}.

Los aldehídos, siempre son formados cuando los hidroperóxidos lipídicos son fragmentados y muchos de ellos son biológicamente activos, particularmente una clase conocida como hidroxialquenos, cuyo miembro más conocido es el 4-hidroxinonenal. La acumulación de hidroperóxidos lipídicos en la membrana desorganiza su función y puede provocar un colapso; los radicales peroxil y los aldehídos citotóxicos por su parte, causan daño severo a

las proteínas de membrana, inactivando receptores y enzimas ligadas a esta ^{54,57}.

Oxidación de proteínas.- Las proteínas son otro tipo de biomoléculas susceptibles a ser oxidadas por radicales libres. Su grado de oxidación y daño depende de varios factores. Desde luego, la oxidación de aminoácidos y proteínas esta limitado por el radical mismo: su naturaleza, reactividad, localización y proximidad de éste con la biomolécula. Así, diversos aminoácidos han mostrado ser modificados por especies de oxígeno reactivas, por ejemplo la leucina, tirosina y triptófano. En una estructura compleja como la proteína, la adición a la cadena de aminoácidos modificados o reacciones de oxidación son capaces de destruir al menos parcialmente, la estructura secundaria y terciaria de la macromolécula. Este proceso es acompañado por una exposición de los dominios hidrofóbicos en la superficie protéica, dichos dominios tienden a pegarse y formar agregados no covalentes. Además de las reacciones de entrecruzamiento, las cuales forman redes insolubles, se presentan los entrecruzamientos de moléculas proteicas. Estas reacciones pueden ser debidas a la acción del oxidante mismo, como es la formación del 2,2-difenil a través de radicales tirosil o debido a la acción de entrecruzamiento de azúcares y lípidos. Asimismo, los oxidantes son capaces de romper el enlace químico de los polipéptidos, dicha ruptura ocurre en el C α del polipéptido resultando en productos peptídicos y no peptídicos, como en el caso de la degradación por enzimas proteolíticas. Si bien, la formación de fragmentos peptídicos han sido reportados *in vitro*, no existe aún evidencia de que tales fragmentos estén presentes *in vivo* ⁶⁸.

Daño al ADN.- El ADN, una molécula única por estar presente en copias simples y de gran importancia debido a que posee la información genética necesaria para la supervivencia o muerte de la célula, recibe el ataque de los radicales libres a una tasa aproximada de **10,000 golpes/día** ^{67,69}, provocando una plétora de lesiones, entre las que se encuentran: bases oxidadas, sitios apurínicos (AP) debido a la ruptura del enlace glicosídico con la base y ruptura de hebra, causado por la fragmentación y oxidación de la deoxiribosa en la columna del ADN ⁷⁰.

Alteraciones en el Azúcar: Una importante lesión efectuada bajo condiciones prooxidantes es la escisión o ruptura de hebra simple en el cual el radical hidroxilo esta involucrado, el inicio de esta alteración se cree es el siguiente⁷¹⁻⁷³:

El ataque del OH[•] inicia en el carbono 4 del azúcar. Por abstracción del hidrógeno a dicho carbono un radical concéntrico es formado. Posteriormente, se adiciona una molécula de oxígeno para generar un radical peroxy. Después, rearrreglos sucesivos conducen a la ruptura del anillo del azúcar seguido por una β -eliminación. Una base propenal es liberada y las dos hebras remanentes de ADN sostienen un residuo terminal 3'-fosfoglucolato y 5'-fosfato, respectivamente (9,10). El residuo terminal 3'-fosfoglucolato es un marcador de ruptura de ADN producido por el ataque del radical hidroxilo⁷¹⁻⁷².

Daño en las Bases: Muchos tipos de modificaciones al ADN son generados por las especies de oxígeno reactivas, las más comunes son las modificaciones de bases de las cuales más de 20 han sido determinadas hasta ahora y varias de estas bases modificadas han mostrado ser mutagénicas (Figura 5)^{71,74,75}.

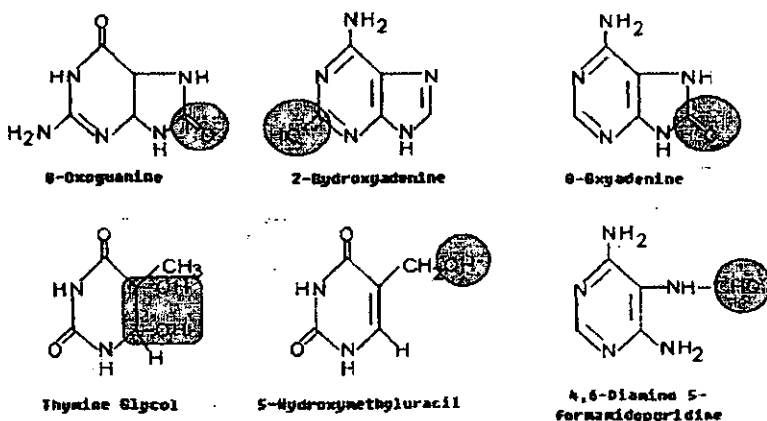


Figura 5. Principales modificaciones de bases del ADN.

Fuente: Meneghini, 1997⁽⁷¹⁾.

De estas, la 8-oxoguanina ha sido ampliamente investigada por su potencial para generar las transversiones guanina \rightarrow timina (G \rightarrow T) en varios sistemas. De este modo, enzimas reparadoras con relativa especificidad hacia estas lesiones han sido desarrolladas en sistemas biológicos, como es en bacterias y eucariotas superiores. Por ejemplo, una 8-oxoguanina ADN glucosilasa es responsable de reparar esta lesión en bacterias y células de mamíferos; dicha enzima posee dos sitios activos, **uno glucosilado**, el cual elimina la base modificada y origina un sitio abásico, **y una endonucleasa abásica**, el cual corta la unión fosfodiéster continua de la posición de la base ausente⁶⁵.

El patrón general de las modificaciones del ADN expuestas anteriormente señala el papel del radical hidroxilo como la especie atacante. El fundamento dado hasta ahora es el siguiente⁷¹: un estado prooxidante en la célula puede generar diversas especies reactivas, entre las cuales el H_2O_2 es notablemente manifiesto. El H_2O_2 es parcialmente destruido por la catalasa y la glutatión peroxidasa en el citosol, pero puede eventualmente llegar al núcleo. El hierro unido a la cromatina reaccionará con el H_2O_2 produciendo OH^* *in situ*. Esta especie que es sumamente reactiva atacará a los residuos de ADN cercano produciendo las modificaciones arriba mencionadas (Figura 6).

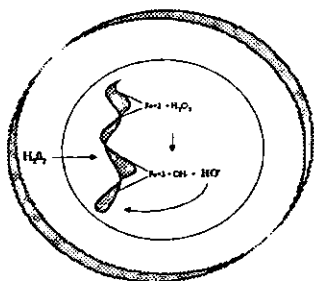


Fig. 6. Modelo que explica la producción de modificaciones al ADN por la reacción de Fenton *in situ* a nivel del ADN.

Fuente: Meneghini, 1997⁷¹).

Detección del Daño al ADN.- Las técnicas, que permiten la detección sensible del daño y reparación del ADN son fundamentales para los campos de investigación en toxicología del envejecimiento e investigaciones clínicas en toxicología genética y epidemiología molecular, debido a que el daño al ADN inducido por agentes tóxicos es frecuentemente tejido – célula específico, una técnica óptima sería aquella que detectara daño y reparación del ADN en células individuales obtenidas bajo una amplia variedad de condiciones experimentales. De este modo, los métodos más comúnmente usados para determinar el daño y reparación del ADN incluyen ^{76,77}:

- A) El recuento de aberraciones cromosómicas.
- B) Micronúcleos y/o intercambio de cromátidas hermanas en poblaciones de células en proliferación.
- C) La detección de síntesis de reparación del ADN (también llamada síntesis de ADN no programada) en células individuales.
- D) Detección de rupturas de hebras de ADN simple y sitios alcalino lábiles en poblaciones celulares, conocido como ensayo cometa.

Si bien, dichas técnicas proveen información acerca del daño en células individuales, las técnicas citogenéticas presentan la gran desventaja de necesitar la proliferación de las poblaciones celulares, ya que el daño al ADN debè ser procesado dentro de lesiones visibles microscópicamente.

El Ensayo Cometa o Electroforesis de Células Únicas: En 1978 Rydberg y Johanson fueron los primeros en cuantificar directamente el daño al ADN (ruptura de hebra) en células individuales embebidas en agarosa sobre portaobjetos, lisadas y colocadas bajo condiciones suaves de alcali, para permitir el parcial desenrollamiento del ADN. Después de la neutralización, la células fueron teñidas con naranja de acridina y la extensión del daño al ADN cuantificado por la tasa de fluorescencia de células de color verde (indicando doble hebra de ADN) y rojo (indicando hebra sencilla de ADN) usando un fotómetro. Para mejorar la sensibilidad en la detección del daño al ADN en células individuales Ostling y Johanson en 1984 desarrollaron una técnica de electroforesis en microgel conocida comúnmente como ensayo cometa. En

esta técnica, las células embebidas en un gel de agarosa son colocadas en un portaobjetos, lisadas por detergentes y altas concentraciones de sales, una vez liberado el ADN este es electroforizado bajo condiciones neutras. Las células con un gran daño muestran una migración de ADN aumentado hacia el anodo. La migración del ADN fue teñido con bromuro de etidio y cuantificado a través de la medición en la intensidad de la fluorescencia usando un fotomicroscopio. Sin embargo, con este ensayo se puede detectar únicamente la presencia de ruptura de doble hebra del ADN, y por tanto, su utilidad ha sido limitada a estudios involucrando radiación y químicos radiomiméticos ^{76,77}.

En 1988, Singh y cols. introdujeron una técnica en microgel involucrando la electroforesis bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) la cual es capaz de detectar rupturas de hebra sencilla, lesiones alcalino – lábiles de ADN, entrecruzamiento del ADN y sitios de reparación incompletos en células individuales. Debido, a que casi todos los agentes genotóxicos inducen en orden de magnitud más rupturas de hebra simple y lesiones alcalino – lábiles que rupturas de hebra doble, este ensayo alcalino proporciona una sensibilidad grandemente aumentada para la detección de daño al ADN inducido ⁷⁶⁻⁷⁸.

Si bien, los fundamentos principales son idénticos, diferentes metodologías en microgel han sido desarrolladas basadas tanto en el ensayo neutral de Ostling y Johanson, como del ensayo alcalino de Singh y cols. Sin embargo, las principales variables técnicas que afectan la sensibilidad y mejoran la capacidad del ensayo incluyen ⁷⁶⁻⁷⁸:

- 1) La concentración de la agarosa de bajo punto de fusión.
- 2) La composición de la solución de lisis.
- 3) La composición y pH del buffer de electroforesis.
- 4) Las condiciones electroforéticas tales como el voltaje, amperage y duración.

La selección de cual método usar, dependerá del propósito del estudio y de los objetivos del investigador.

