



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores
"Zaragoza"

"INFLUENCIA DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA EFICIENCIA
DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE, DAÑO OXIDATIVO Y
CAPACIDAD DE REPARACIÓN DEL ADN EN SUJETOS SANOS DE
LA CIUDAD DE MÉXICO"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ADA SARAÍ BERISTAIN PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad que me han brindado al ser parte de este programa y contribuir a mi crecimiento profesional.

Al Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 189814 y el proyecto PAPIIT IN-310305 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación.

Al Laboratorio de Investigación en Gerontología Clínica, de la Unidad de Investigación en Gerontología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por las facilidades brindadas para el desarrollo metodológico de este trabajo y al Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez, quien ha fungido como Director de esta tesis.

También agradezco la supervisión siempre oportuna de los miembros del comité tutorial integrado por el Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano y la Dra. Silvia Patricia Pérez Vera.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Víctor Manuel Mendoza por que una vez más depositó su confianza en mi, y siguió de cerca mis pasos hasta concluir este proyecto. Espero no haber defraudado esa confianza.

Gracias al Dr. Mario A. Altamirano y a la Dra. Patricia Pérez por la comprensión y el apoyo brindado durante todo este tiempo, por abrirme el panorama y por tener una perspectiva tan positiva.

Gracias al Dr. Miguel Betancourt y al Dr. Luis Alberto Vargas porque a pesar de tener sus agendas muy ocupadas, aceptaron ser parte de este proyecto y contribuyeron positivamente con sus atinados comentarios.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Investigación en Gerontología que hicieron posible el desarrollo de este trabajo. A las maestras Mirna, Marilú, Elsa, Martha y Raquel porque son un gran ejemplo a seguir y por compartir sus conocimientos conmigo.

DEDICATORIAS

Para mi amado Salomón.

Por ser fuente de inspiración y de Amor. Hijo, que esta tesis sea testimonio del principio de una nueva vida, y que el día que pueda contarte su historia podamos aprender y re aprender grandes lecciones de vida.

Para mi Papá, Mamá y hermano.

Por ser las personas tan maravillosas que son, por permanecer siempre a mi lado, por ser los amigos más comprensivos, sinceros y entregados que yo conozco, por predicar siempre con el buen ejemplo y enseñarme la importancia de concluir lo que comienzo.

Para mis amigos y amigas.

Por permanecer conmigo en los momentos más difíciles y más felices de mi vida. Juani sabes que tienes un lugar especial en mi corazón, mil gracias por tu apoyo.

Doy Gracias a Dios por todas las bendiciones que me da a diario, porque permite que ustedes sean parte de mi vida y por permitirme ver culminado este proyecto.

INDICE

I. RESUMEN	3
I.1 Abstract	4
II. ABREVIATURAS	5
III. INTRODUCCIÓN	7
IV. MARCO TEÓRICO	8
IV.1. Envejecimiento	8
IV.1.1. Transición demográfica y epidemiológica	10
IV.1.2. Teorías del envejecimiento y teoría de los radicales libres	11
IV.2. Equilibrio pro-oxidante/antioxidante	15
IV.2.1. Especies reactivas de oxígeno (EROs)	15
IV.2.2. Daño oxidativo a biomoléculas	17
IV.2.3. Sistema de defensa antioxidante (SAox)	20
IV.2.4. Estrés oxidativo	22
IV.2.5. Biomarcadores de Estrés oxidativo	23
IV.3. Estrés oxidativo y envejecimiento	27
IV.4. Factores pro-oxidantes	31
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
VI. HIPÓTESIS	37
VII. OBJETIVOS	38
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	39
VIII.1. Diseño de la investigación y población de estudio	39
VIII.1.1. Criterios de inclusión	39
VIII.1.2. Criterios de exclusión	39
VIII.1.3. Consideraciones éticas	40
VIII.2. Variables	40
VIII.2.1. Clasificación de variables	40
VIII.2.2. Operacionalización de variables	40
VIII.3. Procedimientos y técnicas	43
VIII.3.1. Colección de muestras sanguíneas	43
VIII.3.2. Determinación de los parámetros bioquímicos y hematológicos	43

VIII.3.3. Determinación de los marcadores biológicos de estrés oxidativo	45
VIII.3.3.1. Lipoperoxidación plasmática por TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)	45
VIII.3.3.2. Daño oxidativo al ADN por electroforesis unicelular alcalina	46
VIII.3.3.3. Superóxido dismutasa (SOD)	48
VIII.3.3.4. Glutación peroxidasa (GPx)	50
VIII.3.3.5. Cálculo de la razón SOD/GPx	51
VIII.3.3.6. Capacidad antioxidante plasmática total (AT)	52
VIII.3.3.7. Cálculo de la capacidad antioxidante residual (GAP)	53
VIII.3.3.8. 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG)	54
VIII.3.4. Medidas antropométricas y cuestionario de factores pro-oxidantes	55
VIII.4. Diseño estadístico	56
IX. RESULTADOS	57
IX. 1. Parámetros bioquímicos, hematológicos y antropométricos	57
IX. 2. Lipoperoxidación plasmática y marcadores de daño al ADN por edad y sexo	57
IX. 3. Marcadores biológicos de la actividad del sistema antioxidante	58
IX. 4. Sistema antioxidante, daño oxidativo y capacidad de reparación	60
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78
XI. CONCLUSIONES	89
XII. PERSPECTIVAS	91
XIII. REFERENCIAS	92
XIV. ANEXOS	106
XIV.1. Carta de consentimiento informado	107
XIV.2. Cuestionario de factores de riesgo pro oxidantes.	109

I. RESUMEN

ANTECEDENTES: Las especies reactivas de oxígeno (EROs) tienen gran importancia biológica debido a que poseen funciones como moduladores de la respuesta celular; sin embargo pueden estar vinculadas con el daño oxidativo en diferentes biomoléculas y el establecimiento del estrés oxidativo (EOx). Por otro lado, la relación del EOx como causa o consecuencia del envejecimiento es controversial, ya que aunque se ha propuesto que el EOx es el principal factor que desencadena envejecimiento; también se ha sugerido que el envejecimiento exitoso es consecuencia de mecanismos adaptativos que favorecen la resistencia al EOx, de ahí que se cuestione si el envejecimiento *per se* cursa con un incremento significativo de EOx y daño al ADN.

OBJETIVO: Determinar la influencia del envejecimiento sobre la eficiencia del sistema antioxidante, daño oxidativo a biomoléculas y capacidad de reparación del ADN en sujetos sanos de la ciudad de México.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se llevó a cabo un estudio transversal y comparativo en una muestra por cuotas de 162 sujetos clínicamente sanos con residencia en la ciudad de México. Se conformaron 3 grupos de estudio acorde con los siguientes intervalos de edad: i) 25-44 años ($n = 73$), ii) 45-64 años ($n = 68$) y iii) 65 años y más ($n = 21$). Se consideraron como variables dependientes el EOx y el daño al ADN, y como variables independientes la edad y el sexo. Se midieron los siguientes marcadores de EOx y daño al ADN: lipoperoxidación plasmática (LPO) por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX) y capacidad antioxidante plasmática total (AT) por métodos colorimétricos (Randox laboratorios Ltd.[®]), se calcularon razón SOD/GPx y capacidad antioxidante residual (GAP). El daño oxidativo y la capacidad de reparación del ADN se determinaron por ensayo cometa y concentración en orina de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), respectivamente. Los datos fueron analizados a través de promedios y error estándar (EE), como pruebas de comparación se emplearon t de Student y ANDEVA y como prueba de asociación regresión lineal múltiple con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de LPO y 8-OHdG, ni en la actividad de SOD, GPx, AT y GAP en los grupos conforme aumenta la edad ($p > 0.5$). No obstante, en el análisis estratificado por edad y sexo, las mujeres de 65 años y más mostraron un promedio de migración de ADN significativamente menor y un mayor porcentaje de células sin daño al ADN que las mujeres de 25 a 44 años. Asimismo, se observó una correlación positiva significativa entre la edad y el número de células sin daño al ADN ($r = 0.22$, $p < 0.05$) en el análisis de la población general. Sin embargo, en el análisis estratificado por edad y sexo, en el grupo de hombres de 45 a 64 años se encontró una correlación negativa entre la edad y la migración de ADN ($r = -0.4$, $p < 0.05$), en contraste en el grupo de mujeres del mismo grupo de edad se encontró una correlación positiva significativa entre el porcentaje de células sin daño al ADN y la edad ($r = 0.22$, $p < 0.05$).

Por otro lado, en las mujeres de 25 a 44 años se encontró una correlación positiva ($p < 0.05$) entre la edad y la actividad de GPX ($r = 0.46$), la AT ($r = 0.61$) y el GAP ($r = 0.57$) y negativa con la razón SOD/GPX ($r = -0.43$). Asimismo, se encontró en las mujeres de 45 a 64 años correlación negativa estadísticamente significativa entre la edad y la actividad de SOD ($r = -0.38$), GPX ($r = -0.42$) y GAP ($r = -0.46$).

CONCLUSIONES: Los resultados sugieren que el envejecimiento *per se* no se acompaña de un incremento en el EOx ni daño oxidativo al ADN, debido a la eficiencia del sistema antioxidante conforme aumenta la edad determinada en gran medida por la actividad de la SOD, GPx y GAP. Nuestros hallazgos también muestran que en los individuos sanos se presenta un proceso adaptativo al EOx y al daño al ADN vinculado probablemente al fenómeno de hormesis, lo cual se observa con mayor evidencia en las mujeres, apoyando la hipótesis que vincula la mayor eficiencia del sistema antioxidante con el sexo femenino.

I.1. Abstract

BACKGROUND: The reactive oxygen species (ROS) have great biological importance, because they are involved in the cellular signalling of vital functions; at the same time, the ROS are linked with the oxidative stress (OxS) and oxidative damage to biomolecules as the DNA. On the other hand, it is controversial if the OxS is cause or consequence of the aging. In this sense, it has been proposed out that the OxS is the main factor that triggers aging. Although likewise it has been pointed out that the successful aging is consequence of adaptive mechanisms linked to resistance to the OxS, for this reason it is questioned if the aging *per se* increase the OxS and oxidative DNA damage.

OBJECTIVE: To determine the influence of the aging on the efficiency of the antioxidant system, oxidative damage and DNA repair capacity in healthy subjects from Mexico City.

MATERIAL AND METHODS: A cross sectional and comparative study was carried out in a sample of 162 healthy subjects lived in Mexico city whose were divided into three different age groups: i)25-44 years (n = 73), ii) 45-64 years (n = 68) and iii)≥65 (n = 21). We considered the oxidative stress (OxS) and oxidative DNA damage as dependent variables and age and sex as independent variables. We measured lipoperoxides in plasma by the thiobarbituric acid substances reactive method, total antioxidant status in plasma (TAS), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities by colorimetric methods (Randox Laboratories, Ltd.[®]), and SOD/GPx ratio and antioxidant gap (GAP) it were calculated. The oxidative DNA damage it was determinate by comet assay and the DNA repair by 8-hidroxy-2-desoxiguanosine (8-OHdG) assay in urine. Data were expressed by means ± standard error (SE), Student t-test and ANOVA were used for comparative statistics and lineal regression as association tests it was used. A p value <0.05 was considered significant.

RESULTS: Significant differences were not found in mean plasmatic lipoperoxides and 8-OHdG concentrations, neither SOD and GPx activities or TAS and GAP by age groups ($p>0.5$). However, significant differences were observed in DNA damage by age and sex analysis: DNA migration mean was significant lower in ≥65 years than 25-44 years women. Likewise the percentage of cells with out DNA damage was higher in ≥65 years than 25-44 years women. On the other hand, we observed a significant positive correlation between age and the number of cells with out DNA damage ($r = 0.22$, $p<0.05$) in all population. However, in the analysis by age and sex groups, it was found a significant negative correlation between age and DNA migration mean ($r = -0.40$, $p<0.05$) in group of 45-64 years males and a significant positive association between age and percentage the cells with out DNA damage ($r = 0.22$, $p<0.05$) in women of the same age group.

It was found a significant positive correlation ($p<0.05$) between age and GPx activity ($r = 0.46$), AT ($r = 0.61$) and GAP ($r = 0.57$) and negative correlation between age and SOD/GPx ratio ($r = -0.43$) in 25-44 years females. At the same time it was found a significant negative correlation between age and SOD ($r = -0.38$) and GPx ($r = -0.42$) activities and GAP ($r = -0.46$) in a 45-64 years females.

CONCLUSIONS: Our findings suggest that aging *per se* it is not associated with an increase of OxS or oxidative DNA damage, due to age-related efficiency of the system antioxidant above all in women, characterized by an increase of SOD, GPx activities and GAP linked to hormesis phenomenon probably.

II. ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-sulfonato]
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNm	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
AGEs	Productos de glicosilación avanzada
AM	Adulto mayor
ANDEVA	Análisis de varianza
AT	Capacidad antioxidante plasmática total
BER	Reparación por escisión de bases
BHT	Butiril hidroxitolueno
°C	Grado Celsius de temperatura
CAT	Catalasa
CTE	Cadena de transporte de electrones
Cu/Zn SOD	Cobre/Zinc-Superóxido dismutasa o SOD citosólica
dL	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
EOx	Estrés oxidativo
EROs	Especies reactivas de oxígeno
g	Gramo
GAP	Capacidad antioxidante residual
GC-MS	Cromatografía de gases- espectrometría de masas
GHS	Glutación reducido
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
Hb	Hemoglobina
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR	Reparación de ADN por recombinación homóloga
IC _{95%}	Intervalo de confianza al 95%
ICC	Índice cintura-cadera
IMC	Indice de masa corporal
INT	2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio
Kg	Kilogramo
L	Litro
LPO	Lipoperoxidación plasmática, lipoperóxidos plasmáticos
m ²	Metro cuadrado
mA	Miliamperios
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramo

mL	Mililitro
mm de Hg	Milímetros de mercurio
mmol	Milimoles
Mn-SOD	SOD mitocondrial, Manganeso-superóxido dismutasa
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
Na ₂ EDTA	Etilendiamintetraacetato disódico
NaOH	Hidróxido de sodio
NER	Reparación de ADN por escisión de nucleótidos
ng	Nanogramo
NHEJ	Reparación del ADN por unión de terminales no homóloga
nm	Nanómetro
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
PM10 y PM2.5	Material particulado menor de 10 micras y menor de 2.5 micras
RL	Radical libre o radicales libres
RM	Razón de momios
rpm	Revoluciones por minuto
SAox	Sistema de defensa antioxidante
SOD	Superóxido dismutasa
SOD/GPx	Razón SOD/GPx
TAD	Tensión arterial diastólica
TAS	Tensión arterial sistólica
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEAC	Actividad antioxidante en equivalentes Trolox
TMP	Terametoxipropano
U	Unidades internacionales
uL	Microlitro
um	Micrometro
umol	Micromol
UV	Ultravioleta

III. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el mundo está cursando por una transición demográfica importante y nuestro país no está exento de este fenómeno poblacional por lo que se han impulsado líneas de investigación orientadas al estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en el envejecimiento usual, exitoso y patológico, tomando en cuenta nuestro entorno sociocultural con la finalidad de comprender el proceso en todas sus dimensiones.

Al respecto, en la teoría de los radicales libres (RL), propuesta en 1956, se enunciaba que el factor principal que da origen al envejecimiento e incrementa la vulnerabilidad para las enfermedades crónicas degenerativas es el estrés oxidativo (EOx), es decir, la acumulación de daño oxidativo en las macromoléculas, propiciado por una inadecuada protección contra el efecto de los RL derivados del metabolismo aeróbico. Sin embargo, aun en la actualidad no hay evidencias consistentes que nos permitan concluir si el exceso de RL promueve el envejecimiento por la pérdida de la reserva homeostática o si el EOx es una consecuencia directa de los cambios que ocurren en este proceso fisiológico. La inconsistencia en las investigaciones que pretenden demostrar alguna relación entre el envejecimiento y el EOx, se debe a los diferentes modelos y protocolos seguidos, además de que el análisis del EOx se limita a los resultados aislados de los componentes pro-oxidantes y antioxidantes debido a la falta de un constructo que nos permita evaluar integralmente dicho proceso dinámico.

Por tal motivo, la finalidad del presente estudio es determinar la influencia del envejecimiento sobre la eficiencia del sistema antioxidante, daño oxidativo y capacidad de reparación del ADN en sujetos sanos de la ciudad de México, con la finalidad de contribuir en el campo de la Gerontología biológica al esclarecimiento de algunos de los factores vinculados con el envejecimiento exitoso y brindar fundamento teórico para la implementación de programas preventivos y/o tratamientos terapéuticos encaminados a mejorar la calidad de vida de los ancianos.