Aplicaciones del Ensayo Cometa:

I) Estudios sobre genotoxicidad.- Una muy útil aplicación de la técnica unicelular alcalina es en el área de toxicología genética, un gran número de investigadores han usado el ensayo alcalino a $\text{pH} > 13$ para evaluar tanto *in vivo* como *in vitro* químicos genotóxicos. En este sentido, una gran variedad de células normales y transformadas incluyendo humanas, animales y vegetales han sido empleadas para estudios *in vitro*, y la cantidad de químicos probados en esta área de investigación aumenta rápidamente cada año, de hecho el primer uso práctico del ensayo cometa en la genotoxicidad fue probando la evaluación en la capacidad mutagénica de agentes generados por el tratamiento de permanganato de potasio (KMnO_4) con soluciones acidas, siendo de este primer reporte, a la actualidad más de 192 químicos probados, entre los que se encuentran: pesticidas, metales, opiáceos, fármacos, antineoplásicos, etc ⁷⁹.

II) Aplicaciones Clínicas.- La posible utilización del ensayo cometa en el área clínica fue propuesto por Ostling quien aplicó la versión neutral para evaluar los niveles de daño al ADN en células de tumores de pacientes quienes recibieron radioterapia para la enfermedad de Hodgkin's, linfoma no- Hodgkin's, carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. Asimismo, Olive y cols usó el ensayo a $\text{pH} 12.3$ para monitorear el número de células con hipoxia en células de cáncer de mama humano basado en su relativa insensibilidad para 5 a 10 Gy de rayos X. Por su parte, Klieman y Spector usaron la versión alcalina para determinar el daño al ADN en células epiteliales cristalinas tomadas de individuos afectados con cataratas y de controles sanos. Además se han realizado estudios con células epiteliales de vejiga obtenidas del tracto urinario en pacientes con cáncer y de mucosa gástrica y nasal obtenidas en forma de biopsia. Estos ensayos, han sido propuestos para predecir la respuesta celular a la quimioterapia ⁷⁶⁻⁷⁹.

III) Estudios sobre Reparación del ADN.- Debido a sus características, el ensayo cometa ha sido usado para evaluar la habilidad de virtualmente cualquier tipo de células eucariotas para reparar las diferentes clases de daño

al ADN, incluyendo ruptura de hebra doble y sencilla y daño basal. La versión neutral y alcalina del ensayo han sido empleadas para ensayar la reparación de rupturas de hebra doble y sencilla, respectivamente. Las rupturas de hebra doble y sencilla inducidas por radiación ionizante son eficientemente reparadas en células normales, el 50% del daño es reparado dentro de los 15 minutos y la reparación completa ocurre dentro de 1 a 2 horas. Finalmente, una importante característica de esta clase de estudios de reparación de ruptura de hebra, es la capacidad para reconocer a los individuos con capacidad de reparación alterada, ejemplo de ello es lo encontrado por Rojas y cols (1996) quienes señalan una importante retardo en la reparación en linfocitos de donadores sanos expuestos a pentóxido de vanadio⁷⁹.

IV) Monitorización Humana.- Otra importante aplicación del ensayo cometa es la monitorización de humanos, ensayando el daño al ADN en células tomadas de individuos expuestos ocupacional y/o ambientalmente. Muchos estudios en humanos han evaluado el daño al ADN en células de sangre nucleadas, usando principalmente muestras de linfocitos de individuos con historia de exposición, obteniendo datos tanto positivos como negativos. En este sentido, se han realizado más de 20 estudios donde se ha evaluado el daño al ADN con exposición al tabaco, la actividad física, la alimentación, etc ⁷⁵⁻

79

3.5.4 Defensas contra los RL.

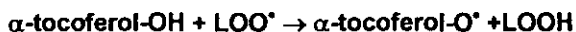
Debido a que la oxidación y producción de radicales libres son parte integral del metabolismo humano, el organismo ha desarrollado un complejo sistema antioxidante para controlar la producción y reducir el daño causado por los radicales libres. De este modo, *un antioxidante puede ser definido como una sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones comparado con los substratos oxidables, significativamente retrasan o previenen la oxidación del substrato*⁸⁰⁻⁸².

Los antioxidantes pueden ser clasificados de acuerdo a su modo (preventivo, rompimiento de cadena), sitio (intracelular, extracelular) o mecanismo de acción (enzimático y no enzimático), sin embargo la forma más conveniente de clasificación de los antioxidantes es por su sitio de acción.

Antioxidantes Extracelulares

Vitamina E: La vitamina E incluye a varios componentes estrechamente relacionados los cuales incluyen al α -tocoferol así como a los β , γ , δ , ϵ , ζ y ν tocoferoles. El más abundante en los sistemas biológicos es el α -tocoferol, pero el más potente es el derivado δ .

Su acción es particularmente importante en las membranas biológicas donde intercepta los radicales peroxil lipídicos (LOO^*) y por tanto termina con las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica^{53,55,82}.



El resultado es el radical *tocoferoxil* que es relativamente estable, pobremente reactivo e incapaz de atacar un ácido graso adyacente e iniciar la peroxidación lipídica. El radical *tocoferoxil* también puede ser reducido a vitamina E nuevamente por acción de la vitamina C^{53,55,83}.



Vitamina C: En la fase acuosa el ácido ascórbico es un importante barredor de R.L., es capaz de reaccionar con los radicales O_2^* , OH_2 , $^*\text{OH}$ para formar semihidroascorbato. El radical semihidroascorbato no es muy reactivo y sufre una reacción de desproporción:



a su vez el dehidroascorbato puede ser reducido a ascorbato por la enzima dehidroascorbato reductasa, una reducción la cual también requiere la reducción del glutatión:



Alternativamente el semihidroascorbato puede ser directamente reducido a ascorbato por la enzima NADH-semihidroascorbato reductasa^{53,55}:

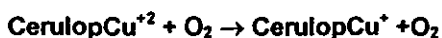


* *Acido Úrico*: Es un efectivo barredor del radical OH^{\bullet} , también tiene un papel importante en la quelación de metales iónicos, actuando de esta manera como una medida preventiva, así como un antioxidante que rompe cadenas. La concentración media de urato en el plasma es del orden de $300 \mu\text{mol/L}$, considerablemente mayor que el ácido ascórbico ($50 \mu\text{mol/L}$) y ha sido propuesto por ser el más importante antioxidante extracelular en humanos. Debido a que los niveles de ácido úrico tienden a aumentar con la edad, éstos pueden en parte balancear la disminución antioxidante contribuida por otros antioxidantes extracelulares^{53,84}.

* *Carotenoides*: El β -caroteno es un exitoso agente terapéutico en condiciones tales como la porfiria donde actúa suprimiendo al oxígeno tal cual y otros radicales generados por reacciones fotoquímicas. Sin embargo el β -caroteno puede tener un papel protector con los radicales libres independientemente de su pro - vitamina A. A pesar de que algunos β -carotenos de la dieta son convertidos a vitamina A en la mucosa intestinal, algunos son absorbidos sin sufrir cambios. Este carotenoide, junto con el licopeno y el α -caroteno, son poderosos suprimidores del oxígeno y de los peróxidos lipídicos, lo cual puede explicar el posible papel de los carotenoides en la prevención del cáncer^{55,85}.

* *Proteínas plasmáticas (quelantes de metales y albúmina)*: Dado que los metales de transición libres son capaces de promover la peroxidación lipídica, el secuestro de metales libres es importante en la protección contra la peroxidación. En el plasma, la mayor parte de esta acción protectora es debida a la ceruloplasmina, la transferrina y la lactoferrina, cada una puede unir 2 moles de Fe(II) por mol de proteína. Bajo circunstancias normales no son saturados con el hierro y pueden inhibir la peroxidación por quelamiento de sales de hierro.

La ferritina es una proteína intracelular que puede prevenir la acumulación de hierro no unido a proteína, cada mol de ferritina es capaz de unir arriba de 4500 moles de hierro. La ceruloplasmina tiene varias acciones antioxidantes, es capaz de reaccionar con el superóxido:



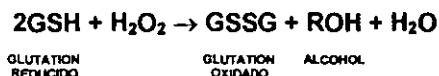
y tiene también actividad desoxidasa, catalizando la oxidación del Fe_(II) a Fe_(III) menos reactivo. Más del 90% del cobre total del plasma esta unido a la ceruloplasmina, el resto está unido a la albúmina o a aminoácidos.

Las proteínas plasmáticas, particularmente la albúmina, ha demostrado ser la reponsable del 10 al 50% de la captura del radical peroxil (LOO^{*}) en la actividad antioxidante del plasma. Su acción se cree está vinculada con la concentración del grupo sulfidriilo de la proteína. En concentraciones fisiológicas, la albúmina a diferencia de la ceruloplasmina, es capaz de unirse al cobre e inhibir la formación del ^{*}OH a partir de H₂O₂^{53,86}.

Antioxidantes Intracelulares:

Glutación Peroxidasa (GPx): La glutación peroxidasa es una enzima dependiente de selenio (Se) localizada en el citosol y mitocondria de tejidos animales. Es un tetrámero formado de 4 subunidades idénticas con un átomo

de selenio probablemente presente como una selenocisteína, cada una con un sitio activo. La catálisis de reacción es la siguiente:



El glutatión oxidado es convertido de nuevo a glutatión reducido por acción de la enzima glutatión reductasa la cual usa $\text{NADH} + \text{H}^+$ como cofactor. Distintos tejidos animales (no incluyendo los eritrocitos) contienen glutatión peroxidasa no dependiente de selenio que es capaz de actuar sobre los hidroperóxidos orgánicos, pero no sobre el H_2O_2 . Esta actividad es probablemente atribuida a algunas enzimas como la glutatión-S-transferasa^{53,55}.

* *Catalasa*: Consta de 4 subunidades proteicas, cada una con un grupo hem unido a su sitio activo. La actividad de la catalasa está principalmente localizada en los peroxisomas donde cataliza la siguiente reacción^{54,55}:



* *Superóxido Dismutasa (SOD)*: La SOD cataliza la reacción de dismutación de $\text{O}_2^{\cdot -}$ hacia H_2O_2 . Los tejidos mamíferos contienen por lo menos tres diferentes formas de SOD⁸⁷:

- CuZn-SOD encontrada principalmente en el citoplasma celular
- Mn-SOD encontrada principalmente en la mitocondria
- CuZn-SOD de alto peso molecular localizada en los fluidos extracelulares

Como las defensas antioxidantes no son del todo perfectas, las células poseen además sistemas que pueden reparar el DNA después de un ataque por radicales, degradar proteínas dañadas y metabolizar peróxidos lipídicos (Tabla 10)⁸⁸.

Tabla 10. Defensas Antioxidantes y Sistemas de Reparación Celular

	CLASE	MOLECULA	ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTES Neutralizan radicales libres o limitan su actividad	ENZIMAS	Superóxido Dismutasa (SOD)	Convierte el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
		Glutatión, Peroxidasas y Catalasas	Convierten el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno
	OTROS	Vitamina E y β - caroteno.	Reaccionan con los RL previniendo el ataque a los constituyentes celulares, son liposolubles por lo que protegen las membranas.
		Acido úrico y vitamina C	Reaccionan con los RL en el citoplasma.
SISTEMAS DE REPARACIÓN Degradan, reparan o reemplazan las moléculas dañadas	Reparación de proteínas	Proteinasas	Una proteínas oxidadas.
		Proteasas	Corta los productos de la actividad de proteinasas.
		Peptidasa	Corta los productos de la actividad de proteasas; aminoácidos que pueden ser reciclados para hacer nuevas proteínas.
	Reparación de lípidos	Fosfolipasas	Cortan partes dañadas de lípidos oxidados en las membranas y otras enzimas se encargan de reparar estos segmentos.
		Acetiltransferasa	Reemplaza ácidos grasos uniendo lípidos.
		Glutatión, peroxidasa y transferasa	Ayuda a reparar ácidos grasos oxidados expulsando largos segmentos de las membranas.
	Reparación de ADN	Exo y Endonucleasas	Cortan segmentos dañados de ADN.
		Glicosilasa y polimerasa	Llena los huecos izquierdos de las exo y endonucleasas.
		Ligasa	Sellan reparaciones.

Fuente: Rusting, 1992⁽⁸⁸⁾.

De este modo, las células cuentan con sistemas de reparación para el ADN que eliminan las porciones dañadas de hebras. Dichos sistemas se suelen agrupar de manera general en tres categorías: reparación directa, por escisión y postreplicativa. A su vez la reparación por escisión incluye los siguientes mecanismos: reparación de lesiones inducidas por UV, de sitios apúricos y apirimídicos (AP) y de emparejamientos incorrectos. Por su parte, la reparación postreplica incluye a la proteína RecA y la respuesta SOS⁸⁹.

De todas las lesiones presentes en el ADN por un estado oxidantes, incluyendo la ruptura de hebra simple, estas son reparadas primeramente via la reparación de escisión de base, cuyo mecanismo general es el siguiente: la base modificada es separada del nucleótido por enzimas ADN glucosilasas específicas, enseguida las endonucleasas AP inician la reparación por escisión en el sitio AP. Las endonucleasas AP de clase I cortan el ADN en el extremo 3' del sitio AP, mientras que las AP de clase II lo hacen por el extremo 5'. A continuación, una exonucleasa elimina la pequeña región del ADN en la que se encuentra el sitio AP (de dos a cuatro bases). Por último, la ADN polimerasa I y la ligasa reparan el hueco, sellando la muesca que permanecía en la hélice del ADN, finalizando con el proceso de reparación^{70,89,90}.

3.5.5. Envejecimiento y Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es frecuentemente referido como una condición en la cual fuerzas oxidativas causan una modificación irreversible a los componentes celulares, los cuales son compensados por innumerables fuerzas antioxidantes. Actualmente, se ha aceptado que el balance del estado prooxidante – antioxidante representa el impacto global del estrés oxidativo^{90,91}. Asimismo, muchos gerontólogos aceptan que el estado oxidativo de animales envejecidos es mayor cuando se le compara con el de animales jóvenes. La mayoría de las valoraciones de formas alteradas oxidantes en ADN, proteínas y lípidos apoyan esta idea, aunque las causas precisas en el incremento de prooxidantes no se encuentran hasta ahora bien definidas. En este sentido, la teoría del envejecimiento por radicales libres propone que el envejecimiento resulta de una protección imperfecta contra el daño tisular,

causado por los radicales libres formados por el metabolismo aeróbico normal debido a la constante generación de ROS, que es una consecuencia inevitable de la vida en un ambiente aeróbico, resultando en un daño acumulativo en los componentes celulares que eventualmente conduce a patologías relacionadas con la edad, aunque los mecanismos específicos para su generación y el consecuente estrés oxidativo difieran entre una patología y otra⁸³.

De este modo, la tasa de envejecimiento generalmente es inversamente proporcional a la tasa metabólica ó a la tasa de oxígeno utilizado. Así, la tasa del metabolismo de oxígeno correlaciona con la tasa de producción de especies reactivas de oxígeno lo cual sugiere del mismo modo que la producción de radicales pueda ser un factor de importancia en el proceso de envejecimiento (Figura 7)^{94,95}.

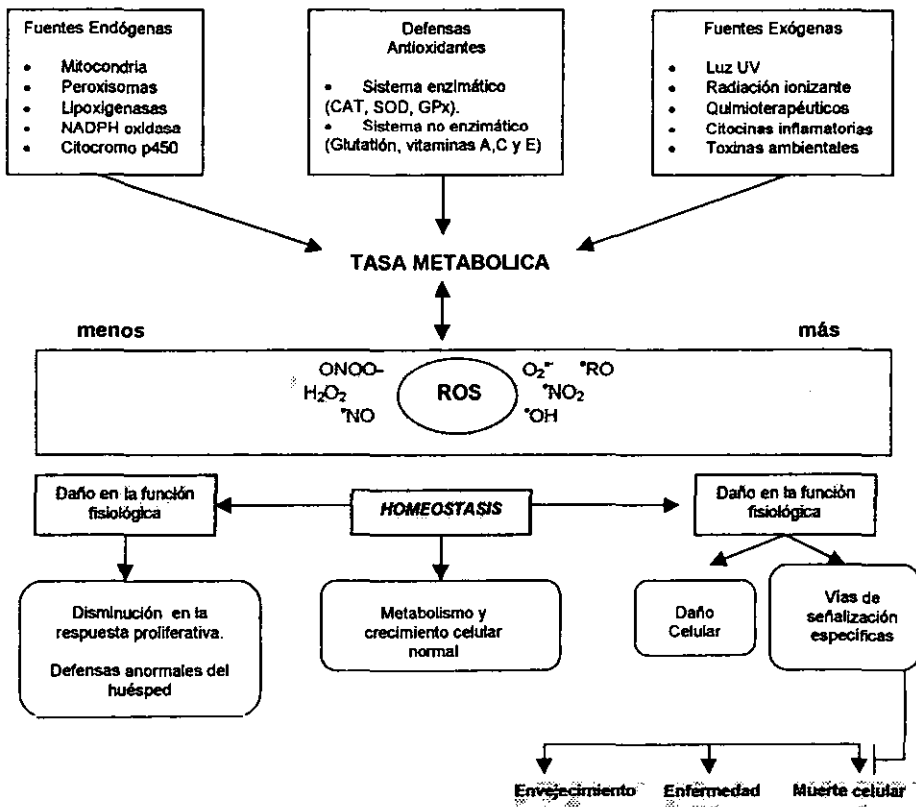


Fig 7. Fuentes y respuesta celular a las ROS. Los oxidantes son generados como un resultado del metabolismo normal. Fuente: Finkel, 2000⁽⁹⁴⁾.

Debido a esto, en los últimos años se han realizado diversos estudios en diferentes especies en los que se ha mostrado que una reducción en la actividad metabólica, a través de una restricción calórica protéica (refiriéndose a una reducción en el consumo calórico sin comprometer los nutrientes esenciales para evitar la malnutrición), puede modular los principales cambios biológicos relacionados con el envejecimiento (Tabla 11)^{96,97}.

Tabla 11. Principales Procesos Biológicos y Moléculas Relacionados con la Edad Modulados por la Restricción Calórica.

1. Componentes Séricos	4. Estado Oxidativo
<ul style="list-style-type: none"> - Glucosa - Fosfolípidos y triglicéridos - Colesterol - Ca²⁺ (total) - Insulina - Glucocorticoides - Progesterona - Prolactina - Testosterona - Fe (total) - Ferritina 	<ul style="list-style-type: none"> - Generación de radicales libres - Enzimas barredoras - Acido ascórbico - Glutati6n - Vitamina E - Peroxidaci6n lipídica - <i>Daño al ADN</i> - <i>Reparaci6n del ADN</i>
2. Estructura y Funciones Celulares	5. Actividad Reproductiva
<ul style="list-style-type: none"> - Síntesis y degradaci6n de proteínas - Expresi6n de genes - Transcripci6n y translaci6n - Membrana celular y estructuras subcelulares 	<ul style="list-style-type: none"> - Ciclicidad del estro - Agotamiento folicular
3. Sistema Inmune	6. Otros
<ul style="list-style-type: none"> - Respuesta a mit6genos por las células T - Producci6n de IL-2 - Involuci6n del timo - Proliferaci6n de linfocitos 	<ul style="list-style-type: none"> - Pérdida ósea - Funciones mitocondriales - Deterioro neuronal - Actividad lipolípica

Fuente: Pal Yu B, 1996⁽⁹²⁾.

La capacidad de la restricción calórica para modular el tiempo de vida y retardar las patogénesis ha merecido ser el estándar de oro de experimentos gerontológicos en corroboración o desaprobación de las principales teorías del envejecimiento.

En este sentido, la hipótesis de la tasa metabólica y la generación de radicales libres ha sido ampliamente examinada encontrando como hallazgo principal que ratas con restricción calórica presentan tasas metabólicas similares que sus contrapartes no restringidas pero no presentan los mismos cambios biológicos en edades avanzadas y tienen un tiempo de vida mayor. Sin embargo, para poder afirmar que la restricción calórica retrasará el envejecimiento en el humano, se tendrán que confirmar los resultados presentes en los roedores en monos (ya que estos tienen un parecido más estrecho con los humanos). Hasta el momento, 2 ensayos en monos *rhesus* se están desarrollan (los cuales iniciaron en 1987 por Georges S. Roth y 1989 con William B. Ershler), teniendo ambos resultados preliminares prometedores, entre los que se pueden mencionar: los animales sometidos a dieta (30% menos a la ingesta de los controles) se muestran sanos y felices, pero ansiosos a la hora de comer. La presión arterial y los niveles de glucosa son menores que en los animales control, además presentan una sensibilidad mayor a la insulina y sus niveles en sangre son menor⁹⁷. De este modo, tales evidencias consideran la evaluación de la tasa metabólica como el principal determinante en el proceso de envejecimiento en todos los organismos, involucrando principalmente los datos de consumo de oxígeno con la tasa metabólica y la producción directa de radicales libres en el estado oxidativo de los organismos envejecidos.

Finalmente, la restricción calórica ha mostrado suprimir el estrés oxidativo e impulsado al sistema antioxidante de tal modo que mejoró varias patologías (Tabla 12)^{91,92}.

Tabla 12. Lesiones Patológicas Aminoradas por la Restricción Calórica

Glomerulonefritis	Tumores intersticiales testiculares
Cardiomiopatías	Leucemias
Cataratas	Adenoma pituitario
Lipofuccinosis	Feocromocitoma
Tumores mamarios	Tumores de células pancreáticas

Fuente: Pal Yu, 1996⁽⁹²⁾.

Por lo anterior, se ha considerado que el balance energético positivo presente en la obesidad es su vez es un factor de riesgo importante que puede alterar la armonía funcional del organismo, ya que su contraparte, la restricción calórica provee de diversos beneficios a los individuos, por lo que es de suponer que los adultos mayores obesos presenten un daño al ADN mayor, con una capacidad de reparación menor que aquellos que no lo son. De ser así, sería de suma importancia evitar a edad temprana el desarrollo de la obesidad y/o compensar el estrés oxidativo con la administración de complementos antioxidantes para evitar las complicaciones con las que esta ampliamente asociada y de este modo poder lograr un envejecimiento exitoso.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El efecto modulador del estado nutricional sobre el daño y reparación del ADN en niños ha sido demostrado a través del ensayo cometa, sin embargo esto no puede ser extrapolado a los ancianos, ya que se señala que con el envejecimiento surgen ciertos cambios funcionales y estructurales que pueden afectar la capacidad de reparación del ADN. A nivel pediátrico o en población adulta joven, las carencias o excesos nutricionales no afectan de manera importante el proceso homeostático; sin embargo, a nivel gerontológico se reconoce que la desnutrición calórico-protéica representa un alto riesgo de readmisión hospitalaria y el sobrepeso u obesidad se relaciona con una mayor tasa de mortalidad, de lo cual la pérdida de reserva homeostática o fragilidad como proceso consecuente de la malnutrición podría ser modulada por el nivel de daño y capacidad de reparación del ADN. En este sentido, si esto fuera correcto, supondríamos que el nivel de daño y reparación del ADN en ancianos sería diferente en aquellos con peso bajo y con sobrepeso.