IV. MARCO TEORICO

El envejecimiento humano es un proceso universal y multifactorial en el que se presentan cambios a nivel morfofisiológico, bioquímico y psicosocial que pueden afectar de diferente manera a los individuos en función del grado y la rapidez con que se presenten alterando la respuesta homeostática. Al respecto, en 1956 Denhan Harman propuso que el envejecimiento es producto del EOx, es decir, el daño oxidativo acumulado en células y tejidos ocasionado por los radicales libres (RL), lo que propicia una mayor susceptibilidad para la presencia de enfermedades crónico-degenerativas durante el proceso de envejecimiento.

Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que el envejecimiento no necesariamente está relacionado con enfermedad o deterioro funcional, de ahí que en el campo de la Gerontología biológica es controversial la teoría del envejecimiento y radicales propuesta por Harman (1956). En este sentido, es necesario esclarecer si el exceso de RL promueve el envejecimiento por la afectación de la respuesta homeostática o si el EOx es una consecuencia directa de los cambios que ocurren en este proceso fisiológico o si sólo se presenta el EOx cuando al envejecimiento se suman las enfermedades crónicas o las alteraciones metabólicas que caracterizan la fragilidad.

A continuación se presentará la información teórica necesaria para enmarcar conceptualmente y fundamentar nuestra investigación y así poder precisar el problema y la hipótesis. Se incluirán algunas definiciones fundamentales relacionadas con el envejecimiento, algunos aspectos sobre transición demográfica y epidemiológica en México, así como los mecanismos bioquímicos involucrados en el EOx, algunos marcadores biológicos y las evidencias científicas de describen su relación con el envejecimiento.

IV.1. Envejecimiento

El envejecimiento humano es un proceso universal y multifactorial caracterizado por modificaciones a nivel biológico, psicológico y social determinadas por factores de tipo genético, ambiental y sociocultural que se presentan en todos los individuos a diferente ritmo y de diferente manera.¹

Para fines de nuestro estudio nos apegaremos a la definición propuesta en la Unidad de Investigación en Gerontología de la Facultad de Estudios Superiores ZARAGOZA, UNAM, la cual establece que el envejecimiento es un “*proceso gradual y adaptativo, caracterizado por una disminución relativa de la respuesta homeostática, debida a las modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, propiciadas por los cambios inherentes a la edad y al desgaste acumulado ante los retos que enfrenta el organismo a lo largo de la historia del individuo en un ambiente determinado*”.²

Esta definición se apoya en el enfoque teórico de la alostasis (*Allostasis*) que establece que el organismo responde de manera activa ante amenazas o retos estresantes con el fin de mantener la homeostasis por medio de un proceso adaptativo conocido como “*alostasis*”; sin embargo este mecanismo de respuesta adaptativa puede representar un costo biológico si el estímulo estresante se presenta en forma repetida, y hace que el esfuerzo por la adaptación se torne excesivo, lo que propicia la carga alostática (*Allostatic load*), haciendo menos eficiente el proceso y favoreciendo la aparición de padecimientos infecciosos y crónico-degenerativos.³⁻⁵

Algunas definiciones de *envejecimiento* lo describen como un proceso acumulativo e irreversible con deterioro progresivo de todos los órganos y tejidos y con la subsiguiente disminución de la actividad fisiológica del organismo hasta hacerlo incapaz de enfrentar las circunstancias y condiciones de su entorno, propiciando una mayor vulnerabilidad para enfermedades infecciosas, metabólicas, autoinmunes, neoplásicas, respiratorias, articulares y cardiovasculares.^{6,7} En este sentido, difícilmente se pueden diferenciar los cambios asociados al proceso fisiológico de envejecimiento y los vinculados a las enfermedades crónicas que se presentan con mayor frecuencia en la vejez si no se aclara que la disminución de la función orgánica, es debida a la enfermedad y no al envejecimiento en si mismo, ya que este último es un proceso gradual y adaptativo.

Por tal motivo, se ha dividido al envejecimiento en exitoso, usual y frágil considerando que este proceso es consecuencia de la interacción biológica y sociocultural a lo largo de la vida del individuo. En este sentido, Rowe y Kahn señalan que un individuo cursa un “*envejecimiento exitoso*” cuando solo presenta cambios inherentes a esta etapa de la vida, debido a una respuesta alostática eficiente su pérdida fisiológica es mínima, por lo que conservan su funcionalidad e independencia (física, mental y social), es mejor su calidad de vida y longevidad. En el “*envejecimiento usual*” además de los cambios inherentes a la edad, la carga alostática propicia la

aparición de enfermedades crónico-degenerativos y consecuentemente, alteraciones morfológicas y fisiológicas que repercuten negativamente en la funcionalidad, calidad de vida y longevidad del individuo. Por otro lado, en el “*envejecimiento con fragilidad*” además de los cambios inherentes al proceso, la excesiva carga alostática provoca una disminución acentuada de la reserva homeostática que incrementa la vulnerabilidad a la descompensación por las enfermedades agudas y crónicas manifestándose como discapacidad y dependencia funcional con repercusión significativa en la calidad de vida y longevidad de los individuos.^{8,9}

Los parámetros cronológicos para identificar el envejecimiento y la vejez son distintos. Aunque no es posible establecer con precisión en que momento una persona empieza a envejecer, en términos generales se señala como etapa de inicio del envejecimiento al final de la adultez a partir de la quinta década de vida (alrededor de los 45 años). Por otro lado, el inicio de la vejez, es un criterio establecido por la sociedad para catalogar a una persona como vieja o anciana, lo cual tiene implicaciones sociales y económicas. En este sentido, por consenso internacional se ha aceptado catalogar como ancianos a aquellos individuos mayores de 65 años en países desarrollados y a individuos mayores de 60 años en países en desarrollo como el nuestro, en el que por disposición federal se les cataloga como “adultos mayores” (AM).¹⁰

IV.1.1. Transición demográfica y epidemiológica.

En las últimas décadas se ha incrementado el interés en el proceso de envejecimiento debido por un lado, al aumento significativo de la población mayor de 60 años en el mundo y por otro lado, debido a la transición epidemiológica que se presenta como efecto secundario de esta transición demográfica.

En el año 2002 la Organización de las Naciones Unidas, en su resumen ejecutivo, comunicó que en el año 2000 el 10% de la población mundial estaba constituida por ancianos y se espera que para el año 2050 esta cifra aumente a un 21%. En este sentido, se ha establecido que esta tendencia al envejecimiento de la población es casi irreversible ya que el grupo de personas de 60 años y más aumenta a razón de 2% por año y está acompañada de descensos en los porcentajes de población joven y en las tasas de fecundidad y mortalidad e incremento en la esperanza de vida.¹¹

A pesar de que México aún no es considerado un país de ancianos, se encuentra en franco proceso de envejecimiento poblacional que obedece a esta transición demográfica. En el año 2000 existían aproximadamente 7 millones de personas mayores de 60 años (6.8% de la población total del país) y de acuerdo a las proyecciones realizadas se espera que para el año 2050 sean más de 32.5 millones, que correspondería aproximadamente del 25 al 28% de la población mexicana total.¹²⁻¹³

Este envejecimiento poblacional requerirá ajustes en el ámbito económico político y social de la mayoría de los países, incluyendo el nuestro, debido a que la transición demográfica repercute en las causas de mortalidad y morbilidad de la población. Solo por mencionar un ejemplo, en la década de los 70's las principales causas de muerte en la población general eran las enfermedades infecciosas y para el año 2001 la diabetes mellitus (DM) era la principal causa de muerte en población general y la tercera causa de muerte en población anciana; actualmente se ha señalado que las principales causas de muerte en AM en el mundo y en nuestro país son en primer lugar las enfermedades del corazón, seguidas de los tumores malignos y la DM. Aunado a ello, en la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 realizada en México, se detectó que casi el 50% de las mujeres y el 57% de los hombres ancianos padecen Hipertensión arterial (HTA) y aproximadamente el 22% de la población anciana padece DM, enfermedades consideradas como las principales causas de morbilidad, por lo que actualmente las enfermedades crónico-degenerativas se han convertido en el principal problema de salud de nuestro país.^{14, 15}

Las enfermedades crónicas en la vejez y sus repercusiones en la funcionalidad física, mental y social pueden constituir una carga sanitaria y financiera significativa para el anciano, la familia y el sistema de atención a la salud. Por tal motivo, es conveniente realizar investigaciones con el propósito de conocer a fondo los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en el proceso de envejecimiento que permitan fundamentar la aplicación de programas para la prevención, detección oportuna y control de enfermedades crónico-degenerativas, con la finalidad de disminuir su prevalencia e incidencia, así como evitar o retardar la aparición de complicaciones, mejorando la calidad de vida de los individuos.

IV.1.2. Teorías del envejecimiento y teoría de los radicales libres.

Diversos datos de tipo biológico, epidemiológico y demográfico han dado origen a un gran número de teorías que pretenden explicar los fenómenos que dan origen al envejecimiento.

En este sentido, debido a que el envejecimiento no tiene un origen único, no existe una teoría que pueda explicar por si misma y en forma determinante el origen del envejecimiento, de hecho, se puede requerir del argumento de varias de estas teorías para entender este fenómeno tan complejo.¹⁶⁻¹⁸

No obstante, aunque las teorías no son mutuamente excluyentes, para facilitar su estudio y aplicación se ha aceptado el clasificarlas en sistémicas, evolucionarias, moleculares y celulares.¹⁹

En las teorías sistémicas, como la teoría neuroendocrina y la teoría inmunológica se considera que el envejecimiento está relacionado con la declinación de la actividad fisiológica celular de los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico, esenciales en el control y mantenimiento de otros sistemas dentro del organismo, influyendo en la habilidad de los organismos para comunicarse y adaptarse al ambiente en el cual viven. La aceptación de estas teorías es parcial debido a que se considera que los cambios relacionados con la edad en la actividad celular de estos sistemas, son manifestaciones secundarias al proceso de envejecimiento y no las que dan origen al mismo.^{19,20}

Dentro de las teorías evolucionarias encontramos a la teoría de la acumulación de errores, la teoría del soma desechable y la teoría del antagonismo pleiotrópico.²¹ La teoría de la acumulación de errores, también conocida como teoría del error catastrófico, propone que el envejecimiento se produce por la acumulación de errores en biomoléculas vitales como ADN y proteínas que en un nivel suficiente pueden ocasionar una declinación fisiológica catastrófica asociada al desarrollo de patologías y envejecimiento.²² La teoría del soma desechable argumenta que el organismo somático es mantenido y preservado efectivamente solo para la etapa reproductiva y después es desechable; inherente a esta teoría es la idea de que el mantenimiento somático o la longevidad tiene un costo, y el balance de recursos invertidos en la longevidad vs. la salud reproductiva determinan la esperanza de vida.¹⁹ Por otro lado la teoría del antagonismo pleiotrópico sugiere que algunos genes pueden presentar en etapas temprana de la vida efectos benéficos que influyen en la supervivencia y reproducción pero poseen efectos deletéreos con la edad y por lo tanto contribuyen directamente a la senescencia.^{19, 20}

Dentro de las teorías moleculares encontramos a la teoría de la regulación genética que propone que los genes de longevidad, están vinculados con el establecimiento del envejecimiento, y pueden modular la velocidad con que envejecemos.¹⁹

Se ha demostrado en nemátodos, moscas de la fruta y ratones que existen genes que al ser manipulados (inactivados o sobre expresados), pueden aumentar la longevidad debido a que mejoran los mecanismos de reparación o incrementan la resistencia al estrés (cuadro IV.1.).^{23,24} Aunado a ello, también existen evidencias que indican que la esperanza de vida máxima potencial se encuentra bajo control genético y por estudios realizados en centenarios y sus familiares se ha apoyado la idea de que la longevidad excepcional (una edad superior a los 90 años) tiene un componente genético esencial.^{19, 23,24}

Aumento en la esperanza de vida por:	
Modificación genética simple	Sobre-expresión de genes
Nemátodos	
age-1	old-1 (tkr-1)
daf-2	sir-2
clk-1	hsp-70
eat-2	hsp-16
isp-1	hsf-1
tor-1	
Moscas de la fruta	
mth	hsp70
Indy	sod1
InR	Pcmt
Chico	MsrA
Ratones	
Prop-1 ^{df/df}	αMUPA
Pit-1 ^{dw/dw}	
p66 ^{sh}	
GHR/BP	
Ghrhr	
FIRKO	
Igf1r ^{+/-}	

Cuadro IV.1. Genes que al ser modificados pueden incrementar la esperanza de vida.

En la actualidad también se ha considerado el papel de los SNPs (del inglés, single nucleotide polymorphisms) en el envejecimiento y la longevidad, que pueden estar relacionados con la variación en la mortalidad o incluso en el riesgo para el padecimiento de enfermedades crónicas de la vejez.²⁴

Por otro lado, dentro de las teorías celulares encontramos a la teoría de la senescencia celular y a la teoría de los radicales libres.¹⁹ La primera indica que la senescencia celular es el proceso que limita el número de divisiones normales de células en cultivo y es conocido como un mecanismo de supresión de tumores, que también determina la esperanza de vida máxima de un organismo.

Este límite en la capacidad de replicación ocurre después de determinado número de divisiones celulares y resulta del acortamiento de telómeros, pequeñas porciones de ADN al final de los cromosomas que previenen la degradación y fusión con otros cromosomas.²⁵ Por otro lado, la senescencia inducida por estrés ocurre en respuesta a una gran variedad de factores que incluyen el daño al ADN, modificaciones en la estructura de la heterocromatina y señales mitogénicas resultado de la expresión de oncogenes y puede promover la acumulación de células senescentes disfuncionales que desarrollan fenotipos de envejecimiento y patologías relacionadas con la edad.^{19, 25-27}

Por último, se encuentra la *teoría de los radicales libres* en la que se enmarca conceptualmente nuestra investigación, de hecho, esta teoría es una de las más conocidas y plausibles para explicar el proceso de envejecimiento, la cual fue propuesta por Denhan Harman en 1956.²² Esta teoría propone que la acumulación de daño oxidativo en las macromoléculas, propiciado por una inadecuada protección contra los RL derivados del metabolismo aeróbico normal, ocasiona un deterioro funcional progresivo de las células, tejidos y órganos y es el principal mecanismo endógeno que da origen al envejecimiento.²⁸⁻³⁰ Esta teoría asume que es una causa única la que da origen al envejecimiento y puede modificarse por factores genéticos y ambientales.³⁰

El hecho por el cual esta teoría ha sido tan aceptada hasta nuestros días se debe a que puede explicar entre otros aspectos: i)Cómo los organismos como entes individuales pierden la habilidad para mantener la homeostasis en la última etapa de la vida incrementando la vulnerabilidad para enfermedades crónico-degenerativas, ii)Clarifica las bases de las grandes variaciones en la esperanza de vida de cohortes, cadenas genéticas y especies, iii)Identifica los factores cruciales responsables para la prolongación de la esperanza de vida por mutaciones de genes únicos o por regímenes especiales tales como la restricción calórica (RC), y iv)Demuestra que el índice de envejecimiento puede ser manipulado por variaciones en los factores que se espera son causales de senescencia.^{30,31}

Por otro lado, debido a que en las últimas dos décadas, se ha observado que las especies reactivas de oxígeno (EROs) que no son RL, como los peróxidos, están asociadas con el daño oxidativo en las células, la *teoría de los radicales libres* se ha modificado por *teoría del estrés oxidativo*, y actualmente estos dos términos se usan indistintamente.^{31,32}

IV.2. Equilibrio pro-oxidante/antioxidante

IV.2.1. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

El oxígeno (O_2) es un compuesto esencial en el metabolismo de todos los organismos aeróbicos, ya que participa en diversas reacciones de oxido-reducción (redox) como aceptor de electrones, incluyendo la síntesis de ATP durante la respiración mitocondrial; sin embargo, durante estos procesos sufre reducciones sucesivas dando origen a productos intermedios y finales más reactivos conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs), que en su mayoría son RL.^{33,34}

Los RL son entidades químicas ya sea átomos o moléculas que contienen al menos un electrón no apareado en uno de sus orbitales moleculares y son extremadamente reactivos cuando tienden a asociarse apareando sus electrones libres.³³ El oxígeno en sí mismo, es un birradical ya que posee dos electrones no apareados que se encuentran en dos orbitales moleculares distintos con giros paralelos; termodinámicamente busca estabilizarse produciendo moléculas de agua, sin embargo su naturaleza birradical impide que capte dos electrones simultáneamente por lo que solo puede aceptar un electrón a la vez, desestabilizando a la molécula del cual lo toma, formando así otros productos reactivos conocidos como EROs que incluyen más RL.^{22, 35, 36}

En la reducción sucesiva del oxígeno para formar moléculas de agua están involucradas cuatro reacciones y se forman al menos tres EROs por la adición secuencial de electrones: la reducción univalente del oxígeno produce el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), un radical que en condiciones fisiológicas no produce daño oxidativo en biomoléculas, pero es convertido espontáneamente o por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por último en la reducción trivalente del oxígeno se forma el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que es considerado como la ERO con más poder oxidante (Figura IV.1).^{22, 35}

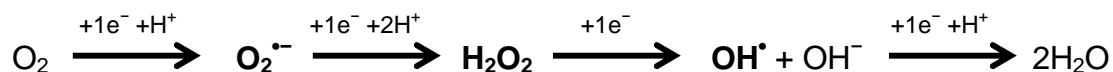


Figura IV.1. Reducción de oxígeno molecular a agua y EROs intermediarios formados.