De aquí que surga la siguiente pregunta: **¿existen diferencias de daño al ADN y capacidad de reparación en los ancianos con peso normal y bajo en comparación con los que cursan con sobrepeso?**

5. HIPÓTESIS

- Considerando que la sobrealimentación calórica, se relaciona con la mayor generación de radicales libres, suponemos que el daño al ADN y su capacidad de reparación serán proporcionalmente superiores en los ancianos con sobrepeso en comparación con los de peso bajo y normal.

6. OBJETIVO

- Evaluar el nivel de daño y capacidad de reparación del ADN de una población de ancianos sobrepeso y de peso bajo de la Ciudad de México.

5. HIPÓTESIS

- Considerando que la sobrealimentación calórica, se relaciona con la mayor generación de radicales libres, suponemos que el daño al ADN y su capacidad de reparación serán proporcionalmente superiores en los ancianos con sobrepeso en comparación con los de peso bajo y normal.

6. OBJETIVO

- Evaluar el nivel de daño y capacidad de reparación del ADN de una población de ancianos sobrepeso y de peso bajo de la Ciudad de México.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio de tipo observacional, prolectivo, transversal y comparativo en una población de 130 ancianos con un rango de edad de 60 a 94 años, pertenecientes al Club Ecológico de la 3er Edad y al municipio de Los Reyes La Paz, Estado de México.

Para tal fin, se formaron 3 grupos:

Grupo I: Ancianos de ambos sexos, mayores de 60 años sin padecimientos crónicos incapacitantes irreversibles, con índice de masa corporal entre 24 y 27 clasificados como peso normal.

Grupo II: Ancianos de ambos sexos, mayores de 60 años sin padecimientos crónicos incapacitantes irreversibles, con índice de masa corporal menor a 24 clasificados como peso bajo.

Grupo III: Ancianos de ambos sexos, mayores de 60 años sin padecimientos crónicos incapacitantes irreversibles, con índice de masa corporal superior a 27 clasificados con sobrepeso.

VARIABLES:

I. Independientes: edad, sexo, peso corporal.

II. Dependientes: Daño y reparación de ADN

A toda la población de estudio se les tomó mediciones antropométricas y una muestra de sangre heparinizada por la mañana tras un ayuno previo de 12 horas para realizarles los estudios de detección de daño al ADN y de cinética de reparación.

TÉCNICAS

I. Mediciones antropométricas:

- *Peso*: Se utilizó una báscula calibrada.- Las personas fueron pesadas con la menor cantidad de ropa, empleando una bata clínica (preferentemente solo con ropa interior), en ayuno y postevacuación.
- *Talla*: Se utilizó un estadiómetro.- Las personas se colocaron descalzas con los talones, glúteos, hombros y cabeza en contacto con el estadiómetro y sus ojos debieron mirar hacia el frente, de tal manera, que la línea de visión fue perpendicular al cuerpo.
- *Índice de Masa Corporal*: [peso / (altura)²]: se utilizaron como puntos de corte inferior 24 y superior 27, para catalogar a los ancianos con peso bajo y sobrepeso.

II. Mediciones citogenéticas de ADN

- *Daño al ADN*: Se utilizó la técnica de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa, mediante la cual se midió la migración del ADN y se evaluó la cinética de reparación del mismo a los sujetos que presentaron daño. (Singh, 1991)

Preparación de laminillas.- Las laminillas esmeriladas se sumergieron en un recipiente con agarosa regular (1% en PBS) a 60°C durante 2-3 seg, se sacaron y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Elaboración de minigeles.- Por cada individuo se prepararon minigeles por duplicado de la siguiente manera: se mezclaron 10 µL de sangre heparinizada con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión (0.5% en PBS) a 37°C y se colocaron en un portaobjetos esmerilado con agarosa regular,

enseguida se les colocó un cubreobjetos y se refrigeraron a 4°C durante 5 min, después se retiró cuidadosamente el cubreobjetos y se les agregó otra capa de agarosa a bajo punto de fusión repitiendo el procedimiento antes señalado. Finalmente se retiró el cubreobjetos y se sumergieron las laminillas en solución de lisis fría (NaCl Na₂EDTA, Tris y Na lauril sarcosianato, 10% de DMSO y 1% de tritón) y se colocaron a 4°C por lo menos una hora.

Desnaturalización y Electroforesis.- Posteriormente, se retiraron cuidadosamente las laminillas de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis (con sustancia buffer de NaOH y EDTA a pH 13) y se dejaron 20 minutos en desenrollamiento. Para correr la electroforesis, se encendió la fuente de poder y se ajustó a 25 volts y 300 miliampers (adicionando o retirando amortiguador de la cámara), manteniéndola encendida durante 20 minutos. Es importante señalar que los pasos anteriores se realizaron bajo luz amarilla o protegidos de la luz.

Después de que se apagó la fuente de poder se retiraron cuidadosamente las laminillas de la caja de electroforesis y se enjuagaron tres veces con solución amortiguador de neutralizante (Tris 0.4 M, pH 7.5) durante 5 minutos. A continuación se escurieron las laminillas del exceso de amortiguador y se tiñeron (o bien se secaron con metanol absoluto) con 50 µL de bromuro de etidio 1x (1 mL de "STOCK" 10x [1mg /10 mL] con 9 mL de H₂O), cubriendo cuidadosamente con un cubreobjetos, para después colocar la laminilla en una cámara húmeda y refrigerada hasta su observación al microscopio de fluorescencia.

Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm utilizando un aumento de 40x, por cada laminilla se analizaron 50 núcleos y se midió el diámetro del núcleo y longitud de la cola del cometa con un ocular micrométrico calibrado hasta contar un total de 100 células.

• *Cinética de Reparación.*- Se llevó a cabo empleando como agente oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de 0.5 mM bajo el siguiente esquema:

1. Se preparó una solución stock de H_2O_2 colocando 0.1 mL de este con 0.9 mL de solución de Hanks.

2. A continuación, se preparó una solución problema para cada tiempo de la reparación por duplicado (0, 15,30,60,120 min) de la siguiente manera: se colocaron 20 μ L de sangre heparinizada con 50 μ L de solución stock de H_2O_2 y 90 μ L de solución de Hanks, posteriormente se sumergieron en agua fría por un tiempo de 2 horas en oscuridad.

3. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 3 min para retirarles el sobrenadante, el tiempo cero fue inmediatamente preparado para el ensayo cometa, mientras que a las demás muestras se les agregó 200 μ L de medio de cultivo e incubadas en baño metabólico a 37°C por los tiempos ya establecidos.

4. Pasado cada tiempo de incubación cada muestra fue centrifugada a 3000 rpm por 3 min para retirarles el sobrenadante y prepararlas para el ensayo cometa. De cada minigel se determinaron el número de núcleos con y sin daño de un total de 100 observados.

DISEÑO ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados se trabajó en una base de datos elaborada en Excell 5.0 para realizar la comparación de resultados a través de la prueba ANOVA (seguida de la prueba de Tukey), Ji Cuadrada.

8. RESULTADOS

I. Daño basal al ADN.

Se evaluaron 130 ancianos mayores de 60 años (44 hombres y 86 mujeres), con un promedio de edad de 68.3 ± 7.2 años (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de la población de estudio por edad y sexo.

Sexo	Edad (años)		TOTAL
	60 - 69	≥ 70	
Hombres	25	19	44
Mujeres	56	30	86
TOTAL	81	49	130

En relación al peso corporal, 50 ancianos fueron clasificados con sobrepeso ($IMC \geq 27$); 50 con peso normal ($IMC \geq 24 < 27$) y 30 con peso bajo ($IMC < 24$). En este sentido, el IMC promedio de los ancianos con sobrepeso fue de 30.9 ± 3.01 , de los normales 25.5 ± 0.9 y de los sujetos con peso bajo 22.3 ± 1.8 . Respecto al peso corporal en relación a edad y sexo, se observó predominio de sobrepeso en las mujeres con un 45% (39/86) a diferencia de un 25% (11/44) en hombres, asimismo el mayor porcentaje de obesos le corresponde al grupo de mujeres de 60 - 69 años con un 55%, mientras que en los hombres el mayor porcentaje corresponde a un peso normal en el mismo grupo de edad con un 56% y sólo el 28% presentó sobrepeso (Tabla 2).

Tabla 2. Peso Corporal en Relación a Edad y Sexo.

Peso Corporal	Hombres		Mujeres	
	60-69	≥ 70	60-69	≥ 70
NORMAL	14 (56%)	7 (37%)	17 (30%)	12 (40%)
PESO BAJO	4 (16%)	8 (42%)	8 (14%)	10 (33%)
SOBREPESO	7 (28%)	4 (21%)	31 (55%)	8 (26%)
TOTAL	25 (100%)	19 (100%)	56 (100%)	30 (100%)

Con respecto al daño al ADN en la población de estudio, se encontró que los hombres presentan una frecuencia mayor de daño al ADN (hombres 57%, mujeres 35%) cuya diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (tabla 3), mientras que el grupo de edad más susceptible de presentar daño fue el de 70 y más años en comparación con el 38% de los adultos mayores de 60 a 69 años sólo presentaron un 38% (31 de 81) (tabla 4), no obstante la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Tabla 3. Frecuencia de Sujetos con Daño al ADN

	Con Daño*	Sin Daño	TOTAL
Hombres	25 (57%)	19 (43%)	44/44 (100%)
Mujeres	30 (35%)	56 (65%)	86/86 (100%)
TOTAL	55 (42%)	75 (58%)	130/130 (100%)

* Hombres vs Mujeres $\chi^2 = 5.74$ $p = 0.0166$

Tabla 4. Edad en Relación a Daño al ADN

Edad (años)	Con Daño	Sin Daño	TOTAL
60 - 69	31 (38%)	50 (62%)	81/81 (100%)
≥ 70	23 (47%)	26 (53%)	49/49 (100%)
TOTAL	54 (42%)	76 (58%)	130/130 (100%)

$\chi^2 = 0.94$ $p = 0.3311$

Por su parte, al observar la relación entre el daño al ADN y el peso corporal, se encontró que los grupos con mayor proporción de daño son los de peso bajo y normal con un 50%, mientras que los ancianos con sobrepeso únicamente el 30% (15 de 50) presentaron daño (tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de Daño al ADN y Peso Corporal.

Peso Corporal	Con Daño al ADN	Sin Daño al ADN	TOTAL
NORMAL	25 (50%)	25 (50%)	50/50 (100%)
PESO BAJO	15 (50%)	15 (50%)	30/30 (100%)
SOBREPESO	15 (30%)	35 (70%)**	50/50 (100%)

** Normal vs Sobrepeso $\chi^2 = 4.17$, $p = 0.04$

Asimismo, las características descriptivas de los pacientes que presentaron daño al ADN, ordenadas según el valor del IMC, se encontró que el valor medio de los núcleos y sus migraciones (cola sin núcleo) y total son semejantes para las 3 poblaciones, ya que no se presentó diferencia estadísticamente significativa (ANOVA, $p > 0.05$). No obstante, los ancianos que presentan peso normal tienen migraciones (cola sin núcleo) y total mayor que los sujetos con peso bajo y sobrepeso (tabla 6). Además, no se presentó influencia significativa del sexo y la edad entre los grupos sobre el valor de las migraciones y los núcleos (ANOVA, $p > 0.05$).