El H_2O_2 tiene menor poder oxidante que el radical $\text{O}_2^{\cdot -}$, pero puede ser reducido por sales de metales en transición como Ti(III), Cu(I), Fe(II), Co(II) o Ni(II) para formar OH^\bullet . Sin embargo, en términos de la posibilidad de generación de este radical *in vivo*, el metal que ha recibido mayor atención es el hierro; de este modo, las sales de hierro pueden reaccionar con el H_2O_2 para formar OH^\bullet de acuerdo a la reacción de Fenton (Figura IV.2).³⁷



Figura IV.2. Radical OH^\bullet formado por medio de la reacción de Fenton que involucra sales ferrosas.

En adición, el radical superóxido puede reducir ciertos quelatos férricos y dar origen al radical hidroxilo por medio de una reacción conocida como reacción de Haber-Weiss (Figura IV.3).^{37, 38}

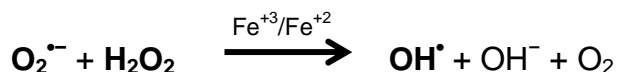


Figura IV.3. Radical OH^\bullet formado por medio de la reacción de Haber-Weiss a partir de radical superóxido.

Existen otras EROs de notable importancia que incluyen radicales con un átomo de carbono central (R^\bullet) y son el resultado de la acción del radical OH^\bullet sobre una molécula biológica (RH). Estos radicales interactúan con el oxígeno para formar radicales peroxilo (ROO^\bullet) y estos a su vez pueden participar en otras reacciones para formar radicales alcoxilo (RO^\bullet).^{22, 38} Además de estas, existen otras especies oxidantes no radicales como el ácido hipocloroso (HOCl), los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) derivados principalmente de los ácidos grasos poliinsaturados, los aldehídos reactivos y el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$).²²

Existe un gran número de fuentes de EROs de origen exógeno como el smog, el ozono, pesticidas, xenobióticos, humo de cigarro y radiación ionizante, ultravioleta, visible o térmica.³³

Así mismo, las EROs pueden formarse por diversos procesos endógenos. El radical $O_2^{\bullet-}$ puede producirse enzimáticamente en reacciones catalizadas por las NADPH oxidasas localizadas en las membranas de células polimorfonucleares, macrófagos y células endoteliales; también pueden producirse por oxigenasas dependientes del citocromo P450 y en la conversión proteolítica de xantina en xantin oxidasa en la que también se produce el H_2O_2 .³⁹

Aunado a estos procesos, se encuentra la respiración celular que se lleva a cabo en la cadena de transporte de electrones (CTE) de la mitocondria, que representa la principal fuente intracelular de EROs debido a que bajo condiciones fisiológicas se estima que del 1 al 2% del consumo diario total de oxígeno se convierte en radical $O_2^{\bullet-}$.^{40, 41}

Las evidencias científicas sugieren que las EROs desempeñan una función importante en la señalización y regulación celular, tanto en procesos fisiológicos (favoreciendo el establecimiento de la homeostasis redox del organismo) como en procesos patológicos.^{42, 43} No obstante, por su alto poder oxidante las EROs se han considerado como productos tóxicos del metabolismo que pueden potencialmente ocasionar daño en lípidos, proteínas, carbohidratos y en el ADN cuando se incrementan de forma significativa en células y tejidos debido a un exceso en su producción, a una deficiente eliminación o ambos.^{42, 44}

IV.2.2. Daño oxidativo a biomoléculas

Los lípidos son moléculas particularmente susceptibles de sufrir el ataque por EROs. Las membranas celulares contienen fosfolípidos que pueden ser oxidados fácilmente por un proceso denominado lipoperoxidación que comprende una serie de reacciones en cadena que comienza por la abstracción de un átomo de hidrógeno por parte de un RL, dando origen a un radical lipídico (dieno conjugado) con un átomo de carbono central (L^{\bullet}), que en un ambiente aeróbico produce un radical peroxilo (LOO^{\bullet}); una vez iniciada la reacción, este radical peroxilo puede propagar la peroxidación al sustraer un átomo de hidrógeno de un fosfolípido adyacente convirtiéndose a si mismo en un hidroperóxido orgánico ($LOOH$), el cual se puede descomponer en otras EROs, incluyendo radicales alcoxilo (LO^{\bullet}), aldehídos, epóxidos lipídicos y alcoholes.^{34,45}

En la actualidad se ha demostrado que los lipoperóxidos y oxisteroles inducen la producción de enzimas de detoxificación y están involucrados en la expresión genética, en la regulación del metabolismo del colesterol y en la homeostasis; sin embargo, cuando exceden la capacidad de las defensas antioxidantes y se acumulan, producen efectos dañinos deletéreos. Con la acumulación de lipoperóxidos en la membrana celular, se altera la permeabilidad, se incrementa su fluidez, su rigidez y en casos extremos se pierde la integridad celular por su ruptura; si por otro lado los lipoperóxidos se transforman en aldehídos, estos pueden actuar como agentes entrecruzantes, favoreciendo la agregación entre proteínas y el ácido desoxirribonucleico (ADN) y la formación del pigmento lipofucsina.⁴⁵

Por otro lado, cuando las EROs atacan directamente a las proteínas, pueden causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos e inducir su fragmentación o entrecruzamiento con otras proteínas, carbohidratos e incluso con ADN. Estos daños se traducen en la pérdida de la estabilidad y la función, por lo que se incrementa la susceptibilidad a ser degradadas por enzimas proteolíticas. Por otro lado, si las EROs atacan lípidos de membrana se pueden inactivar receptores o enzimas unidas a dichas membranas, y si la molécula oxidada es el ADN, se inhibe la síntesis de proteínas o se producen proteínas defectuosas con cinética y actividad alterada. A nivel orgánico las consecuencias se observan cuando hay rigidez de tejidos debido a los entrecruzamientos y la respuesta inmune puede verse disminuida por la alteración de la antigenicidad, entre otras.⁴⁶

Así mismo, el ADN no se encuentra exento del daño mediado por EROs a nivel mitocondrial y nuclear. Se ha estimado que las células humanas están expuestas diariamente a 10 000 impactos oxidativos.³⁹

De igual manera se ha estimado que el ADN mitocondrial (ADNm) es más susceptible de ser dañado oxidativamente que el ADN nuclear (ADNn) en una proporción 10 a 20 veces mayor, debido a que en la mitocondria se lleva a cabo el metabolismo aeróbico y el material genético contenido en este organelo se encuentra en contacto constante con las EROs, este hecho es de particular importancia ya que se ha estimado que la mitocondria consume entre el 90 y el 95% del oxígeno celular y que aproximadamente el 2% de este, es convertido a ion superóxido, además el ADNm carece de histonas protectoras y tiene mecanismos de reparación incompletos.^{47,48}

Las principales alteraciones producidas por los RL en el ADN son la oxidación de desoxirribosa, modificación de bases púricas y pirimídicas, formación de sitios abásicos, rupturas de cadena sencilla y doble, entrecruzamientos con proteínas y ADN, e intercambio de cromátidas hermanas.⁴⁹

Cuando la desoxirribosa ha sido oxidada puede liberarse en forma modificada o puede permanecer unida al ADN, con lo cual induce rompimientos de cadena sencilla al separarse del grupo fosfato del nucleótido adyacente; si se forman numerosos rompimientos de cadena sencilla, se pueden producir rompimientos de cadena doble, que provocan daño permanente al material genético.⁵⁰

Por otro lado, cuando las EROs actúan sobre las bases nitrogenadas producen sustituciones, deleciones o inserciones dependiendo del ambiente redox circundante y de la especie oxidante involucrada, estas modificaciones dan origen a mas de 100 productos en células de mamíferos y aunque las cuatro bases pueden sufrir oxidación las mas susceptibles son las pirimidinas y en este sentido, uno de los aductos más estudiados es la 8-hidroxi-guanina y su guanosido la 8-hidroxi-guanosina.⁵¹ Son el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, los encargados de producir la mayor parte de los aductos de ADN.⁵² Al ser modificadas las bases, pueden permanecer las mutaciones en el material genético afectando la transcripción, traducción y replicación del ADN; pero por otro lado, también pueden crearse sitios abásicos si estas bases son removidas del ADN que no son capaces de codificar para la síntesis de proteínas.^{50,53}

Así mismo, cuando el MDA reacciona con el ADN favorece los entrecruzamientos ADN-proteína y ADN-ADN que se forman cuando un radical de ADN se combina con un radical de proteína, con un aminoácido o con una base de otro ADN.^{40,54,55} De estos entrecruzamientos los más tóxicos son los entrecruzamientos ADN-ADN que pueden causar la muerte a células con mecanismos de reparación insuficientes e inducen mutaciones y re arreglos relacionados con el desarrollo de tumores y crecimiento celular descontrolado.⁵⁶

Es la acumulación del daño oxidativo producido en estas biomoléculas el que incrementa el riesgo de desarrollar padecimientos crónicos como diabetes mellitus, enfermedades cardiacas, desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y distintos tipos de cáncer, entre otras. Afortunadamente, antes de que el daño oxidativo sea producido, los organismos poseen un sistema de defensa antioxidante y mecanismos de reparación de biomoléculas cuya

función es disminuir la concentración de EROs hasta niveles fisiológicamente aceptables y reparar las lesiones oxidativas producidas, con la finalidad de mantener la homeostasis redox.⁵⁷

IV.2.3. Sistema de defensa antioxidante (SAox).

Para prevenir la peroxidación lipídica y el daño oxidativo al ADN, el organismo posee un sistema de defensa antioxidante (SAox) que en condiciones fisiológicas, mantiene una concentración baja de EROs y limita el daño oxidativo en las células. Para alcanzar su objetivo, el SAox emplea mecanismos de protección, que comprenden la prevención de la formación de las EROs, la captura de intermediarios reactivos y la inhibición de la propagación de sus reacciones.⁵⁶

Un antioxidante es “cualquier sustancia que, cuando se encuentra presente en bajas concentraciones comparado con un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato”.⁵⁸

A pesar de que existen diversas clasificaciones para los antioxidantes, una de las más utilizadas con fines de investigación en humanos, agrupa a los antioxidantes en función de: la prevención del EOX, limitación o neutralización del EOX y reparación del daño molecular por EOX (Figura IV.4).⁵⁹

Los antioxidantes primarios forman parte del primer nivel de protección contra estas especies oxidantes, su principal función es prevenir la formación de EROs y por lo tanto, prevenir el establecimiento del EOX.⁵⁹ Las enzimas antioxidantes y las proteínas atrapadoras de metales se encuentran dentro estos antioxidantes.

Las enzimas antioxidantes actúan en forma coordinada para contrarrestar el efecto de las EROs. La superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) acelera en unas 40 veces, la dismutación del ión $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y oxígeno. En humanos existen tres formas de SOD: citosólica (CuZnSOD), mitocondrial (MnSOD), y extracelular (EC-SOD).⁶⁰

Por su parte, el peróxido de hidrógeno y los otros hidroperóxidos orgánicos son reducidos hasta agua por la acción independiente de la glutatión peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.19) y la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6).^{61,62}

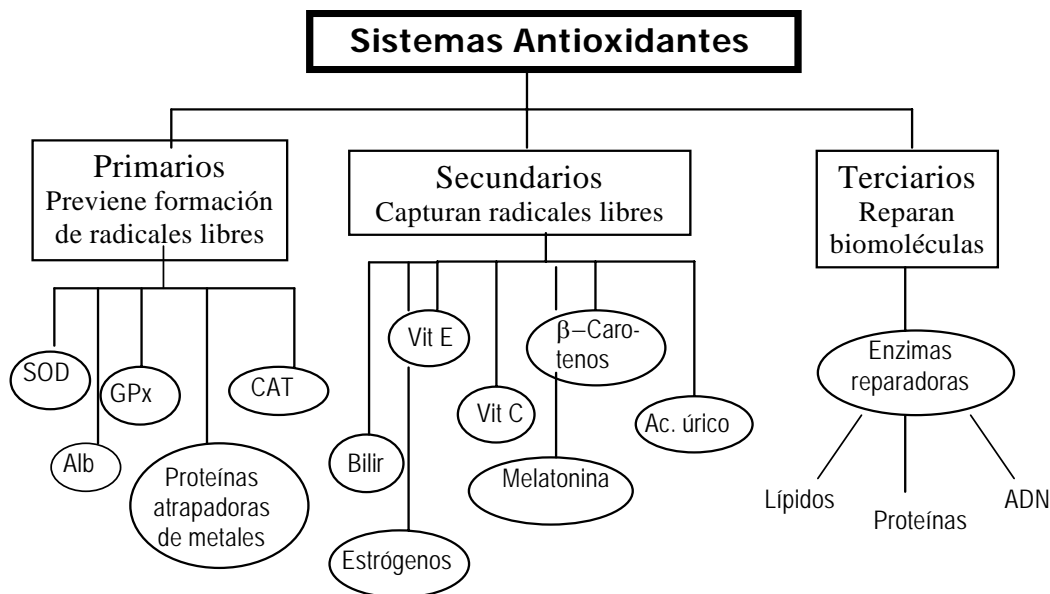


Figura IV.4. Clasificación de los sistemas antioxidantes

La GPx es una selenioproteína que se encuentra en el citoplasma y mitocondrias y emplea glutation (GSH) como sustrato para la reducción de los hidroperóxidos. La CAT se encuentra en el citosol y los peroxisomas y contiene un grupo hemo responsable de su actividad catalítica (Figura IV.5).^{61,62}

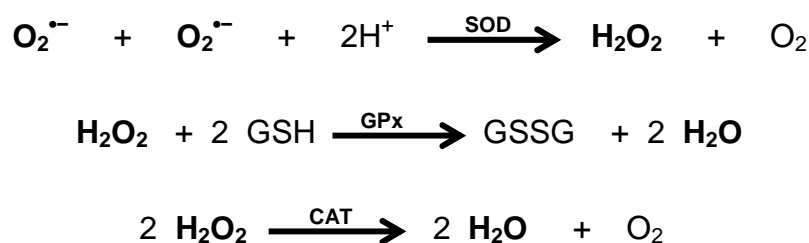


Figura IV.5. Actividad de las enzimas antioxidantes

El balance entre la actividad de estas enzimas es determinante para la resistencia de las células contra el daño oxidativo. Por un lado, si la actividad de SOD está disminuida con respecto a la actividad de GPx y CAT, se favorece la acumulación de ion $\text{O}_2^{\cdot-}$ que es tóxico para las macromoléculas, y por el otro lado, una actividad incrementada de SOD con respecto a la actividad

de GPx y CAT puede favorecer la sobreproducción de H₂O₂, el cual es responsable de la generación de otras EROs.⁶¹⁻⁶³

La lactoferrina, transferrina, ferritina y ceruloplasmina son proteínas atrapadoras de metales cuya función es secuestrar iones metálicos como hierro y cobre, y evitar que se encuentren disponibles para la formación de radicales hidroxilo.⁵⁸

Los antioxidantes secundarios limitan o neutralizan el EOx ya que actúan en compartimientos hidrofóbicos o hidrofílicos eliminando, atrapando y estabilizando a las EROs ya formadas que han escapado de la primer línea de defensa antioxidante, por lo que inhiben la iniciación o propagación de las reacciones en cadena en las que están involucrados limitando su efecto nocivo sobre moléculas blanco. En este grupo se encuentran las vitaminas A, C y E y los componentes plasmáticos como la bilirrubina, el ácido úrico y la albúmina, además de la melatonina y los estrógenos.⁵⁸

La tercera línea de defensa la componen los sistemas de reparación, encargados de reparar las lesiones producidas en las biomoléculas oxidadas, restaurándolas a su conformación nativa. Dentro de este grupo encontramos a las enzimas reparadoras de lípidos (aciltransferasas y fosfolipasas), proteínas (proteinasas, proteasas y peptidasas) y ADN (exo- y endo-nucleasas, glicosilasas, polimerasas y ligasas), que intervienen en la reparación por recombinación homóloga (HR), la unión de terminales no homóloga (NHEJ), reparación por escisión de nucleotidos (NER) y reparación por escisión de bases (BER).^{59,64}

Aunque algunos autores no consideran a las enzimas de reparación como parte del sistema antioxidante debido a la función que desempeñan, si forman parte de los mecanismos de defensa y protección contra el EOx, ya que se ha sugerido que el organismo podría sucumbir rápidamente al dañarse cualquiera de los componentes celulares vitales por daño oxidativo si solo tuviéramos a las enzimas y compuestos antioxidantes como medios de protección.⁶⁵

IV.2.4. Estrés oxidativo

La evidencia acumulada sugiere que las EROs son necesarias en concentraciones bajas, ya que al mantener el estado redox fisiológico, pueden estimular la expresión genética,

transducción de señales, actividad enzimática, y la proliferación celular, actúan como segundos mensajeros e incluso pueden favorecer el establecimiento del balance redox al inducir la respuesta del SAox y enzimas de reparación de macromoléculas, que los encargados de mantener las concentraciones de EROs en niveles tolerables para el organismo y de evitar la acumulación del daño oxidativo en las macromoléculas.^{66,67}

Es solo cuando las defensas antioxidantes y los mecanismos de reparación son insuficientes para limitar el efecto nocivo de las EROs en las células, que se establece el estrés oxidativo (EOx), el cual se ha definido como “un desequilibrio entre las especies oxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros” (Figura IV.6.).^{68,69}

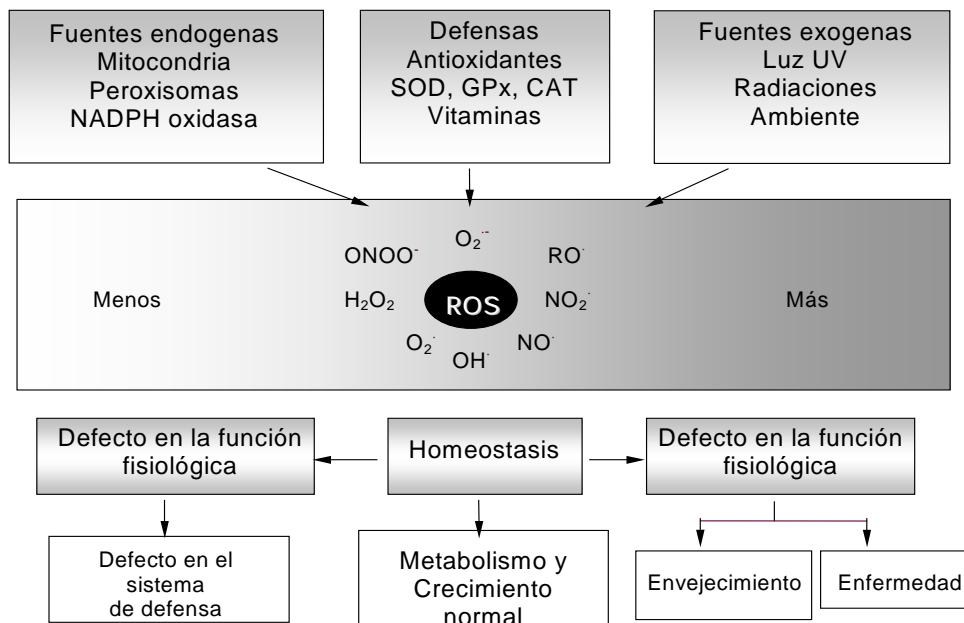


Figura IV.6. Estrés oxidativo, homeostasis y enfermedad (Tomado de Finkel y Holbrook, 2000)

IV.2.5. Biomarcadores de EOx

Hasta ahora, el EOx se ha evaluado mediante el análisis de biomarcadores de daño oxidativo y antioxidantes en diversos tejidos y fluidos biológicos con el fin de determinar su papel en la patogénesis de diversas enfermedades e incluso en el origen del envejecimiento.

Se ha definido como biomarcador a una "característica que puede ser medida y evaluada objetivamente como indicador de un proceso biológico normal, de un proceso patológico o como respuesta farmacológica a una intervención terapéutica" y por lo tanto refleja cambios en los sistemas biológicos que están relacionados a una exposición o al efecto de cualquier tipo de material o estímulo.⁶⁹⁻⁷¹

Una variedad de indicadores se han empleado para determinar el daño mediado por EROs o la generación de RL *in vitro*. Se han detectado incluso directamente algunas EROs pero debido a que estas son altamente reactivas e inestables y poseen un tiempo de vida media muy corto, se ha preferido emplear biomarcadores de daño oxidativo derivados de la interacción de las EROs con las macromoléculas por considerarse más estables.^{71,72}

La peroxidación lipídica genera una variedad de productos relativamente estables, principalmente aldehídos reactivos α,β -insaturados, tal como malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 2-propenal e isoprostanos, los cuales pueden ser cuantificados en suero y en orina como una medida indirecta del EOx.⁶⁹

En este sentido, el MDA es considerado el mejor marcador de peroxidación lipídica y se determina por medio del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) en el que se forman aductos MDA-TBA, llamados TBARS (del inglés thiobarbituric acid reactive substances). A pesar de que mucho se ha especulado de la carencia de especificidad de este método, aun se emplea ampliamente debido a que es muy económico y relativamente fácil de realizar.⁷¹

Los marcadores de la oxidación de proteínas incluyen derivados de proteínas carboniladas, cadenas laterales de aminoácidos oxidados, fragmentos de proteínas y formación de productos de glicosilación avanzada (AGEs, del inglés advanced glycation end products). Los derivados carbonilados son muy lábiles y los AGEs son difíciles de detectar analíticamente, es por eso que se emplean la formación de orto-tirosina (o-Tyr) y ditirosina en RNAsa purificada expuesta a oxidación catalizada por metales para determinar el daño oxidativo *in vitro*, como medida del EOx.⁷¹

Por otro lado, dependiendo de la especie oxidante involucrada, se forman productos específicos derivados de la oxidación del ADN, que sirven para estimar el daño oxidativo. En este sentido, la estimación de los productos derivados de la reparación del ADN en sangre y orina

pueden reflejar el índice total de daño en el cuerpo, mientras que el daño oxidativo determinado en células, como leucocitos, refleja el balance entre el daño y la reparación en el tejido analizado.⁷³

En los últimos años, se ha empleado a la 8-hidroxi-2`desoxiguanosina (8-OHdG u 8-oxodG) como marcador de EOX. Cuando el ADN oxidado es reparado, se forman productos de reparación muy solubles en agua que son excretados por la orina sin sufrir metabolismo adicional en el organismo y no son modificados por los hábitos alimenticios. Estos productos urinarios oxidados incluyen bases libres y desoxinucleosidos, como la 8-OHdG, que puede reflejar no solo la extensión del daño en el organismo, sino también el balance entre el daño oxidativo y la reparación. Su determinación ofrece ventajas como la obtención de muestras por métodos no invasivos, y la existencia de diversas metodologías para su cuantificación entre las que se encuentran la HPLC (del inglés, high-performance liquid chromatography), GC-MS (del inglés, gas chromatography-mass spectrometry) y ELISA.^{73,74}

Un método alternativo para determinar el daño oxidativo al ADN es el denominado “ensayo cometa” que cuando se lleva a cabo a pH 13 se conoce como “electroforesis unicelular alcalina” en el que se pueden detectar rompimientos de cadena doble o sencilla, así como sitios álcali lábiles, entrecruzamientos con proteínas e incluso la reparación del daño inducido por agentes oxidantes, genotóxicos o radiación en células individuales.^{75, 76}

Este método presenta ciertas ventajas: posee una alta sensibilidad en la detección de bajos niveles de daño al ADN, requiere de pequeñas cantidades de células, es un método muy flexible, de bajo costo, relativamente fácil de llevar a cabo y requiere poco tiempo para la obtención de resultados.⁷⁵

Básicamente, las células son embebidas con agarosa en una placa que es lisada en altas concentraciones de sales y detergentes para posteriormente aplicar un campo eléctrico en condiciones alcalinas, que permitirá al ADN dañado desenrollarse desde el núcleo hacia el ánodo para formar la cola de un cometa que indicará la cantidad de daño producido en esa célula.⁷⁷

Aunque algunos autores han mencionado que se puede determinar el daño oxidativo por métodos más sensibles y específicos, el ensayo de ELISA para la cuantificación de 8-OHdG y el ensayo cometa ofrecen la ventaja de que al no requerir preparación previa de las muestras para su análisis, estas no están expuestas a la oxidación que se puede presentar en HPLC y GC-MS,

además del costo relativamente menor y la facilidad para realizar los procedimientos, son de gran utilidad para estudios de grandes poblaciones como es el campo de la epidemiología molecular.^{77,78}

Por otro lado, para la evaluación de la actividad del sistema antioxidante, se encuentran marcadores enzimáticos y no enzimáticos. Por parte de los antioxidantes enzimáticos se evalúa la actividad de SOD, GPx, CAT y en ocasiones la actividad de glutathion reductasa (GR). En este sentido, se ha demostrado que el índice SOD/GPx o SOD/GPX+CAT ofrece una mejor estimación de la actividad conjugada de estas enzimas dentro de la célula, que la determinación de cada una por separado y permiten vincular la actividad enzimática con procesos patológicos o con la resistencia celular al estrés inducido por oxidantes.⁷⁹

La actividad del sistema antioxidante no enzimático o extracelular, se puede evaluar determinando la concentración de cada uno de los antioxidantes, en este sentido, existe un gran cúmulo de estudios *in vitro* y ensayos clínicos realizados para determinar el efecto de la suplementación de vitaminas antioxidantes en el EOX en fumadores/no fumadores, en personas con algún tipo de enfermedad crónica o aguda, cáncer e incluso en el envejecimiento.⁸⁰

Por otro lado, para la evaluación de la eficiencia del sistema antioxidante extracelular se puede determinar la capacidad antioxidante plasmática total (AT) y la capacidad antioxidante residual (GAP antioxidante). La AT considera la acción acumulada de todos los antioxidantes presentes en el plasma y aunque existe una gran variedad de métodos, el utilizado con mayor frecuencia es el que mide la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox. Este método utiliza la supresión del color del catión radical ABTS directamente relacionada con la capacidad antioxidante de la muestra.⁸¹

Por otro lado, la albúmina y el ácido úrico constituyen más del 50% de la actividad antioxidante plasmática total, es por esta razón que se determina la capacidad antioxidante residual o GAP, que refleja la actividad combinada de los antioxidantes plasmáticos diferentes de albúmina y ácido úrico como son la vitamina A, C y E, bilirrubina, transferrina y haptoglobulina.^{81,82}

Hasta ahora, del estudio de estos y otros biomarcadores se ha establecido que el EOX contribuye, al menos teóricamente, al desarrollo de enfermedades crónicas y agudas; y constituye la causa principal que da origen al envejecimiento normal.⁶⁷

Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios realizados, aun en la actualidad en el campo de la Gerontología biológica, no se ha esclarecido si el EOX es causa o consecuencia del envejecimiento. Al respecto, el envejecimiento se ha asociado con una acumulación de daño oxidativo, no obstante no es del todo claro si es la alteración en las concentraciones de EROs, la responsable de afectar la homeostasis del organismo y promover el envejecimiento, o si el EOX es una consecuencia de la homeostasis alterada por otros cambios relacionados con la edad.⁸³

IV.3. Estrés oxidativo y envejecimiento

Se ha sugerido que el daño oxidativo se acumula con el envejecimiento debido al incremento en la formación de EROs, a la disminución de la actividad del sistema antioxidante, disminución en la reparación del daño oxidativo o degradación de macromoléculas oxidadas, a un incremento en la susceptibilidad de los tejidos al daño oxidativo, o a la acción combinada de estas, no obstante existen evidencias que se contraponen a estas afirmaciones.²⁸

Se han encontrado evidencias de la acumulación en el daño oxidativo en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos en distintos tejidos de especies animales y en humanos relacionados con la edad, sugiriendo que este es provocado por un incremento substancial en la formación de radical superóxido y H₂O₂, debido a que al modificarse las condiciones del flujo en la CTE de la mitocondria, es mas fácil para los electrones escapar de esta cadena, favoreciendo la acumulación de mutaciones en el ADNm que a su vez induce la peroxidación lipídica de las membranas y daño en el ADNn dando origen al envejecimiento.^{84,85} No obstante, la información teórica disponible respecto a la acumulación de daño oxidativo sobre las biomoléculas no es concluyente.

Al respecto, existen diversos estudios en los que se ha encontrado que el MDA se incrementa significativamente casi a un ritmo exponencial con la edad, sugiriendo que con el envejecimiento la velocidad de peroxidación aumenta y se presenta un incremento en el número de ácidos grasos poli insaturados en la membrana celular, lo que la hace más susceptible al ataque por parte de las EROs, favoreciendo la acumulación de aldehídos reactivos y el pigmento lipofucsina.⁸⁶⁻⁸⁹

Por otro lado, existen estudios que revelan que el MDA no presenta cambios significativos con respecto a la edad. Al respecto, en un estudio realizado en individuos de 65 años en adelante,

se observó que la peroxidación lipídica determinada a través del MDA, no se modifica con la edad y que la actividad plasmática del glutatión si se incrementa favoreciendo el establecimiento del equilibrio pro-oxidante/antioxidante como un mecanismo de envejecimiento exitoso.⁹⁰

De la misma forma, en diversos estudios se ha encontrado un aumento significativo en la concentración de 8-OHdG en tejidos animales, de hecho esta elevación está acentuada en tejidos como cerebro y corazón que tienen una actividad metabólica mucho mayor, sugiriendo que la capacidad de reparación disminuye al menos en 0.7% por año a lo largo de la vida. Aunado a ello, se ha encontrado un incremento substancial en el daño oxidativo al ADN medido en células individuales a través del ensayo cometa, sugiriendo que éste se incrementa con la edad debido a la pérdida de especificidad o inducibilidad de algunas enzimas que participan en la reparación de las lesiones oxidativas como la endonucleasa AP y la β -polimerasa.⁹¹⁻⁹³

Por otro lado, se ha demostrado que no existen cambios significativos en los niveles basales de daño oxidativo en el ADN con el envejecimiento, y que la capacidad de reparación de individuos mayores de 75 años es comparable con la de individuos jóvenes, sugiriendo que en individuos sanos, prevalece una alta estabilidad genómica que provoca que la actividad de las enzimas que participan en la reparación de las lesiones oxidativas se mantenga o incluso aumente y esto contribuye al incremento de la resistencia al EOx.⁹⁴⁻⁹⁶

Por otro lado, se ha demostrado al evaluar los niveles basales de daño oxidativo al ADN en células de niños, adultos y ancianos, que el daño oxidativo que se observa en las células de los ancianos no muestra diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células de los niños y de los adultos, pero cuando las células de individuos ancianos son sometidas a dosis elevadas de radiación UV o genotóxicos, muestran una mayor susceptibilidad a la formación de rupturas de cadena en el ADN y una menor capacidad de reparación de las lesiones oxidativas favoreciendo la acumulación de daño.^{97,98}

Por otro lado, se ha observado que la acumulación en el daño oxidativo al ADN está relacionado con enfermedades como DM tipo 2, aterosclerosis y enfermedad coronaria entre otras y debido a que el daño oxidativo en el ADN que no es reparado favorece la acumulación de mutaciones que incrementan la inestabilidad genómica y así, aumentan el riesgo para el desarrollo de cáncer y otras enfermedades, por lo que se ha empleado la disminución en la capacidad de reparación como un buen marcador de riesgo de cáncer o de enfermedad coronaria, aunque aun

no es posible determinar si la elevación en el daño oxidativo al ADN es causa etiológica para la enfermedad o si solo es consecuencia de estas.⁹⁹⁻¹⁰²