Tabla 6. Características descriptivas de los pacientes con daño al ADN.

Paciente	Edad	Sexo	I.M.C.	Células sin daño	Células con daño	X Núcleo (μm)	X Mig/cola (μm)	X Mig Total (μm)
1	76	M	15.6	97	3	15.3 \pm 1.6	8.3 \pm 1.4	23.6 \pm 1.4
2	71	H	19.8	96	4	19.3 \pm 0.8	18 \pm 8.5	37.3 \pm 8.4
3	67	M	19.8	98	2	18 \pm 2.1	18 \pm 0.0	35.8 \pm 0.0
4	94	M	20.9	86	14	17.5 \pm 1.0	32.7 \pm 15.9	50.1 \pm 15.9
5	60	H	21.7	97	3	19.2 \pm 0.9	32.4 \pm 22.1	51.6 \pm 22.1
6	87	H	22.5	86	14	19.2 \pm 2.7	20.4 \pm 18.4	38.9 \pm 18.4
7	76	H	22.7	91	9	16.2 \pm 2.3	14.4 \pm 0.0	35.5 \pm 0.0
8	73	H	23.1	92	8	21.6 \pm 2.9	15.3 \pm 6.8	36.2 \pm 6.8
9	68	H	23.3	94	6	19.2 \pm 1.9	20.9 \pm 14.8	39.8 \pm 14.8
10	70	H	23.6	99	1	16.2 \pm 1.2	9.0 \pm 0.0	25.9 \pm 0.0
11	64	M	21.6	99	1	18 \pm 4.9	24 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
12	72	M	22.2	94	6	18.4 \pm 1.4	26.1 \pm 18.1	44.5 \pm 18.1

Paciente	Edad	Sexo	I.M.C.	Células sin daño	Células con daño	X Núcleo (μm)	X Mig/cola (μm)	X Mig Total (μm)
13	74	H	23.2	97	3	19.3 ± 2.9	60 ± 18.5	79.6 ± 18.5
14	74	M	23.6	97	3	21 ± 3.0	7.2 ± 0.0	28.2 ± 0.0
15	65	M	23.1	98	2	21 ± 1.7	84 ± 16.9	105 ± 16.9
16	67	M	24.5	92	8	17.5 ± 1.0	13.6 ± 5.7	23.3 ± 5.7
17	68	H	24.5	95	5	24 ± 3.4	35.2 ± 23.2	58.3 ± 23.2
18	66	M	24.7	99	1	22.5 ± 1.1	17.5 ± 0.0	39.7 ± 0.0
19	70	M	24.9	97	3	24.9 ± 0.6	29.2 ± 9.5	54.1 ± 9.5
20	71	M	25.2	88	12	20 ± 2.1	20.9 ± 8.4	40.2 ± 8.4
21	68	H	25.6	95	5	21.6 ± 0.6	26.9 ± 20.9	48.3 ± 20.9
22	65	M	25.9	97	3	24.6 ± 1.6	14.2 ± 9.5	38.8 ± 9.5
23	63	H	26.2	99	1	14.4 ± 2.2	27 ± 0.0	41.7 ± 0.0
24	65	H	26.5	97	3	21.6 ± 0.7	16.8 ± 6.8	38.3 ± 6.8
25	69	H	26.6	94	6	18 ± 3.7	26.4 ± 10.1	43.5 ± 10.1
26	63	H	26.9	97	3	21.6 ± 0.9	16 ± 11.1	37.5 ± 11.1
27	70	M	24.5	97	3	17.4 ± 0.6	32 ± 5.7	49.4 ± 5.7
28	71	M	24.5	99	1	17.5 ± 1	24 ± 0.0	41.5 ± 0.0
29	65	M	24.5	97	3	17.2 ± 2.8	70.4 ± 2.8	87.6 ± 2.8
30	64	M	24.9	96	4	18 ± 1.2	28.2 ± 5.4	47.4 ± 5.4
31	70	H	25.1	94	6	17.9 ± 2.1	44 ± 6.9	61.9 ± 6.9
32	65	M	25.2	97	3	20.9 ± 3.2	27.6 ± 14.4	48.6 ± 14.4
33	73	H	25.2	99	1	16.5 ± 3.1	24 ± 0.0	24.0 ± 0.0
34	72	M	25.5	99	1	18.2 ± 4.9	72 ± 0.0	72.0 ± 0.0
35	71	M	26.0	97	3	17.4 ± 2.1	6.4 ± 1.4	24 ± 1.4
36	72	H	26.1	98	2	20.9 ± 3.2	45 ± 12.7	65.9 ± 12.7
37	70	M	26.3	98	2	17.5 ± 0.8	18 ± 8.5	35 ± 8.5
38	63	H	26.8	97	3	17.8 ± 1.3	39 ± 5.2	56.8 ± 5.2
39	73	M	26.9	99	1	19.7 ± 2.9	48 ± 0.0	48 ± 0.0
40	60	M	26.9	98	2	17.2 ± 5.9	22.8 ± 8.5	40 ± 8.5
41	88	H	27.2	93	7	16.2 ± 3.5	23.5 ± 9.7	39 ± 9.7
42	65	H	27.6	95	5	21.6 ± 0.8	15.4 ± 4.9	37 ± 4.9
43	60	M	27.9	99	1	22.5 ± 0.9	25 ± 0.0	25 ± 0.0
44	60	H	27.9	95	5	14.4 ± 2.3	24.1 ± 4.7	38.5 ± 4.7
45	71	M	27.9	97	3	14.4 ± 2.0	15 ± 10.4	29.4 ± 10.4
46	62	M	28.4	92	8	19.5 ± 2.1	16.6 ± 9.9	36.1 ± 9.9
47	60	H	28.5	98	2	19.2 ± 0.5	9.6 ± 3.4	28.8 ± 3.4
48	66	M	30.1	94	6	17.5 ± 1.5	14.4 ± 6.9	31.9 ± 6.9
49	64	M	30.3	98	2	20.0 ± 1.4	35 ± 3.5	55 ± 3.5
50	67	H	30.3	81	19	19.2 ± 5.1	9.31 ± 2.8	28.5 ± 2.8
51	67	M	31.1	88	12	24.9 ± 3.1	38.1 ± 20.3	62 ± 20.3

Paciente	Edad	Sexo	I.M.C.	Células sin daño	Células con daño	X Núcleo (μm)	X Mig/cola (μm)	X Mig Total (μm)
52	61	H	31.4	97	3	23.8 \pm 1.1	23.2 \pm 13.2	47 \pm 13.2
53	60	H	31.9	96	4	19.2 \pm 1	18.6 \pm 6.9	18.6 \pm 6.9
54	65	M	33.7	98	2	25 \pm 1.6	27.5 \pm 10.6	52.5 \pm 10.6
55	62	M	35.2	97	3	25 \pm 1.8	26.3 \pm 15.9	26.3 \pm 15.9

I.M.C. = índice de masa corporal; H = hombre; M = mujer; X = promedio; Mig/cola = migración cola sin núcleo. Mig Total = migración total.

Por otro lado, analizando la magnitud de daño al ADN, se encontró que el 47% (7 de 15), 53% (8 de 15) y 72% (18 de 25) de los pacientes con sobrepeso, peso bajo y peso normal respectivamente, presentaron entre 1 a 3 células con daño. Asimismo, el 27% de los sujetos con sobrepeso (4 de 15) presentaron entre 4 y 6 células dañadas y el 13% (2 de 15) entre 7 y 12 células con daño, tanto en el grupo de peso bajo como con sobrepeso (tabla 7).

Tabla 7. Magnitud de Daño al ADN por Peso Corporal.

Peso Corporal	Células con migración (%)*				TOTAL
	1-3	4-6	7-9	10-12	
NORMAL	18 (72%)	5 (20%)	1(4%)	1(4%)	25/25 (100%)
PESO BAJO	8 (53%)	3 (20%)	2(13%)	2(13%)	15/15 (100%)
SOBREPESO	7(47%)	4(27%)	2(13%)	2(13%)	15/15 (100%)

* Porcentaje de células con daño al ADN por individuo.

A su vez, al observar el grado de daño (por medio de una variable dicotomizada en daño al ADN menor o igual a 40% y mayor), se encontró que el 60 y 59% de las células en los ancianos con peso normal y sobrepeso mostraron un daño mayor al 40%, mientras que los ancianos con peso bajo presentaron un 51% de células con daño menor o igual al 40%, siendo por tanto, similares los tres grupos (tabla 8). Además, al realizar la razón de momios con respecto al peso corporal como factor de riesgo y el grado de daño

al ADN, se encontró que el riesgo de presentar un daño mayor al 40% fue menor al 1%, independientemente del peso (tabla 9).

Tabla 8. Grado de Daño al ADN en Relación a Peso Corporal y Edad.

PESO CORPORAL	Grado de Daño	
	≤ 40%	> 40 %
NORMAL	32 (40%)	49 (60%)
PESO BAJO	40 (51%)	39 (49%)
SOBREPESO	33 (41%)	48 (59%)

Tabla 9. Riesgo de daño al ADN en relación al peso corporal.

PESO CORPORAL	Daño al ADN > 40%	
	R.M.*	I.C.**
PESO BAJO	0.64	0.32 – 1.25
SOBREPESO	0.97	0.48 – 1.87

* R.M = razón de momios

** I.C. =intervalo de confianza al 95%.

II. Cinética de reparación al ADN.

Con respecto a la cinética de reparación, se evaluaron 40 de los sujetos con daño (los 15 restantes se negaron a proporcionar una segunda muestra de sangre) cuyos resultados promedio de células con daño y porcentajes de reparación se presentan en las tablas 9 y 10, observándose un comportamiento similar entre los 3 grupos de estudio hasta los 60 minutos, ya que no se

encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA con $p > 0.05$) (gráfica 1), siendo a los 120 minutos el único tiempo donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el promedio de células sin reparar entre los grupos (ANOVA $p < 0.01$, seguida de la prueba de Tukey) (gráfica 2) aunque, los porcentajes de reparación fueron similares ($p > 0.05$).

Tabla 9. Cinética de Reparación en Relación al Índice de Masa Corporal*.