Aunque son muchas las investigaciones que han desarrollado con el fin de dilucidar la relación entre la actividad de los diferentes componentes del sistema antioxidante y el envejecimiento, los resultados aun son controversiales ya que no se ha encontrado un patrón de cambio claro. Por un lado existen evidencias que indican que la actividad de las enzimas antioxidantes y de los antioxidantes extracelulares disminuye durante el proceso de envejecimiento en diversos tejidos y que esto puede al menos en parte, contribuir al aumento en la susceptibilidad de los tejidos al daño oxidativo.^{89,102-105}

Por otro lado existen estudios que sugieren que la actividad enzimática antioxidante de SOD, GPx y CAT no se modifica con la edad o incluso puede aumentar en respuesta al incremento en la producción de EROs en diversos tejidos, impidiendo que se establezca el EOx.^{94,97,101}

Al respecto, se ha demostrado que la actividad de las enzimas antioxidantes es similar en células de niños, adultos y ancianos en la medición basal, sin embargo, después de ser sometidas a irradiación UV, se genera una acumulación de daño oxidativo en las células de los individuos ancianos, la cual no es debida a la falta de enzimas antioxidantes sino al exceso de EROs presentes después de la irradiación UV.⁹⁷ Se ha observado en distintos órganos que cuando existe un incremento de la actividad enzimática de GPx en paralelo a un aumento en la actividad de SOD relacionada con la edad, se preserva la razón SOD/GPx y los órganos en estudio no muestran un incremento en la susceptibilidad a la peroxidación lipídica durante el envejecimiento, ya que se mantiene un balance antioxidante enzimático y no hay incremento en el daño oxidativo mediado por EROs.¹⁰⁶

En cuanto a la función de los antioxidantes exógenos, en centenarios sanos, un excelente ejemplo de envejecimiento exitoso, se ha encontrado que los niveles de vitamina A y E se encuentran elevados sugiriendo que no solo desempeñan una función antioxidante aumentando la protección del organismo contra el daño oxidativo en el ADN y otras biomoléculas, sino que son factores biológicos que garantizan la eficiencia de otros mecanismos homeostáticos en este grupo de individuos.¹⁰⁵

Por otro lado, existen evidencias que sugieren que una concentración elevada de vitaminas antioxidantes en el plasma solo es indicativo del alto consumo de frutas y verduras, pero no necesariamente garantiza que el daño oxidativo se encuentre disminuido,^{106, 107} ya que algunos autores sugieren que las dosis a las cuales las vitaminas muestran su eficiencia antioxidante *in vitro* son muy altas, e incluso podrían comportarse como pro-oxidantes en el organismo, por otro lado, está el hecho de que algunos de estos antioxidantes actúan juntos eficientemente pero individualmente no presentan efectos benéficos.⁵⁸

La inconsistencia y contradicción en los resultados de las investigaciones que pretenden demostrar alguna relación entre el envejecimiento y el EOX, se debe probablemente a que los estudios se han realizado en diferentes muestras de tejidos y animales, y son limitados los estudios realizados en humanos, a las diferentes técnicas y protocolos empleados para la evaluación de los marcadores y a que en la literatura científica no se ha encontrado una definición operativa de EOX que contemple los biomarcadores implicados en el daño oxidativo y sistema antioxidante de manera integral, por lo que recientemente en la Unidad de Investigación en Gerontología de la FES Zaragoza, UNAM, se propuso un *constructo* práctico y accesible que pretende evaluar al EOX de manera integral incluyendo la evaluación del nivel de daño oxidativo en biomoléculas así como algunos componentes del sistema antioxidante intra y extracelular.^{109,110}

La utilidad de un constructo se fundamenta en que diversas investigaciones han señalado que una disminución de las enzimas antioxidantes o de la capacidad antioxidante plasmática total no siempre indica una condición no deseable si las especies oxidantes se encuentran en concentraciones aceptables, al respecto, es notable resaltar que si las concentraciones de los componentes que forman parte del sistema antioxidante se encuentran disminuidos, no siempre se debe a que la respuesta del sistema antioxidante es insuficiente sino a que puede estar actuando de manera eficiente contra las EROs limitando su concentración para evitar que se altere el equilibrio redox, y por otro lado un nivel disminuido de antioxidantes tampoco puede ser atribuido al solo hecho de que no son necesarios porque no hay EROs que degradar ya que al ser un proceso dinámico, su eficiencia debe evaluarse en función de la cantidad de EROs y el daño en biomoléculas.^{109,111}

Así mismo, se ha encontrado que una actividad antioxidante alta no siempre garantiza un efecto benéfico y limitación sobre el efecto de las especies oxidantes, ya que a pesar de ser el resultado de la adaptación del organismo ante un incremento en la formación de estas, bajo ciertas

circunstancias pueden presentar una efectividad comprometida debida a la especie oxidante involucrada o se pueden comportar como especies pro-oxidantes.¹⁰⁸

IV.4. Factores pro-oxidantes

El EOx es un proceso que puede ser modificado por diversos factores exógenos como: el tabaquismo, la ingesta de bebidas alcohólicas, la exposición a contaminantes ambientales, radiación ultravioleta, estrés psicológico, ejercicio físico, el número de horas de sueño, la dieta e incluso el género. La frecuencia e intensidad en la exposición a estos factores puede provocar respuestas únicas en el organismo determinantes en el proceso de resistencia o vulnerabilidad ante el EOx.

Frecuentemente se ha asociado el tabaquismo con un incremento en el daño al ADN en individuos jóvenes y ancianos, de hecho hay evidencia epidemiológica que relaciona el consumo de tabaco con el desarrollo de cáncer de pulmón; también se ha demostrado que los extractos del cigarro tienen actividad carcinogénica y mutagénica y en diversos estudios que monitorean el daño al ADN causado por exposición ocupacional se han revelado los efectos dañinos del cigarro al observarse un incremento en el daño oxidativo al ADN y disminución en la actividad del sistema antioxidante.¹¹¹⁻¹¹³ Aunado a ello, se ha observado que los individuos que dejan de fumar muestran niveles mas bajos de daño oxidativo al ADN un año después de dejar este hábito.¹¹²

Sin embargo existen estudios que no encuentran diferencias entre fumadores y no fumadores en términos de daño oxidativo al ADN.

Por otro lado, el ejercicio físico se ha asociado con EOx y se considera puede llevar a altos niveles de daño oxidativo en las macromoléculas cuando se realiza con cierta duración e intensidad, en este sentido, se ha demostrado que el ejercicio anaeróbico no produce incremento en el daño oxidativo al ADN mientras que el ejercicio aeróbico extenuante puede provocar un aumento en el daño oxidativo al ADN con su pico mas alto a las 24 horas No obstante se ha sugerido que el ejercicio regular es una excelente medida preventiva contra el EOx ya que puede estimular la respuesta del sistema antioxidante y de las enzimas que participan en la reparación de daño oxidativo.¹¹⁵

A pesar de que el etanol puede presentar actividad como antioxidante también se ha observado que tiene actividad mutagénica, teratogénica y carcinogénica en humanos y que el consumo crónico de alcohol favorece el establecimiento del EOx debido a que promueve la formación de EROs que inician la peroxidación lipídica, incrementan el daño al ADN en linfocitos e interfiere con los mecanismos de protección del organismo y por lo tanto favorece el envejecimiento prematuro.¹¹⁶

Al respecto, también existen estudios en los que se ha observado que en individuos ancianos el daño por alcohol se presenta en forma gradual y por lo tanto no altera la homeostasis de los individuos pero en los individuos expuestos al etanol en forma crónica se altera la homeostasis significativamente aumentando el grado de daño oxidativo en el ADN, lo que sugiere que el consumo de alcohol constituye un factor de riesgo mayor para el daño oxidativo al ADN que la edad.¹¹⁷ Así mismo se ha observado que el consumo leve a moderado de alcohol puede estar asociado con una reducida mortalidad por enfermedad cardiovascular en hombres con hipertensión.¹¹⁸

La desnutrición calórico-proteica, tan frecuente en adultos mayores, favorece el EOx debido a la disminución de la reserva proteica y a la concomitante disminución en el consumo de vitaminas antioxidantes y minerales esenciales para el buen funcionamiento de las enzimas antioxidantes.¹¹⁹ Así mismo, en un estudio en el cual se indujo obesidad en ratas por medio de una dieta rica en calorías, se observó que la concentración plasmática de TBARS se incrementó en un 43 a 52%, la actividad enzimática de SOD disminuyó en un 47.5% y la capacidad antioxidante plasmática total disminuyó en comparación con un grupo control por lo que se ha concluido que la obesidad induce EOx que a su vez contribuye al desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, DM e hipertensión arterial.¹²⁰

Por otro lado, se ha observado que las dietas vegetarianas pueden disminuir ligeramente el daño oxidativo en el ADN pero otros marcadores de estabilidad genética no se ven afectados y por medio de estudios en modelos animales se ha observado que la restricción calórica es un régimen que puede retrasar el envejecimiento e incluso aumentar la esperanza de vida ya que disminuye la producción de EROs, aumenta la capacidad de reparación de las biomoléculas y preserva la actividad del SAox.¹²¹

Dentro de los contaminantes ambientales son la materia particulada menor de 10 micras (PM10) y la menor de 2.5 micras (PM2.5) las que se encuentran asociadas con enfermedades de pulmón incluyendo el cáncer, pero de estas, se ha demostrado que la fracción fina conformada por las PM2.5, puede acumularse en regiones más bajas del tracto respiratorio que las PM10 e inducen una mayor producción de MDA debido a que contienen una mayor proporción de metales pesados capaces de favorecer la producción de EROs.¹²²

El sueño, es un estado fisiológico en el que se incrementan los niveles séricos de antioxidantes con la finalidad de detoxificar al organismo del exceso de EROs generados durante el estado de vigilia. Sin embargo, la privación del sueño se ha asociado con la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes.

El género puede tener efecto sobre algunos marcadores de EOx, por ejemplo, se ha observado que la actividad de GPx es mayor en mujeres que en hombres, sin embargo existen otros estudios que no han encontrado diferencias con respecto al género.¹¹³ Así mismo, en un estudio realizado en nuestro país se encontró que individuos ancianos hombres presentan 64% de daño al ADN en comparación con el 38% en las mujeres.¹¹¹

El proceso de envejecimiento ha evolucionado como un mecanismo de supervivencia por medio de la adaptación fisiológica del organismo ante las condiciones ambientales estresantes y siempre cambiantes, y se ha sugerido que los hábitos que forman parte del estilo de vida juegan un papel importantísimo en esta adaptación en ciertas circunstancias; al respecto el proceso de *hórmesis* pretende explicar este fenómeno en el que dosis leves o moderadas de algún inductor de estrés son capaces de estimular una respuesta benéfica del organismo, mientras que altas dosis del agente estresor provocan respuestas inhibitoras o dañinas.¹²³

Se cree que la respuesta adaptativa del organismo ante el estrés moderado puede inducir la habilidad del organismo para maximizar la eficiencia metabólica y vivir con un nuevo ambiente desafiante y así contribuir con el envejecimiento exitoso, sin embargo aun existe controversia en este rubro.¹²³

Por todo lo anteriormente expuesto, considerando las inconsistencias científicas respecto a la influencia del envejecimiento sobre la eficiencia del sistema antioxidante y el daño oxidativo, y del papel que tienen los hábitos que forman parte del estilo de vida en el EOx, surge la necesidad

de realizar el presente estudio, con la finalidad de contribuir en el campo de la Gerontología biológica al esclarecimiento de algunos de los procesos vinculados con el envejecimiento exitoso y brindar fundamento teórico para la implementación de programas preventivos y tratamientos terapéuticos que favorezcan el establecimiento de un estado saludable en los ancianos.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se ha sugerido que las EROs tienen gran importancia biológica debido a que funcionan como moduladores de la respuesta celular en diferentes organismos; no obstante, también pueden estar vinculadas con el daño oxidativo de diferentes biomoléculas si se incrementan sustancialmente debido a un ineficiente sistema antioxidante o a inadecuados mecanismos de reparación, dando lugar al EOx.

Originalmente, en 1956 se propuso que el EOx, principalmente la acumulación de daño oxidativo en biomoléculas como el ADN y la disminución de la actividad del sistema antioxidante, eran los principales factores que daban origen al envejecimiento; sin embargo, debido a que este es un proceso multifactorial, aun en la actualidad no se ha esclarecido si el EOx es causa o consecuencia de dicho proceso.

Siguiendo la propuesta original, diversos grupos de investigación han sugerido que el EOx da origen al envejecimiento al disminuir la reserva homeostática del organismo y favorece el envejecimiento con fragilidad al incrementar la vulnerabilidad para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas.

No obstante, también se ha demostrado que el EOx no es una alteración constante en todos los ancianos y sugieren que el desarrollo de mecanismos de resistencia celular al EOx o adaptación pueden estar vinculados con el envejecimiento exitoso y una mayor longevidad, de ahí la importancia de evaluar los marcadores biológicos del EOx durante este proceso biológico.

Por otro lado, el abordaje de la relación entre el envejecimiento y el EOx se ha realizado de manera parcial, ya que se han evaluado aisladamente los distintos marcadores del EOx con la edad, sin considerar que este es un equilibrio dinámico en el que los factores ambientales y algunos hábitos de los que conforman el estilo de vida pueden tener influencia significativa, por lo que es necesario integrar los aspectos biológicos, bioquímicos y conductuales, en una forma más holística.

Por tal motivo, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuál es la influencia del envejecimiento sobre el estrés oxidativo en una población de individuos sanos de la ciudad de México?
- ¿Cuál es la influencia del envejecimiento sobre el daño oxidativo y la capacidad de reparación del ADN en una población de individuos sanos de la ciudad de México?
- ¿Cuál es la influencia del envejecimiento sobre la eficiencia del sistema antioxidante en una población de individuos sanos de la ciudad de México?
- ¿Existe relación entre la eficiencia del sistema antioxidante con el daño al ADN y la capacidad de reparación en diferentes grupos de edad y género de una población de sujetos sanos de la ciudad de México?

VI. HIPÓTESIS

- Considerando que el envejecimiento es un proceso fisiológico gradual y adaptativo, suponemos que los adultos sanos de 25 a 85 años de edad no presentarán diferencias estadísticamente significativas en:
 - a) Los parámetros y grados de EOx conforme avanza la edad.
 - b) El daño y capacidad de reparación del ADN conforme avanza la edad.
 - c) La actividad de los componentes enzimáticos y exógenos que forman parte del SAox conforme avanza la edad.

- Tomando en cuenta que el sistema antioxidante es fundamental para evitar el EOx durante el envejecimiento saludable suponemos que la eficiencia del sistema antioxidante estará asociada a menor daño oxidativo y a mayor capacidad de reparación del ADN, independientemente de la edad y género.

VII. OBJETIVOS

General:

Determinar la influencia del envejecimiento sobre la eficiencia del sistema antioxidante, daño oxidativo y capacidad de reparación del ADN en sujetos sanos de la ciudad de México.

Específicos:

- Determinar la influencia del envejecimiento sobre el EOx conforme avanza la edad en una población de adultos sanos de 25 a 85 años de edad de la ciudad de México.
- Evaluar el daño y capacidad de reparación del ADN con relación al envejecimiento en una población de adultos sanos residentes en la ciudad de México.
- Evaluar la actividad de algunos marcadores de la eficiencia del sistema de defensa antioxidante con relación al envejecimiento en una población de adultos sanos residentes en la ciudad de México.
- Determinar la influencia de la eficiencia del sistema antioxidante sobre el daño oxidativo y capacidad de reparación del ADN conforme avanza la edad en una población de sujetos sanos de 25 a 85 años de edad de la ciudad de México.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

VIII.1. Diseño de la investigación y población de estudio

Se llevó a cabo un estudio de tipo observacional, prolectivo, transversal y comparativo en una población de 162 sujetos mayores de 25 años con residencia en la ciudad de México, con un promedio de estancia de 21 ± 14 años. Se conformaron 3 grupos de estudio de acuerdo al enfoque del ciclo vital humano: i) 73 sujetos de 25 a 44 años, ii) 68 sujetos de 45 a 64 años y iii) 21 sujetos de 65 años y más.

VIII.1.1. Criterios de inclusión.

- Individuos que acepten participar en el estudio
- Clínicamente sanos, sin padecimientos crónico-degenerativos o agudos.
- Con residencia en el área urbana al menos durante los últimos 5 años.
- Sin ingesta de suplementos antioxidantes por indicación médica y/o automedicación en los últimos 6 meses.
- Sin el hábito de alcoholismo: el hábito debe estar ausente en los últimos 2 años o beber menos de 5 copas por semana.
- Sin el hábito de tabaquismo: el hábito debe estar ausente en los últimos 2 años o consumir menos de 5 cigarros a la semana.
- Realizan actividad física periódica: al menos 20 minutos de ejercicio aeróbico por lo menos 3 veces por semana.
- Duermen mas de 6 horas
- No padecen obesidad: Su índice de masa corporal (IMC) está por debajo de 30 Kg/m^2 .

VIII.1.2. Criterios de exclusión.

- Sujetos que no deseen participar en la investigación.
- Sujetos que presenten cualquier tipo de enfermedades físicas y mentales.
- Sujetos con exposición a factores pro-oxidantes: tabaco, alcohol, sedentarismo u obesidad.

VIII.1.3. Consideraciones éticas.

Los individuos que aceptaron participar en este estudio firmaron una carta de consentimiento informado (anexo XIV.1).

VIII.2. Variables

VIII.2.1. Clasificación de variables

➤ *Dependientes:*

1. Estrés oxidativo

- *Daño oxidativo al ADN y lipoperoxidación plasmática*
- *Eficiencia del sistema antioxidante*

2. Capacidad de reparación del ADN

➤ *Independientes:* Edad y Género

VIII.2.2. Operacionalización de variables

➤ *Dependiente:* Estrés oxidativo

Definición conceptual: Desequilibrio bioquímico producido por el efecto de las especies reactivas oxidantes y la actividad del sistema antioxidante.

Definición operacional: Se evaluó el estrés oxidativo a través de la determinación de siete marcadores biológicos:

- ✓ El efecto de las EROs sobre biomoléculas celulares se determinó a través de las concentraciones plasmáticas de lipoperóxidos (LPO) y el daño al ADN en linfocitos de sangre periférica.

- ✓ La eficiencia del sistema antioxidante se determinó a través de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en eritrocitos, cálculo de la razón SOD/GPx, capacidad antioxidante plasmática total (AT) y cálculo de la capacidad antioxidante residual (GAP).

Niveles de medición: Para todos los parámetros se consideraron 2 niveles de medición:

VARIABLE	DEFINICIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	CATEGORÍAS
Efecto de las especies oxidantes			
Concentración plasmática de lipoperóxidos	Concentración de lipoperóxidos plasmáticos medido a través de TBARS	Cuantitativa continua	umol/L
		Cualitativa nominal	Valores normales: [< 0.320 umol/L] Valores altos: [≥ 0.320 umol/L]
Daño oxidativo al ADN (Figura VIII.3.1.)	Ruptura de cadena de ADN sencilla o doble en linfocitos de sangre periférica medido a través de ensayo cometa	Cuantitativa continua	Micrómetros
		Cualitativa nominal	Sin daño: [< 40 % de migración] Con daño: [≥ 40 % de migración]
		Cualitativa ordinal	Sin daño: [< 5 % de migración] Daño leve: [$5 - 19$ % de migración] Daño moderado: [$20 - 39$ % de migración] Daño severo: [$40 - 94$ % de migración] Daño total: [≥ 95 % de migración]
Actividad del sistema antioxidante			
Superóxido dismutasa (SOD)	Actividad enzimática en eritrocitos.	Cuantitativa continua	U/g de hemoglobina
		Cualitativa nominal	Valores normales: [> 1.20 U/g Hb] Valores bajos: [≤ 1.20 U/g Hb]
Glutatión peroxidasa (GPx)	Actividad enzimática en eritrocitos.	Cuantitativa continua	U/g de hemoglobina
		Cualitativa nominal	Valores normales: [> 50.1 U/g Hb] Valores bajos: [≤ 50.1 U/g Hb]
Razón SOD/GPx	Cociente de la actividad de SOD y GPx	Cuantitativa continua	Valores obtenidos de la operación
		Cualitativa nominal	Valores normales: [< 0.023] Valores altos: [≥ 0.023]
Capacidad antioxidante plasmática total (AT)	Actividad total de los antioxidantes plasmáticos	Cuantitativa continua	umol/L
		Cualitativa nominal	Valores normales: [> 900 umol/L] Valores altos: [≤ 900 umol/L]
Capacidad antioxidante residual (GAP)	Actividad de todos los antioxidantes no medidos	Cuantitativa continua	umol/L
		Cualitativa nominal	Valores normales: [> 190 umol/L] Valores altos: [≤ 190 umol/L]

➤ *Dependiente: Capacidad de reparación de ADN*

Definición conceptual: Capacidad para reparar el ADN dañado oxidativamente en diversos tejidos.

Definición operacional: Concentración de 8-OHdG en orina medido a través de un ensayo de ELISA competitivo

Niveles de medición:

VARIABLE	DEFINICIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	CATEGORÍAS
Capacidad de reparación del ADN	Concentración de 8-OHdG en orina medido a través de un ensayo de ELISA competitivo	Cuantitativa continua	ng/mg de creatinina
		Cualitativa nominal	Valores normales: [>0.496 ng/mg de creatinina] Valores bajos: [≤ 0.496 ng/mg de creatinina]

➤ *Independientes: Edad y género*

VARIABLE	DEFINICIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	CATEGORÍAS
Edad	Tiempo cronológico transcurrido desde el nacimiento hasta la captación del individuo en estudio.	Cuantitativa discreta	Años cumplidos
		Cualitativa nominal	25 a 44 años, 45 a 64 años, 65 años en adelante.
Sexo	Características fenotípicas que distinguen al individuo de estudio.	Cualitativa nominal	Masculino, femenino

VIII.3. Procedimientos y técnicas

VIII.3.1. Colección de muestras sanguíneas

Previo consentimiento informado, las muestras sanguíneas de todos los individuos se obtuvieron por venopunción entre las 8:00 y 9:00 am posterior a un ayuno mínimo de 8 horas en tubos al vacío (Vacutainer, Beckton-Dickinson) sin anticoagulante para la determinación de las pruebas bioquímicas y en tubos con heparina sódica para la determinación de los parámetros hematológicos y los marcadores biológicos de estrés oxidativo.

VIII.3.2. Determinación de los parámetros bioquímicos y hematológicos

El tubo sin anticoagulante se centrifugó a 3000 rpm durante 7 minutos para obtener el suero, con el cual se determinó la concentración de glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, albúmina, colesterol, triglicéridos y HDL-colesterol por métodos manuales empleando estuches comerciales de Randox Laboratories, Ltd. Las mediciones se realizaron en un autoanalizador Eclipse (Merck Co, México), de acuerdo a los siguientes métodos:

- Glucosa: En este método la glucosa se determina colorimetricamente después de una oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Glucosa GL2614.
- Urea: Se empleó el método ureasa-Berthelot modificado. En el método, los iones amonio, formados a partir de la urea por acción de la ureasa, reaccionan con el salicilato y el hipoclorito del reactivo para formar un complejo verde (2,2-dicarboxilindofenol) que se lee a 600 nm. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Urea UR107.
- Creatinina: Se empleó el método colorimétrico que se basa en la reacción de la creatinina en solución alcalina con ácido pícrico para formar un complejo coloreado que se lee a 510 nm. La cantidad del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de creatinina. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Creatinina CR510.

-
-
- **Acido úrico:** Se empleó un método enzimático colorimétrico en el que el ácido úrico se convierte en alantoína y peróxido de hidrógeno por acción de la uricasa. El peróxido de hidrógeno formado oxida el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfónico y la 4-aminofenazona en una reacción catalizada por peroxidasa, para dar un compuesto de quinoneimina rojo-violeta, cuya absorción se lee a 520 nm. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Acido úrico UA230.

 - **Albúmina:** Se empleó el método de verde de bromocresol en el que la albúmina del suero se une cuantitativamente con el indicador 5,5-dibromo-o-cresol sulfoftaleina (verde de bromocresol BCP). El complejo albúmina-BCP presenta una absorción máxima a 600 nm. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Albúmina AB388A.

 - **Colesterol:** Se empleó un método enzimático de punto final en el que el colesterol se determina después de la hidrólisis enzimática y oxidación. El indicador quinoneimina se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Colesterol CH200.

 - **Triglicéridos:** Se empleó el método GPO-PAP en el que los triglicéridos se determinan después de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoneimina formada a partir de peróxido de hidrógeno, 4-amino-fenazona y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Triglicéridos TR210.

 - **HDL-colesterol:** Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), muy baja densidad (VLDL) y las fracciones de quilomicrones se precipitan cuantitativamente al añadir ácido fosfotúngstico en presencia de Mg^{+2} . La fracción de HDL se determina posteriormente por el método enzimático de punto final utilizado para colesterol total. Se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche HDL-colesterol CH204.

Se tomó una alícuota de las muestras sanguíneas colectadas en el tubo con heparina, para la determinación de los parámetros hematológicos. La hemoglobina se midió en forma manual por la reacción de cianometahemoglobina. Se determinó el hematocrito por el micrométodo y el conteo de leucocitos y eritrocitos se realizó en una cámara de Newbauer.

Se emplearon los valores de referencia obtenidos previamente por el laboratorio de investigación en Gerontología de la FES Zaragoza, UNAM.¹²⁴

VIII.3.3 Determinación de los marcadores biológicos de estrés oxidativo

VIII.3.3.1. Lipoperoxidación plasmática por TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)

➤ Principio del análisis:

Considerado un buen marcador de lipoperoxidación por ser uno de los productos finales de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en esta técnica se mide el malondialdehído (MDA) acoplado a ácido tiobarbitúrico (TBA): Una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de TBA formando aductos de color rosa conocidos como TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) que tienen un máximo de absorción a 532-535 nm. Durante la reacción se incrementan los TBARS por auto-oxidación por lo que es importante agregar butiril-hidroxitolueno (BHT) para reducir la formación de lipoperoxidos *in vitro*.

➤ Procedimiento:

La técnica se realizó acorde a Jentzsch (1996).¹²⁵

✓ Se preparó una curva de calibración de MDA por hidrólisis de terametoxipropano (TMP), a partir de una solución 0.2 mM de TMP como sigue:

Tubo	MDA umol/L	Solución TMP uL	H ₂ O uL
Blanco	0	0	400
1	0.2	10	390
2	0.4	20	380
3	0.8	40	360
4	1.2	60	340
5	2.0	100	300
6	2.8	140	260
7	4.0	200	200

-
-
- ✓ Para este procedimiento, el tubo de sangre heparinizada se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para obtener una alícuota de 400 uL de plasma la cual es colocada en un tubo de reacción y se adicionaron 50 uL de butiril-hidroxitolueno (BHT, 12.6 mmol/L).
 - ✓ Los tubos de la curva de calibración y con muestra fueron tratados de la manera siguiente: Se adicionaron 400 uL de ácido orto-fosfórico (0.2 mol/L); se mezcló durante 10 segundos en vortex y posteriormente se adicionaron 50 uL de TBA (0.11 mol/L en NaOH 0.1mol/L).
 - ✓ Después de agitación vigorosa en vortex, la mezcla de reacción se incubó a 90 °C por 45 minutos en un baño metabólico. Al concluir el tiempo, los tubos se colocaron en un baño de hielo para detener la reacción. Las TBARS se obtuvieron después de adicionar 1.2 mL de n-butanol en el tubo de reacción y centrifugar 2 minutos a 5000 rpm para obtener la fase alcohólica que se lee a 535 y 572 nm.
 - ✓ El MDA en equivalentes TBARS se calculó empleando una curva de calibración de MDA a partir de una solución 0.2 mmol/L de terametoxipropano (TMP). Se considera que los valores de lipoperóxidos (LPO) son normales cuando están por debajo de 0.320 umol/L y elevados cuando son ≥ 0.320 umol/L.

VIII.3.3.2. Daño oxidativo al ADN por electroforesis unicelular alcalina.

➤ Principio del análisis:

Las células son embebidas en microplacas con gel de agarosa, son lisadas con soluciones de detergentes y sales en concentraciones elevadas con el fin de liberar el ADN y exponer las rupturas de cadena sencilla, rupturas de doble hebra y sitios álcali lábiles; posteriormente, la electroforesis por un periodo corto de tiempo en condiciones alcalinas (pH > 13) hace que el ADN dañado migre desde el núcleo hacia el ánodo. Las células con daño muestran un incremento en la migración de ADN desde el núcleo hacia el ánodo que es observado en un microscopio de fluorescencia posterior a una tinción con bromuro de etidio.

➤ Procedimiento:

La técnica se realizó acorde a Singh y cols. (1991).¹²⁶

-
-
- ✓ Preparación de las microplacas: Una alícuota de 10 uL de sangre heparinizada se mezcló con 75 uL de agarosa de bajo punto de fusión (al 0.5 % en PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2}); 75 uL de esta mezcla se colocaron en un portaobjetos esmerilado que contenía una capa de 120 uL de agarosa regular (al 75 % en PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2}) solidificada previamente a 4 °C e inmediatamente se cubrió con un cubreobjetos. Se dejó solidificar la preparación a 4 °C y se retiró el cubreobjetos de cada microplaca. Posteriormente se adicionaron 75 uL de agarosa de bajo punto de fusión y se dejó solidificar a 4 °C cubriendo nuevamente con un cubreobjetos.
 - ✓ Lisis: Al retirar nuevamente el cubreobjetos de cada microplaca, estas fueron sumergidas en una solución de lisis preparada al momento de usarse (1 % de laurilsarcosinato de sodio, 2.5 M NaCl, 10 mmol/L Na_2 EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl pH 10, 1 % tritón y 10 % DMSO), esta solución debía permanecer a 4 °C y las placas se colocaron en ella por lo menos 1 hora protegidas de la luz, para evitar posterior daño al ADN.
 - ✓ Desenrollamiento y electroforesis: Después de la lisis las microplacas se colocaron en una cámara de electroforesis que contenía una solución amortiguadora pH 13 (1 mmol/L Na_2 EDTA, 300 mmol/L NaOH) permitiendo que se desenrollara el ADN dañado por 20 minutos, posteriormente se efectuó la electroforesis por 20 minutos mas a 25 V y 300 mA. Se tuvo cuidado de mantener las microplacas en la oscuridad en todo momento.
 - ✓ Neutralización y fijación: Concluido el tiempo, las microplacas se lavaron en una solución amortiguadora de neutralización (0.4 mol/L Tris-HCl, pH 7.5) 3 veces por 5 minutos. Se eliminó el exceso de neutralizador y las microplacas se sumergieron en metanol al 70% por 5 minutos.
 - ✓ Tinción y observación al microscopio: Una vez desecadas, las microplacas se tiñeron con 75 uL de bromuro de etidio (20 ug/mL) se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron al microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm utilizando el aumento 400 X. Finalmente, con un ocular graduado se determinó la migración del ADN en um en 100 células por microplaca, para ello se consideró el largo total (largo de la cabeza del núcleo + largo de la estela del cometa).
 - ✓ Como criterio de evaluación, se dividió el daño en 5 categorías dependiendo de la migración de ADN en la cola formada de acuerdo a los criterios de Anderson (1994) (figura VIII.3.1.):¹²⁷

- Sin daño: < 5 % de migración.
- Daño leve: 5 – 20 % de migración
- Daño moderado: 21 – 40 % de migración
- Daño severo: 41 – 95 % de migración
- Daño total: > 95 % de migración

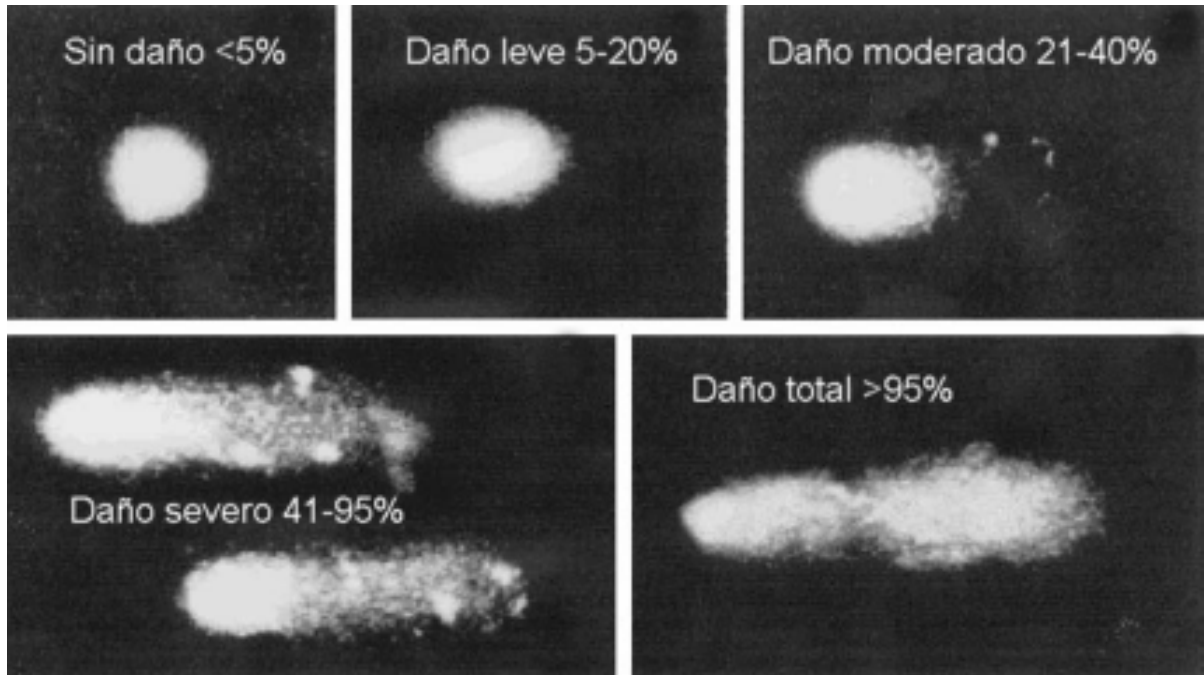


Figura VIII.3.1. Clasificación de D. Anderson (1994), para el daño al ADN a través de la técnica de ensayo cometa. Tomado de Weidner (2004).