TIEMPO DE REPARACION (min)	INDICE DE MASA CORPORAL (IMC)			Valor de p^{**}
	< 24 (PESO BAJO)	24 – 27 (NORMAL)	> 27 (SOBREPESO)	
0	81 ± 7.2	82.2 ± 6.1	85.5 ± 4.9	0.1446
15	70.4 ± 6.6	70.9 ± 7.6	73 ± 4.7	0.5238
30	58.2 ± 8.8	59.1 ± 6.5	63.5 ± 5.1	0.1035
60	31.4 ± 8.1	32.7 ± 8.6	37.3 ± 11.7	0.2610
120	7.5 ± 2.2	9.8 ± 3.5	11.6 ± 3.5	0.009

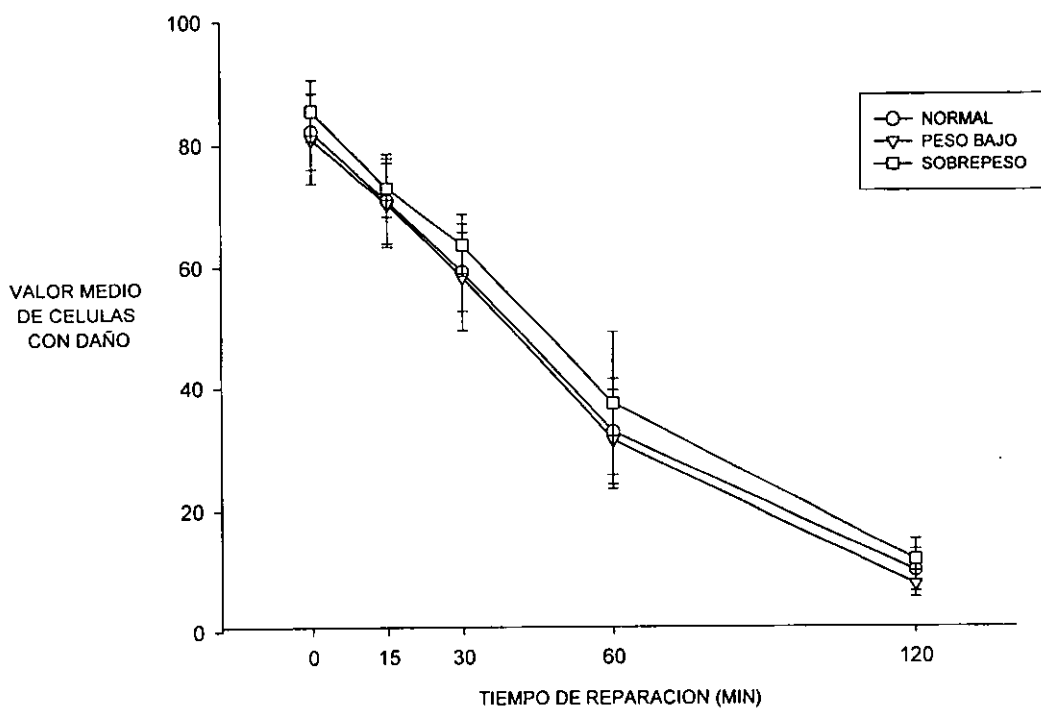
* Células promedio con daño. ** ANOVA con $\alpha = 0.05$

Tabla 10. Porcentaje de Reparación en Relación al Índice de Masa Corporal.

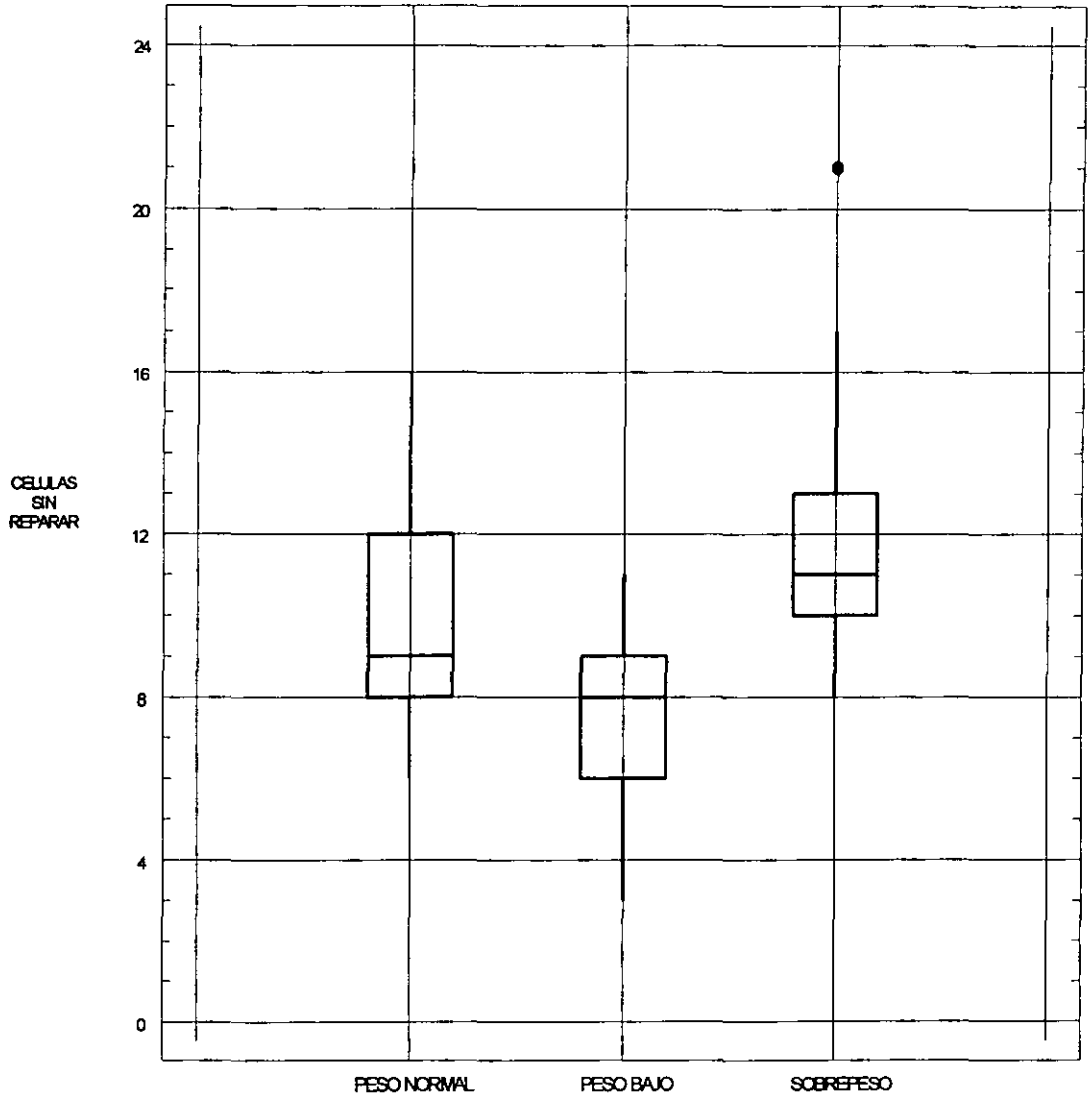
TIEMPO DE REPARACION (min)	INDICE DE MASA CORPORAL (IMC)		
	< 24 (PESO BAJO)	24 – 27 (NORMAL)	> 27 (SOBREPESO)
0	0	0	0
15	13.1	13.7	14.6
30	28.1	28.1	25.7
60	61.2	59.6	53.9
120	90.7	87.9	86.4

$\chi^2 = 0.4022$ $p > 0.05$

Grafica 1. Cinética de Reparación del Daño al ADN



**Gráfica 2. CÉLULAS PROMEDIO SIN REPARAR A LOS 120 MINUTOS
PARA LOS 3 GRUPOS*.**



* prueba de Tukey, la cual señaló que el grupo con peso bajo es diferente con respecto al grupo normal y con sobrepeso con significancia estadística ($p = 0.0083$).

9. DISCUSION

Una adecuada nutrición es fundamental para el mantenimiento de una buena salud y para el funcionamiento óptimo del organismo. En los ancianos, los problemas de malnutrición, ya sea por un exceso (sobrepeso u obesidad) o por deficiencia (desnutrición) están asociados con cambios profundos en la composición corporal resultando en un declive en la masa magra y en un aumento y/o redistribución de la grasa, aumentando esto el riesgo de enfermedades crónico – degenerativas, accidentes y limitando su participación en actividades de la vida diaria, deteriorando severamente su calidad de vida. En este sentido, el sobrepeso y obesidad caracterizados por una mayor tasa metabólica debido a un desmedido consumo de alimentos y/o a una dieta rica en grasa están directamente unidos con la generación de radicales libres y un estado oxidativo mayor en aquellos sujetos que la presentan, favoreciendo así el daño a biomoléculas entre los que se encuentran el ADN^{51,52}.

Así, los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron un 42% de sujetos con daño al ADN siendo esto un poco menor en comparación a los resultados obtenidos en investigaciones previas, donde se ha detectado desde un 52% hasta un 54.5% de sujetos ancianos con daño en el ADN, lo cual no es señalado como una característica normal del envejecimiento y, por lo tanto, debería ser considerado como un factor que podría estar directamente asociado con la aparición de enfermedades crónico – degenerativas como la aterosclerosis, cáncer, diabetes mellitus, enfermedad cerebrovascular, etc, las cuales han mostrado ser características en este grupo de edad⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Por otro lado, el sexo es una variable que influye en la susceptibilidad de presentar daño al ADN, debido a que se encontró que el 57% de los hombres a diferencia del 37% de las mujeres mostraron daño en el ADN, cuya diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0.01$), lo cual contrasta con lo reportado por Mendoza (1999)⁹⁸ donde se señala que el 76.4% y 46.4% de hombres y mujeres respectivamente presentaban daño al ADN aunque dicha diferencia no mostró significancia estadística ($p = 0.07$) probablemente debido, a lo reducido

del tamaño de la muestra de los hombres ($n = 17$). Del mismo modo, King y cols (1997)¹⁰⁶ no encontraron diferencia significativa en el daño basal al ADN entre hombres y mujeres. Con respecto a la edad, esta no parece influir en el daño al ADN, ya que el 38% y 47% de la población con edades entre 60 y 69 años y 70 años o más respectivamente presentaron daño sin que esta diferencia mostrara significancia estadística, lo cual es concordante con otras investigaciones en donde se señala que el nivel basal de daño es independiente de la edad (Singh 1990)¹⁰⁵, por su parte King (1997)¹⁰⁶ encuentra que los sujetos con edades entre 75 y 80 años presentan menor daño que los sujetos con edades entre 65 y 69 años y que este daño es similar con el presentado por adultos entre 35 y 39 años. Además, el estudio realizado por Kruszewski (1998)¹⁰⁷ señala que no hay una correlación entre el daño basal en el ADN y la edad. Sin embargo, otros investigadores mencionan que si existe una asociación entre el daño basal y la edad, como lo reporta Barnett (1995)¹⁰⁸, indicando que las personas con edades entre 65 y 69 años presentan mayor daño comparado con los de 35 y 39 años, lo mismo que Mendoza (1999)⁹⁸ quien señala que conforme avanza la edad, el daño basal en el ADN es mayor, ya que el riesgo de presentar daño es de 2.82 (IC 1.10 – 7.22) para los sujetos mayores de 70 años. Estas diferencias a favor y en contra pueden deberse a que los cambios graduales que se presentan en el envejecimiento como son la redistribución de grasa, disminución de la masa magra y agua, y estructura y funcionamiento de órganos y sistemas, no ocurren a la misma velocidad en todos los individuos ni en el mismo entorno sociocultural y por tanto, existe una variabilidad sustancial entre sujetos de la misma edad que los hace más o menos sensibles a factores promotores de daño al ADN. Además, se ha señalado que una alta estabilidad genómica y una aumentada resistencia al estrés oxidativo ha sido una destacada característica dentro de personas centenarias (probablemente el mejor ejemplo de un envejecimiento exitoso)¹⁰¹, por lo que durante el envejecimiento, al parecer existe una etapa crítica que comprende hasta antes de los 70 años en donde el estrés oxidativo parecer ejercer un balance mayor a favor del daño oxidativo, pasado este umbral el individuo es más resistente y modula mejor su propio proceso de envejecimiento.