- ✓ Se consideró que una célula tiene daño cuando este es $\geq 40\%$, y cuando se presentan ≥ 6 células con migración mayor al 40 %.

VIII.3.3.3. Superóxido dismutasa (SOD)

➤ Principio del análisis:

En este método se emplea xantina y xantin oxidasa (XO) para formar radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (INT) para formar un colorante de formazán rojo. Se mide la actividad de la enzima por el grado de inhibición de esta reacción que se lee a 505 nm.

➤ Procedimiento:

Se empleó el estuche comercial RANSOD superóxido dismutasa de Randox Laboratories, Ltd. En esta prueba se empleó una muestra de sangre heparinizada.

- ✓ Lavado de eritrocitos: Se colocaron 500 uL de sangre total heparinizada en un tubo de reacción y se adicionaron 3 mL de NaCl al 0.9 %, posteriormente el tubo fue centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 2 veces más.
- ✓ Preparación de la muestra: Se completó el paquete eritrocitario lavado con 2 mL de agua destilada fría, se mezcló y dejó reposar durante 15 minutos a 4 °C. Del lisado de eritrocitos se tomaron 100 uL y se diluyeron con 1.9 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 mmol/L pH 7.0. Con la muestra así diluida se prosiguió a realizar el ensayo.
- ✓ Se preparó una curva estándar a partir de una solución de xantina (0.05 mmol/L) e INT (0.025 mmol/L). pH 10.2, con amortiguador de fosfatos como sigue:

	Volumen de solución estándar	Volumen de amortiguador
S6	Estándar sin diluir	---
S5	5 mL de S6	5 mL
S4	5 mL de S5	5 mL
S3	5 mL de S4	5 mL
S2	5 mL de S3	5 mL
S1	---	5 mL

- ✓ Se colocó en otro tubo de reacción cada una de las muestra y los estándares (S1 a S6) y se prosiguió de la siguiente manera:

	S1	S2 a S6	Muestra diluida
S1 (muestra diluyente)	50 uL	---	---
S2 a S6	---	50 uL	---
Muestra diluida	---	---	50 uL
Sustrato mixto (xantina 0.05 mmol/L, INT 0.025 mmol/L)	1.7 mL	1.7 mL	1.7 mL
Mezclar bien			
Xantina oxidasa (80 U/L)	250 uL	250 uL	250 uL
Mezclar y leer la absorbancia A_1 al cabo de 30 segundos y empezar a cronometrar el tiempo simultáneamente. Leer la absorbancia A_2 al cabo de 3 minutos de comenzada la reacción. Las lecturas se realizan a 505 nm.			

-
-
- ✓ Cálculos: El índice de la muestra diluyente (S1) es equivalente al índice de la reacción sin inhibir (100%).

Se obtuvo el promedio de la diferencia de absorbancias (ΔA):

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A$$

Se obtuvo el porcentaje de inhibición de la reacción de las muestras y los estándares:

$$100 - \frac{\Delta A_{\text{muestra/min}} \times 100}{\Delta A_{S1/min}} = \% \text{ inhibición}$$

Se realizó una gráfica con los porcentajes de inhibición de los puntos de la curva estándar vs. el logaritmo (Log 10) de la concentración del estándar en unidades SOD/mL. Se utilizó el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades SOD de la curva estándar:

$$\text{SOD (U/mL de sangre entera)} = \text{SOD (U/mL) de la curva} \times 100$$

Posteriormente se realizó la conversión de U/mL a U/g de Hb.

- ✓ Se consideraron valores normales de SOD cuantos estos son > 1.20 U/g de Hb, y se consideraron como valores alterados bajos cuando estos eran ≤ 1.20 U/g de Hb.

VIII.3.3.4. Glutación peroxidasa (GPx).

- Principio del análisis:

La glutación peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación del glutati6n (GSH) por el hidroper6xido de cumeno. El glutati6n oxidado (GSSG) en presencia de glutati6n reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidaci6n concomitante de NADPH en NADP^+ . Se mide la disminuci6n de la absorbancia a 340 nm.

- Procedimiento:

Se emple6 el estuche comercial RANSEL glutati6n peroxidasa de Randox Laboratories, Ltd. En esta prueba se emple6 una muestra de sangre heparinizada.

- ✓ Preparaci6n de la muestra: Se colocaron 50 μL de sangre entera heparinizada en un tubo de reacci6n en el que se adicion6 1 mL de soluci6n de diluyente (reconstituido previamente con

200 mL de agua bidestilada); se incubó durante 5 minutos y se añadió 1 mL de reactivo de Drabkin a doble concentración, se homogenizó y el análisis de las muestras se realizó en los 20 minutos posteriores a la adición del reactivo de Drabkin.

- ✓ El procedimiento para el blanco y las muestras fue el siguiente:

	Reactivo blanco	Muestra diluida
Agua destilada	20 uL	---
Muestra diluida	---	20 uL
Reactivo (Glutación 4 mmol/L, GR ≥ 0.5 U/L, NADPH 0.34 mmol/L)	1.0 mL	1.0 mL
Mezclar bien		
Hidroperóxido de cumeno (0.18 mmol/L)	40 uL	40 uL
Mezclar y leer la absorbancia inicial de la muestra y del reactivo blanco al cabo de 1 minuto y empezar a cronometrar el tiempo simultáneamente. Leer nuevamente al cabo de 1 y 2 minutos de comenzada la reacción. Las lecturas se realizan a 340 nm.		

- ✓ Cálculos: Se obtuvo la diferencia de las absorciones del reactivo blanco y de las muestras. Se restó el valor obtenido para el blanco del de la muestra (ΔA).

$$GPx \text{ (U/L de hemolisado)} = 8412 \times \Delta A \times 41$$

- ✓ Posteriormente se realizó la conversión a U/g de HB. Se consideró como valores normales a aquellos > 50.1 U/g de Hb y como valores alterados bajos a aquellos ≤ 50.1 U/g de Hb.

VIII.3.3.5. Cálculo de la razón SOD/GPx.

- Fundamento del cálculo:

Las células necesitan mantener un adecuado balance entre la actividad de SOD y GPx ya que pequeñas alteraciones en este balance pueden tener efectos dramáticos en la función celular. Se ha considerado que el cálculo de la razón SOD/GPx ofrece un mejor estimador del equilibrio entre las dos enzimas antioxidantes que el valor de la actividad de cada una de ellas por separado.

- Cálculo:

- ✓ Razón SOD/GPx = cociente entre los valores de la actividad enzimática de SOD y GPx en U/L.

- ✓ Se consideraron como valores normales a todos aquellos < 0.023 , y se consideraron como valores altos a aquellos ≥ 0.023 .

VIII.3.3.6. Capacidad antioxidante plasmática total (AT).

➤ Principio del análisis:

El ABTS[®] (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato]) se incuba con peroxidasa (metamioglobina) y H₂O₂ para formar el radical catión ABTS^{®+•}. Este radical presenta una coloración verde azulada relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo la supresión, proporcional a la concentración de antioxidantes.

➤ Procedimiento:

Se empleó el estuche comercial ESTADO DE LOS ANTIOXIDANTES TOTALES de Randox Laboratories, Ltd.

Para este procedimiento, el tubo de sangre heparinizada se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para obtener una alícuota de plasma.

- ✓ El procedimiento para la muestra problema, el blanco y el estándar fue el siguiente:

	Reactivo blanco	Estandar	Muestra
Agua bidestilada	20 uL	---	---
Estándar	---	20 uL	---
Muestra	---	---	20 uL
Cromógeno (Metamioglobina 6.1 umol/L, ABTS [®] 610 umol/L)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Mezclar bien y leer la absorbancia inicial A ₁ Añadir:			
Sustrato (Peróxido de hidrógeno 250 umol/L)	200 uL	200 uL	200 uL
Mezclar y empezar a cronometrar el tiempo simultáneamente. Leer la absorbancia A ₂ al cabo de 3 minutos de comenzada la reacción. Las lecturas se realizan a 600 nm.			

-
-
- ✓ Cálculos: Se obtuvo el ΔA de la muestra, el estándar y el blanco.

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

Se obtuvo el factor:

$$\text{Factor} = \frac{\text{conc. del estándar}}{(\Delta A_{\text{blanco}} - \Delta A_{\text{estándar}})}$$
$$\text{Antioxidantes totales (mmol/L)} = \text{Factor} \times (\Delta A_{\text{blanco}} - \Delta A_{\text{muestra}})$$

- ✓ Se consideraron como valores normales a todos aquellos $> 900 \text{ umol/L}$, y se consideraron como valores bajos a aquellos $\leq 900 \text{ umol/L}$.

VIII.3.3.7. Calculo de la capacidad antioxidante residual (GAP).

- Fundamento del cálculo:

Los principales antioxidantes del plasma humano (por masa y actividad) son la albúmina y el ácido úrico, los cuales conforman más de 50 % de la actividad antioxidante total de la mayoría de las muestras. La actividad residual puede ser referida como "GAP antioxidante" y refleja la actividad combinada de los antioxidantes plasmáticos diferentes de albúmina y ácido úrico, por ejemplo: ácido ascórbico, α -tocoferol, bilirrubina, transferrina, haptoglobulina, β -caroteno, y otras sustancias.

- Cálculo:

- ✓ El GAP se calculó a partir de AT en umol/L , las concentraciones séricas de albúmina y ácido úrico en umol/L y los valores de la actividad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC) para albúmina y ácido úrico, con base en la siguiente fórmula:¹²⁸

$$\text{GAP antioxidante} = \text{AT} - [(\text{Albúmina} \times \text{TEAC}) + (\text{Ácido úrico} \times \text{TEAC})]$$

El TEAC de albúmina es 0.69 y el TEAC para el ácido úrico es 1.00.

- ✓ Se consideraron como valores normales a todos aquellos $>190\text{umol/L}$, y se consideraron como valores bajos a aquellos $\leq 190\text{umol/L}$.

VIII.3.3.8. 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).

➤ Principio del análisis:

El aducto 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es producido durante la reparación del ADN y su medición puede ser útil como marcador de daño oxidativo. Este es un método de ELISA competitivo en el que el anticuerpo monoclonal de 8-OHdG, la muestra y el estándar son adicionados a cada uno de los pozos de las microplacas las cuales están previamente cubiertos de 8-OHdG. La 8-OHdG en la muestra y el estándar compiten con la 8-OHdG unida a la placa por los sitios de unión al anticuerpo monoclonal de 8-OHdG. Los anticuerpos que se unen a la 8-OHdG de la muestra y el estándar son eliminados y los que se unen a la 8-OHdG de la placa permanecen. Posteriormente se adiciona un segundo anticuerpo marcado con enzima, se adiciona una solución cromogénica y se lee a 450 nm. El desarrollo de color es proporcional a la cantidad de anticuerpo monoclonal unido a la 8-OHdG de la placa.

➤ Procedimiento:

Se empleó un estuche comercial Bioxytech® 8-OHdG-EIA™ de OXIS Health Products, Inc. En esta prueba se empleó una muestra de orina tomada por la mañana.

- ✓ Preparación de soluciones de trabajo: Se reconstituyó el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal específico para 8-OHdG) con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). El anticuerpo secundario (Anticuerpo conjugado-HRP) se reconstituyó con PBS. El cromógeno (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) se diluyó con 100 volúmenes de amortiguador de dilución (Peróxido de hidrógeno/PBS-citrato). La solución amortiguadora de lavado se preparó diluyendo la solución de PBS 1 a 5 con agua destilada, todos provistos por la casa comercial.
- ✓ La primer columna de la microplaca se utilizó para preparar el blanco y la curva de calibración: en cada pozo se adicionaron 50uL de los estándares 1 a 6 de 8-OHdG (0.5, 2.0, 8.0, 20.0, 80.0 y 200 ng/mL, respectivamente).
- ✓ En el resto de los pozos se colocó cada una de las muestras, posteriormente se adicionaron 50 uL del anticuerpo primario reconstituido y después de mezclar, la placa bien sellada se incubó durante 1 hr a 37 °C.

-
-
- ✓ Se eliminó el sobrenadante de cada placa por inversión y se lavó la placa tres veces: En cada ocasión se adicionó en cada pozo 250 uL de solución amortiguadora de lavado, el exceso de amortiguador se retiró por inversión y se secó la placa sobre una toalla de papel.
 - ✓ En cada pozo de reacción se adicionaron 100 uL del anticuerpo secundario reconstituido, y posterior al mezclado se incubó la placa bien sellada a 37 °C por 1 hr.
 - ✓ Se repitió el lavado de la placa como se describió anteriormente y posteriormente se adicionaron 100 uL del cromógeno diluido. Después de mezclar perfectamente, la placa se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 15 minutos.
 - ✓ Se adicionaron 100 uL de la solución “stop” (Ácido fosfórico 1 mol/L), se mezcló y después de incubar durante tres minutos se prosiguió a leer la absorbancia a 450 nm.
 - ✓ La curva de calibración se realiza graficando la absorbancia vs. el logaritmo de la concentración. El análisis se realiza con una función logística de 4 parámetros. Los resultados se expresaron en ng/mg de creatinina. Para la determinación de creatinina en orina se siguió el procedimiento sugerido por la casa comercial de acuerdo al estuche Creatinina CR510 de Randox Laboratories, Ltd.
 - ✓ Se consideraron como valores normales a aquellos > 0.496 ng/mg de creatinina y se consideraron como valores bajos a aquellos ≤ 0.496 ng/mg de creatinina.

VIII.3.4. Medidas antropométricas y cuestionario de factores pro-oxidantes

- Se obtuvieron las medidas antropométricas de cada participante en el estudio siguiendo un procedimiento estandarizado:
- ✓ **Peso:** Cada individuo se pesó en una báscula calibrada marca Torino con la menor cantidad de ropa posible o con una bata clínica. El peso fue registrado en kilogramos.
- ✓ **Estatura:** Se colocó a cada individuo con los talones juntos, los glúteos, hombros y cabeza en contacto con el estadiómetro, los ojos mirando al frente y el plano de Frankfurt paralelo al suelo. La talla se registró en metros.

-
-
- ✓ Índice de masa corporal (IMC): Se obtuvo a través del cociente del peso y la estatura al cuadrado. Se expresó en Kg/m². Como criterio para sobrepeso se consideró un IMC > 27 Kg/m².¹²⁹
 - ✓ Presión arterial: Se tomó siguiendo el método establecido en el apéndice B de la NOM-030-SSA2-1999 para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial. Se determinó en el paciente sentado con un buen soporte en la espalda, con el brazo descubierto y flexionado a la altura del corazón. Se utilizó un esfigmomanómetro mercurial, el observador se situó de manera que podía ver el menisco de la columna de mercurio. Se colocó el brazalete situando el mango sobre la arteria humoral, se infla el mango hasta que el pulso desaparece a fin de determinar por palpación la tensión arterial sistólica (TAS), se desinfla el mango y se coloca la cápsula del estetoscopio sobre la arteria humoral, se infla rápidamente el mango 30 ó 40 mm de Hg por arriba del nivel paliatorio de la presión sistólica, se desinfla a una velocidad de 2mm de Hg/seg. La aparición del primer ruido de Korotkoff marca el nivel de la TAS y el quinto la tensión arterial diastólica (TAD).¹³⁰
 - A cada participante del estudio se aplicó un cuestionario de factores de riesgo pro-oxidantes por personal capacitado (anexo XIV. 2).