Respecto a la frecuencia de daño al ADN y el peso corporal, estos fueron semejantes en los tres grupos de estudio, ya que no se encontraron diferencias con significancia estadística (tabla 5), siendo esto diferente a lo propuesto en el estudio, ya que diversos estudios han señalado que el exceso de peso corporal esta asociado con el riesgo de mortalidad prematura así como en la morbilidad de los diferentes padecimientos crónico degenerativos característicos del envejecimiento los cuales además están en estrecha relación con la actividad metabólica y la generación de radicales libres, por lo que es importante considerar otros factores como son: el cambio de alimentación, el aporte de vitaminas o multivitaminas, el ejercicio físico, así como la evaluación de factores de riesgo como el tabaco, consumo de alcohol y exposición a agentes inductores de daño (solventes, radiaciones ionizantes,) en la población, ya que se ha demostrado que estos ejercen un efecto sobre el equilibrio antioxidante - prooxidante y por tanto, pueden enmascarar el daño presentado en el ADN¹⁰¹⁻¹⁰². No obstante, los resultados encontrados pueden ser entendidos por lo establecido por Perez-Campo (1998)⁹³, el cual señala que entre las posibles diversas causas del envejecimiento, la intensidad de la tasa basal metabólica (BMR) parece ser el parámetro más claramente relacionado entre este y la máxima esperanza de vida en la mayoría de los animales estudiados. De este modo, sí la BMR es acelerada los tejidos no únicamente consumirán más O₂ por unidad de tiempo, sino que también sintetizaran y degradaran muchas clases de moléculas rápidamente, y una variedad de procesos bioquímicos también participaran en este acelerado estadio. Así, el incremento en la BMR podría conducir a una sustancial producción de oxidantes endógenos como el anión radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH[•]) y otros subproductos del metabolismo normal. En este sentido, se ha establecido una diferencia por sexo en la BMR, siendo mayor en hombres que en mujeres, además los sujetos obesos tienen un BMR mayor que sus contrapartes delgadas, debido a que el aumento en la masa grasa aumenta junto con la masa libre de grasa. Sin embargo, aproximadamente el 80% de la varianza inter-individual del BMR puede deber por diferentes factores entre los que se encuentra la edad, sugiriendo los resultados del estudio que durante el envejecimiento la BMR disminuye, por lo que los ancianos con sobrepeso no presentan una generación mayor de

radicales libres, y por tanto, no presentan una frecuencia mayor de daño en el ADN, tales observaciones son muy similares con lo propuesto por Vistisen (1992)¹⁰⁹ quien encontró que la excreción de 8-hidroxidesoxiguanina (8OHdG) disminuye en un promedio del 4% (rango de 2 a 6%) conforme el IMC aumenta, y es mayor en hombres y sujetos delgados.

Con respecto a las características descriptivas de los pacientes con daño al ADN, los valores medios de las migraciones de la cola sin núcleo son en su mayoría menores a las reportadas por Betti (1994)¹¹⁰ cuyos valores oscilan en un rango de 32 a 59 μm independientemente de la edad (rango de edad de 10 a 76 años), mientras que la población anciana del estudio presenta un rango entre 7 y 84 μm hallándose el 74.5% por debajo de 30 μm , lo cual indica que el daño es menos extenso en nuestra población, debido muy probablemente a las diferencias genéticas entre las poblaciones (la primera es Europea) y por tanto están expuestas a factores ambientales y socioculturales distintas a las nuestras.

Por su parte, en la magnitud de daño al ADN es importante resaltar que la mayoría de los sujetos (60%) presentó de 1 a 3 % de células con daño y sólo el 9 % tuvo de 10 a 12 % de células dañadas. Asimismo, el 53% y 47% de ancianos catalogados como de peso bajo y sobrepeso respectivamente, mostraron de 1 a 3 % de células con daño y su comportamiento en las demás magnitudes es muy similar a diferencia del grupo con peso normal (tabla 6), donde el 72% presenta entre 1 a 3 % de células con daño y el resto de células dañadas se diluyen, lo cual evidencia que la magnitud de daño es mayor en aquellos sujetos con cambios severos en la composición corporal, siendo esto congruente en cierto modo con lo reportado en investigaciones realizadas en poblaciones pediátrica y adulta joven¹⁰³, debido a que se señala que el daño al ADN asociado con estados de malnutrición pueden estar relacionado con una deficiencia en varios de los nutrientes requeridos para la síntesis de proteínas necesarias en la conservación de la integridad celular, por lo que las células de pacientes con malnutrición pueden ser más susceptibles al daño ambiental a diferencia de sus controles sanos.

Por otro lado, al analizar el grado de daño basal al ADN (catalogado como daño $\leq 40\%$ y $> 40\%$), encontramos una distribución semejante en los 3 grupos de estudio (tabla 8), además no se presentó un riesgo de presentar daño mayor a 40% en sujetos con sobrepeso o peso bajo en comparación con los individuos con peso normal (tabla 9), lo cual refuerza lo mencionado en párrafos anteriores en relación a la menor BMR en los ancianos. Además, la población con peso bajo de algún modo puede decirse se encuentra bajo un estado de restricción calórico – proteica, el cual influye sobre el estrés oxidativo, el daño al ADN y la carcinogénesis, ya que se señala que un consumo balanceado pero limitado de alimentos provee de una mejor eficiencia en la maquinaria mitocondrial evitando que se produzcan cantidades elevadas de radicales libres, los cuales pueden ser eficientemente neutralizados por los diferentes sistemas de defensa antioxidante^{56,91-92}.

Finalmente, es importante recalcar que el proceso de envejecimiento es multifactorial, por lo que se debe de contemplar la integración de otros aspectos como lo es la capacidad de reparación, ya que el declive relacionado con la edad en dicho proceso dentro del ADN, esta acompañado por un aumento acumulativo persistente de daño sensible a un incremento en las mutaciones y/o a expresiones de genes, que pueden alterar la homeostasis de los individuos como en el caso del cáncer, donde el daño oxidativo al ADN es considerado como uno de los factores más importantes en el desencadenamiento de la carcinogénesis^{62,104}.

En este sentido, los resultados en este aspecto indican que el sistema enzimático involucrado en la reparación del ADN se comporta de manera similar en los 3 grupos de estudio, ya que los porcentajes de reparación no presentaron diferencia estadísticamente significativa, lo que refuerza lo encontrado con respecto a la frecuencia de daño al ADN y su relación al peso corporal (tabla 5), es decir, la BRM disminuye con la edad por lo que el peso corporal no influye significativamente en la generación de radicales libres y el sistema enzimático realiza su función eficientemente. De este modo, nuestros resultados son congruentes a los hallados en otros estudios, donde la capacidad de reparación oscila entre el 89 a 93% a los 120 minutos aunque en

algunos casos se emplea como agente genotóxico a las radiaciones ionizantes (rayos X o γ) en vez de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que fue el empleado en el presente estudio. Es importante considerar que el daño provocado por H_2O_2 es más heterogéneo produciendo cometas con una daño mayor, y diversos autores señalan que esta puede ser una posible causa para que la reparación no sea completa entre diferentes individuos. En este sentido, Barnett señala que no hay diferencias en la susceptibilidad al H_2O_2 con la edad inmediatamente después del tratamiento, sin embargo un consistente incremento significativo de daño fue observado después de 90 minutos en sujetos con edades entre 65 y 69 comparado con adultos jóvenes y con ancianos de mayores de 75 años. King por su parte, menciona que los ancianos con edades de 75 a 80 años tienen una capacidad de reparación similar al grupo de 35 a 39 años en todos los tiempos ensayados. Finalmente los 3 grupos reparan de manera semejante y eficiente, dado que se señala que en un lapso de 40 años (entre los 20 y 60 años de edad) el declive en la capacidad de reparación del ADN es de aproximadamente un 25.2%¹¹¹, lo cual correspondería a un porcentaje de reparación máximo de 74.8% después de los 60 años, fenómeno que afortunadamente no se encontró en los resultados, ya que de ser así, se presentaría un daño acumulativo en las células conduciendo a alteraciones severas en el ADN que podrían modificar la balanza hacia una frecuencia mayor de senectos con alteraciones fisiopatológicos que los orillarían a una mala calidad de vida, minimizando el éxito obtenido en los ancianos centenarios.

10. CONCLUSIONES

- El peso corporal no influye en la presencia de daño al ADN en ancianos.
 - Los valores promedio de los núcleos y migraciones de la cola (sin núcleo) y total son semejantes en la población de estudio, el índice de masa corporal no influye en ellos.
 - La población de estudio repara eficientemente el daño inducido con H_2O_2 , ya que los porcentajes de reparación no son estadísticamente diferentes en los 3 grupos de estudio.
-

11. REFERENCIAS

1. Campos – Ortega. Características demográficas generales de la población de la tercera edad en el mundo. En: Fajardo OG. El adulto mayor en América Latina. Sus necesidades médico sociales 1995; México: CIESS/OPS: 13-33.
2. Organización Mundial de la Salud. La salud de las personas de edad. Ginebra: OMS Serie Informes Técnicos N° 779: 1989.
3. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Envejecimiento en las Américas. Proyecciones para el siglo XXI. Washington: OPS/OMS: 1998.
4. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. La tercera edad en México. México: INEGI: 1-5: 1993.
5. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Censo poblacional 1995. México: INEGI: 88: 1997.
6. Organización Mundial de la Salud. Aplicaciones de la epidemiología al estudio de los ancianos; Ginebra: OMS: 210, 1984.
7. Secretaría de Salud. Contexto actual de mortalidad 1993. "Aspectos Relevantes". México: Secretaría de Salud. Serie Monográfica N° 6: 15,18,30: 1993.
8. Secretaría de Salud. Estadísticas vitales 1995. México: Secretaría de Salud
9. Secretaría de Salud. Encuesta nacional de enfermedades crónicas 1993. 2ª ed. México D.F: 1995. p. 32.
10. Secretaría de Salud. Mortalidad 1996. México: Subdirección de Planeación. Dirección General de Estadística e Informática. Secretaría de Salud: 1997.
11. Morales MF. Aspectos biológicos del envejecimiento. En: Anzola PE, Galinsky D, Morales MF, Salas AR, Sánchez AM. La atención de los ancianos: Un desafío para los años noventa. 1994 Washington: OPS Publicación Científica No 546: 45-56.
12. Anzola PE. Autocuidado. En: Enfermería gerontológica. Conceptos para la práctica. Washington: OPS Serie Paltex No 31, 1993. p. 26-31.
13. Lozano CA. Envejecimiento en el ser humano. En: Introducción a la Geriátrica. México: Mendez Oteo Editores 1992: 19-24.

14. Salgado AA, González MJ, Alarcon AM. Modificación en órganos, aparatos y sistemas asociados al envejecimiento. En: Fundamentos prácticos de la asistencia al anciano. Barcelona: Masson: 1996. p. 7-14.
15. Gutiérrez Robledo LM. Nutrición en el anciano. En: Casanueva E, Kaufer-Harwitz M, Pérez Lizaur AB, Arroyo p. Nutriología Médica. México: Fundación Mexicana para la Salud / Editorial Médica Panamericana 1995: 122-133.
16. Garry PJ, Vellas BJ. Envejecimiento y nutrición. En: Ziwgler EE, Filer LJ. Conocimientos actuales sobre nutrición. 7ª ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica No 565 19997: 442-448.
17. Cornony – Huntley JC, Harris TB, Everet DF, Albanes D, Micozzi MC, Miles TP, Fildman JJ. An overview of body weight of older persons, including the impact on mortality. *J Clin Epidemiol* 1991; 44:743-753.
18. Svendsen OL, Haarbo J, Heitmann BL, Gotfredsen A, Christiansen C. Measurement of body fat elderly subjects by dual-energy x-ray absorptiometry bioelectrical impedenace, and antropometry. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 1117-23.
19. Rozovski J. Nutrición en los ancianos. Un desafío para los años noventa. Washington: OPS Publicación Científica No 546, 1994: 245-266.
20. Fernández Ballesteros R, Hernández JM, Llorente MG, Izal M, Pozo C, De la Calle A. Mitos y realidades sobre la vejez y la salud. Barcelona: SG Editores 1992: 149-154.
21. Bianchetti A, Rozzini R, Carabellese C, Zanetti O, Trabuchi M. Nutritional intake socioeconomic conditions and health status in large elderly population. *J Am Geriatr Soc* 1990; 38: 521-526.
22. Schlenker DE, Kuczmarski JR, Read M, Nickery EC. Nutrición en el envejecimiento. Madrid: Mosby / Doyma, 1994.
23. Thomae H. Psychosocial aspects of longevity aging. In: Dall JL, Erhini M, Herrling PL, Lehr U, Mejer-Ruge W, Stahelin HB. Prospects in aging 1993. London: Academic Press: 3-22.
24. Merck CO Inc. El manual Merck en geriatría. USA: Doyma; 1997:4-13.
25. Beattie BL, Lovie VY, Dwyer J. Nutrition and health in the elderly. In: Reichel W. Care of the elderly. Clinical aspects of aging. 1995 4ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins: 223-243.

26. Barrocas A, Belcher A, Champagne C, Jastram CH. Nutrition assessment practical approaches. In: Lipschitz DA. Clinics in Geriatric Medicine. Philadelphia, Saunders, 1995; 11 (4): 675-713.
 27. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-43.
 28. Jung RT. Obesity as a disease. *Br Med Bull* 1997; 53: 307-21.
 29. Wilding J. Obesity treatment. *BMJ* 1997; 315: 997-1000.
 30. Seidell JC, Flegal KM. Assessing obesity: classification and epidemiology. *Br Med Bull* 1997; 53: 238-52.
 31. Barrocas A, Belcher A, Champagne C, Jastram CH. Nutrition assessment practical approaches. In: Lipschitz DA. Clinics in Geriatric Medicine. Philadelphia, Saunders, 1995; 11(4): 675-713.
 32. Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA* 1999; 282: 1519-22.
 33. Alvarez GR. Encuesta de las necesidades de los ancianos en México. *Salud Pública Mex* 1983; 25: 21-72.
 34. Avila RH. Epidemiología de la obesidad en México. *Cuadernos de Nutrición* 1997;20: 8-12.
 35. Wickelgren I. Obesity: How big a problem?. *Science* 1998; 280: 1364-7.
 36. Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000; 404: 632-4.
 37. Weksler ME. Obesity: age-associated weight gain and the development of disease. *Geriatrics* 1999; 54: 57-64.
 38. Shimokata H, Tobin JP, Muller DC, Elahi D, Coon PJ, Andres R. Studies in the distribution of body fat: I. Effects of age, sex and obesity. *J Gerontol* 1989; 44: M66-73.
 39. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999; 282: 1523-9.
 40. Willet WC, Manson JE, Stampfer MJ. Weight, Weight change and coronary heart disease in women. *JAMA* 1995; 27: 1461-5.
 41. Deslypere JP. Obesity and cancer. *Metabolism* 1995; 44 (Suppl 3): 24-7.
 42. Tornberg SA, Canstensen J. Relationship between Quetelet's index and cancer of breast and female genital tract in 47,000 women followed for 25 years. *Br J Cancer* 1994; 69:358-61.
-

43. Jebb SA. Aetiology of obesity. *Br Med Bull* 1997; 53: 264-85.
 44. Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000; 404: 644-51.
 45. Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 1998; 280:1371-4.
 46. Blundell JE, Macdiarmid JI. Passive overconsumption: fat intake and short term energy balance. *Ann NY Acad Sci* 1997; 827: 392-407.
 47. Ashok BT, Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999; 34: 293-303
 48. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 1990; 65: 375-98.
 49. Brink JJ, Reicher W. Cell biology and physiology of aging. In: *Care of the elderly. Clinical aspects of aging.* 4th ed Baltimore: Williams & Wilkins, 1995: 472-75.
 50. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
 51. Pal Yu B. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Rad Biol Med* 1996;21: 651-668.
 52. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
 53. Bunker VW. Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci* 1992; 49: 299-312.
 54. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: (suppl 3c): 145-225.
 55. Cheeseman HK, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-93.
 56. Papas MA. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids (suppl)* 1996; 31: S77-S82.
 57. Gutteridge J. Free radicals and aging. *Rev Clin Gerontol* 1994; 4: 279-88.
 58. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed. Oxford: Clarenton Press, 1989.
 59. Anderson A. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 1996: 350: 103-108.
-

60. Kowaltowki JA, Vercesi EA. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 463-71.
 61. Huberman A. La importancia médica de los radicales libres de oxígeno. *Gac Med Mex* 1996; 132: 184-95.
 62. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 305-319.4.
 63. Zorov DB. Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1275: 10-15.
 64. Gabbita SP, Butterfield DA, Hensley K. Aging caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: an electron paramagnetic resonance investigation *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 191-201.
 65. Sohal RS. Mitochondria generate superoxide anion radicals and hydrogen peroxide. *FASEB J* 1997; 11: 1269-1271.
 66. Schöneich C. Reactive oxigen species and biological aging: a mechanistic approach. *Exp Gerontol* 1999; 34: 19-34.
 67. Halliwell B. Reactive oxigen species in living systems: source, bichemistry, and rle in human disease. *Am J Med* 1991; 91 (suppl 3C): 145-225.
 68. Merker K, Grune T. Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescense. *Exp Gerontol* 2000; 35: 779-82.
 69. Esteve JM, Mompó J, García de la Asunción J, et al. Oxidative damage to mitichondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999; 13: 1055-64.
 70. Mitro S, Izumi T, Boldogh I, et al. Repair of oxidative DNA damage and aging. In: Dizdaroglu M, Karakaya AE. *Advances in DNA damage and repair oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences*. Vol 302 Series a Life Science. New York: Plenum Plublishers, 1999: 295-311.
 71. Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 783-792.
 72. Linn S. DNA damage by iron and hidrogen peroxide. In: Dizdaroglu M, Karakaya AE. *Advances in DNA damage and repair oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences*. Vol 302 Series a Life Science. New York: Plenum Plublishers, 1999: 259-66.
-

73. Imlay JA and Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1990; 240:1302-1309.
74. Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991; 37: 166-80.
75. Dizdaroglu M. Mechanisms of oxidative DNA damage; lesion and their measurement. In: Dizdaroglu M, Karakaya AE. *Advances in DNA damage and repair oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences*. Vol 302 Series a Life Science. New York: Plenum Publishers, 1999: 67-87.
76. Tice RR. The single cell gel / comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: *Environmental Mutagenesis*. DH. Phillis and Venitt eds. Oxford, UK 1995: 315-338.
77. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel / comet assay: guidelines for vitro and in vivo genetic toxicology testing . *Environ Mol Mutag* 2000; 35: 206-221.
78. Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000; 463: 13-31.
79. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatography B* 1999; 722: 225-254.
80. Anderson A. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 1996: 350: 103-108.
81. Cutler RG. Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 373s-379s.
82. Aruoma OI, Jenner A, Halliwell B. Application of oxidative DNA damage measurements to study antioxidant actions of dietary components In: *Advances in DNA damage and repair*. Dizdaroglu Ed. New York, 1999: 19-26.
83. Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Natur* 1979; 278: 737-38.
84. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defence in humans against oxidant and radical caused ageing and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6558-6562.

85. DiMascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defence systems: the role of carotenoids tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 194S-200S.
86. Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br Med Bull* 1993; 49: 653-67.
87. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7634-38.
88. Rusting R. Why do we age? *Scientific American* 1992; 267: 86-95.
89. Tamarig RH. Reparación del DNA. En: *Principios de Genética*. Ed Reverete, Barcelona 1996: 483-89.
90. Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron / hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1997; 272: 19095-098.
91. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
92. Pal Yu B. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 651-668.
93. Perez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C and Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B* 1998; 168:149-158.
94. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-47.
95. Yougman LD. Protein restriction (PR) and caloric restriction (CR) compared; effects on DNA damage, carcinogenesis and oxidative damage. *Mutat Res* 1993; 295: 165-79.
96. Coakley EH, Kawachi I, Manson JE, Speizer FE, Willet WC, Colditz GA. Lower levels of physical functioning are associates with higher body weight among middle-age and older women. *Int J Obes* 1998; 22: 958-965.
97. Weindruch R. Restricción calórica y envejecimiento. *Investigación y Ciencia (Edición española de Scientific American)* 1996; 234: 12-19.
98. Mendoza NV, Retana UR, Sánchez RM, Altamirano LM. DNA damage in lymphocytes of elderly patients in relation with total antioxidant levels. *Mech Ageing Develop* 1999; 108: 9-23.
99. Retana UR, Altamirano LM, Mendoza NV, Molina AB. Daño al ADN como posible predictor de fragilidad en el proceso de envejecimiento. *Tópicos de Investigación y Posgrado* 1997; V(3): 180-84.

100. Traber MG. Vitamin E, oxidative stress and healthy ageing. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 822-24.
101. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen radical generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1994; 307: 261-271.
102. Cooke SM, Evans MD, Podmore DI, et al. Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. *FEBS* 1998; 363: 363-367.
103. Betancourt M, Ortiz R, González C, et al. Assessment of DNA damage in leukocytes infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis / comet assay. *Mutat Res* 1995; 331: 65-77.
104. Esteve JM, Mompó J, García De La Asunción J, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999; 13: 1055-1064.
105. Singh PN, Danner BD, Tice RR, et al. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* 1990; 237: 123-30.
106. 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: 137-147.
107. Kruszewski M, Wojewodzka M, Iwaneńko, et al. Application of comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. *Mutat Res* 1998; 416: 37-57.
108. Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 1995; 338: 115-128.
109. Vistisen SL, Ewertz M, Tjønneland, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2241-47.
110. Betti C, Davini T, Giannessi, LN, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994; 307: 323-33.

111. Grossman L, Metanoski G, Farmer E, et al. DNA repair as a susceptibility factor in chronic diseases in human populations. In: Dizdaroglu M, Karakaya AE. *Advances in DNA damage and repair oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences*. Vol 302 Series a Life Science. New York: Plenum Publishers, 1999: 149-167.
-