VIII.4. Diseño estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS versión 10.0. Se utilizaron como medidas descriptivas el promedio y el error estándar (EE) para las variables cuantitativas y frecuencias relativas para las variables cualitativas.

Se empleó el análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de confianza del 95 % para la comparación entre grupos y prueba de Tukey como Post Hoc. Adicionalmente se empleó la prueba t de Student para la comparación entre sexos.

Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para determinar la asociación entre la edad y el daño oxidativo, la capacidad de reparación al ADN, los lipoperóxidos plasmáticos y la eficiencia del sistema antioxidante.

Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

IX. 1. Parámetros bioquímicos, hematológicos y antropométricos

En el cuadro IX.1 se muestran las características antropométricas y las cifras de tensión arterial por grupo de edad y sexo, las cuales se encuentran dentro de parámetros normales. De igual manera, los datos de los parámetros bioquímicos y hematológicos también se encuentran dentro de los puntos de corte de referencia (cuadros IX. 2 y 3).

IX. 2. Lipoperoxidación plasmática y marcadores de daño al ADN por edad y sexo

Las concentraciones plasmáticas LPO no mostraron cambios sistemáticos significativos al comparar los grupos por edad y sexo (cuadro IX.4).

Con respecto a la migración del ADN, se observó que las mujeres de 25 a 44 años muestran un valor promedio de migración significativamente mayor que las mujeres de 65 años y más ($p < 0.05$) (cuadro IX.4), en contraste con los grupos de hombres en los que no se observó un cambio sistemático significativo en el promedio de migración conforme se incrementa la edad.

Con respecto al sexo, no se encontraron diferencias significativas en el promedio de migración de ADN entre individuos del mismo grupo de edad.

Por otro lado, en el análisis de regresión lineal múltiple en la población general entre la edad y el promedio de la migración de ADN, no se encontró una asociación estadísticamente significativa (cuadro IX.5).

En el análisis estratificado por grupo de edad y sexo, no se observó correlación significativa entre las variables edad y promedio de migración en los grupos de mujeres y de hombres de 25 a 44 años (cuadros IX.6 y 7). En el grupo de hombres de 45 a 64 años se muestra una correlación negativa entre la edad y el promedio de migración ($r = -0.4$, $p < 0.05$), la cual no se observa en el grupo de mujeres del mismo grupo de edad (cuadros IX.8 y 9). Por otro lado, no se observó correlación significativa entre la edad y el promedio de migración de ADN en los grupos de hombres y mujeres de 65 años en adelante (cuadros IX.10. y 11).

En relación al número de células sin daño al ADN, se observó que el grupo de mujeres de 25 a 44 años mostró un porcentaje promedio de células sin daño significativamente menor que el grupo de mujeres de 65 años y más ($p < 0.05$). En los varones no se observó un patrón de cambio significativo en el porcentaje de células sin daño al ADN conforme aumenta la edad (cuadro IX.4).

Con respecto al sexo (figura IX.1), se encontró que el grupo de hombres de 45 a 64 años presenta un porcentaje promedio de células sin daño al ADN significativamente menor que el grupo de mujeres de la misma edad ($p < 0.05$).

En la población general (cuadro IX.5) se observó una asociación positiva significativa entre el porcentaje de células sin daño al ADN y la edad ($r = 0.22$, $p < 0.05$).

Una vez estratificada la población por grupo de edad y sexo, en el grupo de mujeres de 45 a 64 años (cuadro IX.8.), se observó una correlación positiva entre la edad y el porcentaje de células sin daño ($r = 0.47$, $p < 0.05$), en contraste en el grupo de hombres de la misma edad, no se observó correlación significativa entre estas dos variables (cuadro IX.9).

De acuerdo a la clasificación de Anderson et al. (1997), las células con daño al ADN se dividieron en categorías como leve, moderado, severo, total y nubes tal como se describió en el apartado de material y métodos. Al realizar el análisis de varianza, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje promedio de estas células ni por grupo de edad ni por sexo (figura IX.2).

Por otro lado, la capacidad de reparación expresada como concentración urinaria de 8-OHdG permaneció sin cambios significativos al comparar los grupos por edad y sexo (cuadro IX.4).

IX. 3. Marcadores biológicos de la actividad del sistema antioxidante

La actividad eritrocitaria de SOD no mostró diferencias significativas al comparar los valores promedio por grupos de edad (cuadro IX.12).

Al comparar las diferencias por sexo entre los grupos de la misma edad (figura IX.3), se encontró que las mujeres de 25 a 44 años presentan una actividad eritrocitaria de SOD significativamente más alta que los hombres del mismo grupo de edad ($p < 0.0001$). De igual

manera, la actividad de este parámetro fue significativamente mayor en mujeres de 45 a 64 años que en hombres del mismo grupo de edad ($p < 0.01$).

Con el análisis de correlación se observó en el grupo de mujeres de 45 a 64 años una asociación negativa significativa entre la edad y la actividad de SOD ($r = -0.38$, $p < 0.05$) (cuadro IX.8.). Este tipo de asociación no se encontró en el grupo de hombres de la misma edad (cuadro IX. 9)

De acuerdo al análisis de varianza (cuadro IX.12), la actividad eritrocitaria de GPx no mostró diferencias significativas con respecto a la edad. No obstante al comparar por sexo entre individuos de la misma edad se encontró que las mujeres de 65 años y más muestran una actividad de GPx en eritrocitos significativamente mayor que los hombres de la misma edad ($p < 0.05$) (figura IX.4).

Al estratificar por grupo de edad y sexo, en el análisis de correlación se encontró una asociación positiva entre la actividad de GPx y la edad en el grupo de mujeres de 25 a 44 años, ($r = 0.46$, $p < 0.05$) a diferencia del grupo de hombres de la misma edad en el que no se observó este tipo de correlación (cuadros IX.6 y 7).

Por otro lado, en el grupo de mujeres de 45 a 64 años, se observó una correlación negativa entre la edad y la actividad de GPx ($r = -0.43$, $p < 0.05$), en contraste con el grupo de hombres de la misma edad en el que no se observa correlación significativa entre estas dos variables (cuadros IX.8 y 9).

La razón SOD/GPx no mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos de edad del mismo sexo (cuadro IX.12).

Se encontró una asociación negativa entre la razón SOD/GPx y la edad en el grupo de mujeres de 25 a 44 años ($r = -0.43$, $p < 0.05$) de acuerdo al análisis de correlación por grupo de edad y sexo (cuadro IX.6).

Haciendo referencia a la AT no se observaron cambios sistemáticos significativos conforme aumenta la edad ni con respecto al sexo (cuadro IX.12).

En el análisis estratificado de regresión lineal múltiple por grupo de edad y sexo, se encontró que las mujeres de 25 a 44 años muestran una correlación positiva entre la edad y la AT ($r = 0.61$, $p < 0.01$) (cuadro IX.6), en contraste, con el grupo de hombres de la misma edad en el que no se encontró asociación significativa (cuadro IX.7).

En el grupo de mujeres de 65 años y más se observó una asociación negativa entre la edad y la AT ($r = -0.88$, $p < 0.05$), a diferencia del grupo de hombres de la misma edad en el que no se observó entre estas dos variables asociación significativa (cuadros IX.10 y 11).

Por otro lado, GAP no mostró cambios sistemáticos significativos con respecto a la edad y al sexo (cuadro IX.12).

En el análisis de regresión lineal múltiple estratificado de acuerdo a la edad y al sexo, se encontró que entre GAP y la edad hay una asociación positiva ($r = 0.57$, $p < 0.01$) en el grupo de mujeres de 25 a 44 años (cuadro IX.6), en contraste con el grupo de hombres de la misma edad en el que no se observó esta asociación (cuadro IX.7).

Por otra parte, en el grupo de mujeres de 45 a 64 años se observó una correlación negativa entre la edad y GAP ($r = -0.46$, $p < 0.05$), no así en el grupo de hombres (cuadros IX.8 y 9). De igual manera, en el grupo de mujeres de 65 años y más se encontró una asociación negativa entre la edad y GAP ($r = -0.81$, $p < 0.05$), la cual no se observó en el grupo de hombres de la misma edad (cuadros IX.10 y 11).

IX.4. Sistema antioxidante, daño oxidativo y la capacidad de reparación

Al realizar el análisis de regresión lineal múltiple en la población general encontramos que la concentración de lipoperóxidos plasmáticos muestra una asociación negativa con la actividad eritrocitaria de SOD ($r = -0.16$, $p < 0.05$) y una asociación positiva con GAP ($r = 0.30$, $p = 0.001$).

El promedio de migración de ADN, el porcentaje promedio de células sin daño al ADN y la concentración urinaria de 8-OHdG no muestran asociación significativa con ninguno de los marcadores de la eficiencia del sistema antioxidante en la población general (cuadro IX.5)

En el análisis estratificado por grupo de edad y sexo, se encontró en el grupo de mujeres de 25 a 44 años una asociación positiva entre la concentración de LPO con AT ($r = 0.51$, $p = 0.001$) y GAP ($r = 0.64$, $p = 0.002$) como se observa en el cuadro IX.6.

De forma semejante, en el grupo de mujeres de 25 a 44 años se encontró asociación significativa entre el número de células sin daño al ADN con la actividad de SOD en eritrocitos ($r = 0.37$, $p < 0.05$) y GAP ($r = -0.39$, $p < 0.05$) como se observa en el cuadro IX.6.

En contraste en el grupo de hombres de la misma edad no existe asociación significativa entre la LPO, el daño oxidativo al ADN o la concentración de 8-OHdG y los componentes del sistema antioxidante determinados en este estudio (cuadro IX.7).

Por otro lado, en el grupo de mujeres de 45 a 64 años existe una asociación positiva significativa entre el promedio de migración de ADN y GAP ($r = 0.43$, $p < 0.05$) (cuadro IX.8). También se observó que el número de células sin daño presenta asociación negativa significativa con la actividad de GPx y GAP ($r = -0.54$ y $r = -0.50$, respectivamente, $p < 0.01$).

En contraste, los hombres de 45 a 64 años muestran una asociación negativa estadísticamente significativa entre el promedio de migración de ADN y la actividad de SOD ($r = -0.47$, $p < 0.05$) y una asociación positiva entre la concentración de 8-OHdG en orina y la actividad de SOD ($r = 0.41$, $p < 0.05$) (cuadro IX.9).

En el grupo de hombres de 65 años y más (cuadro IX.11.) se encontró que la migración de ADN está relacionada con un incremento en AT ($r = 0.98$, $p < 0.0001$) y GAP ($r = 0.81$, $p < 0.05$). También se encontró que el número de células sin daño al ADN muestra una correlación negativa significativa con la razón SOD/GPx ($r = -0.84$, $p < 0.05$), AT ($r = -0.89$, $p < 0.05$) y GAP ($r = -0.92$, $p < 0.05$).

Cuadro IX.1. Descripción de la población de estudio, medidas antropométricas y presión arterial

PARÁMETRO	25-44 años	45-64 años	≥ 65 años
No de individuos	73 (45%)	68 (42%)	21 (13%)
Mujeres	35 (48%)	41 (60%)	13 (62%)
Hombres	39 (52%)	26 (40%)	8 (38%)
Edad (años)	33 ± 5	55 ± 6	74 ± 6
IMC (Kg/m ²)			
Mujeres	25.3 ± 0.4	27.2 ± 0.7	29.3 ± 1.2
Hombres	25.9 ± 0.9	26.7 ± 0.7	27.1 ± 0.2
ICC			
Mujeres	0.82 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.89 ± 0.02
Hombres	0.89 ± 0.01	0.91 ± 0.01	1.01 ± 0.02
TAS (mm de Hg)			
Mujeres	110 ± 2	113 ± 2	133 ± 3
Hombres	114 ± 1	116 ± 3	127 ± 4
TAD (mm de Hg)			
Mujeres	71 ± 1	75 ± 1	78 ± 2
Hombres	75 ± 1	75 ± 2	78 ± 3

Los datos presentados son promedios ± EE.

IMC = índice de masa corporal; ICC = índice cintura cadera; TAS = tensión arterial sistólica; TAD = tensión arterial diastólica.

Cuadro IX.2. Parámetros bioquímicos de la población de estudio de acuerdo al grupo de edad

PARÁMETRO	25-44 años n = 73	45-64 años n = 68	≥ 65 años n = 21
Glucosa (mg/dL)			
Mujeres	84 ± 3	95 ± 2	94 ± 3
Hombres	86 ± 2	86 ± 2	85 ± 2
Urea (mg/dL)			
Mujeres	36 ± 1	38 ± 1	37 ± 1
Hombres	40 ± 1	38 ± 1	42 ± 1
Creatinina (mg/dL)			
Mujeres	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.02	0.9 ± 0.03
Hombres	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.06	1.1 ± 0.10
Ácido úrico (mg/dL)			
Mujeres	5.1 ± 0.2	5.4 ± 0.3	4.9 ± 0.4
Hombres	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.3	6.6 ± 0.5
Colesterol (mg/dL)			
Mujeres	177 ± 4	207 ± 7	196 ± 11
Hombres	199 ± 5	207 ± 8	209 ± 12
Triglicéridos (mg/dL)			
Mujeres	129 ± 11	180 ± 14	243 ± 46
Hombres	145 ± 11	192 ± 19	156 ± 17
HDL (mg/dL)			
Mujeres	58 ± 2	57 ± 2	54 ± 3
Hombres	52 ± 2	50 ± 2	55 ± 2
Albúmina (g/dL)			
Mujeres	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Hombres	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1	4.4 ± 0.2

Los datos presentados son promedio ± EE.

HDL = lipoproteínas de alta densidad

Cuadro IX.3. Parámetros hematológicos de la población de estudio por grupo de edad y sexo.

PARÁMETRO	25-44 años n = 73	45-64 años n = 68	≥ 65 años n = 21
Hemoglobina (g/dL)			
Mujeres	14.5 ± 0.2	14.9 ± 0.2	14.2 ± 0.4
Hombres	16.3 ± 0.2	16.1 ± 0.1	16.0 ± 0.4
Hematocrito (%)			
Mujeres	43 ± 1.0	46 ± 1.0	44 ± 1.0
Hombres	51 ± 0.5	50 ± 1.0	50 ± 1.0
Eritrocitos (X10 ⁶ /mm ³)			
Mujeres	5.01 ± 0.1	5.22 ± 0.1	4.90 ± 0.2
Hombres	5.95 ± 0.1	5.83 ± 0.1	5.57 ± 0.1
Leucocitos (cels/mm ³)			
Mujeres	5431 ± 207	5612 ± 230	6123 ± 367
Hombres	6629 ± 311	6454 ± 379	6581 ± 485

Los datos presentados son promedio ± EE.

Cuadro IX.4. Lipoperóxidos plasmáticos, daño al ADN y capacidad de reparación por grupo de edad y sexo.

PARÁMETRO	25-44 años n = 73	45-64 años n = 68	≥ 65 años n = 21
LPO (umol/L)			
Mujeres	0.255 ± 0.01	0.280 ± 0.01	0.330 ± 0.03
Hombres	0.265 ± 0.01	0.263 ± 0.01	0.297 ± 0.03
Migración de ADN (um)			
Mujeres	35.99 ± 2.30 ^a	32.47 ± 1.74	23.94 ± 1.40
Hombres	33.26 ± 1.52	32.64 ± 1.82	33.59 ± 4.76
Células sin daño (%)			
Mujeres	75 ± 4 ^b	85 ± 3	98 ± 1
Hombres	73 ± 3	75 ± 4	78 ± 1
8-OHdG (ng/mg creat)			
Mujeres	0.393 ± 0.050	0.531 ± 0.128	0.450 ± 0.060
Hombres	0.464 ± 0.086	0.422 ± 0.041	0.587 ± 0.274

Los datos presentados son promedio ± EE. Análisis de varianza (ANDEVA) entre grupos de edad y prueba de Tukey como Post Hoc. Migración de ADN: ^a Mujeres 25-44 vs. ≥ 65 años, p< 0.05; Células sin daño: ^b Mujeres 25-44 vs. ≥ 65 años, p< 0.05. Lipoperóxidos plasmáticos (LPO) y concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) entre todos los grupos, p>0.05.

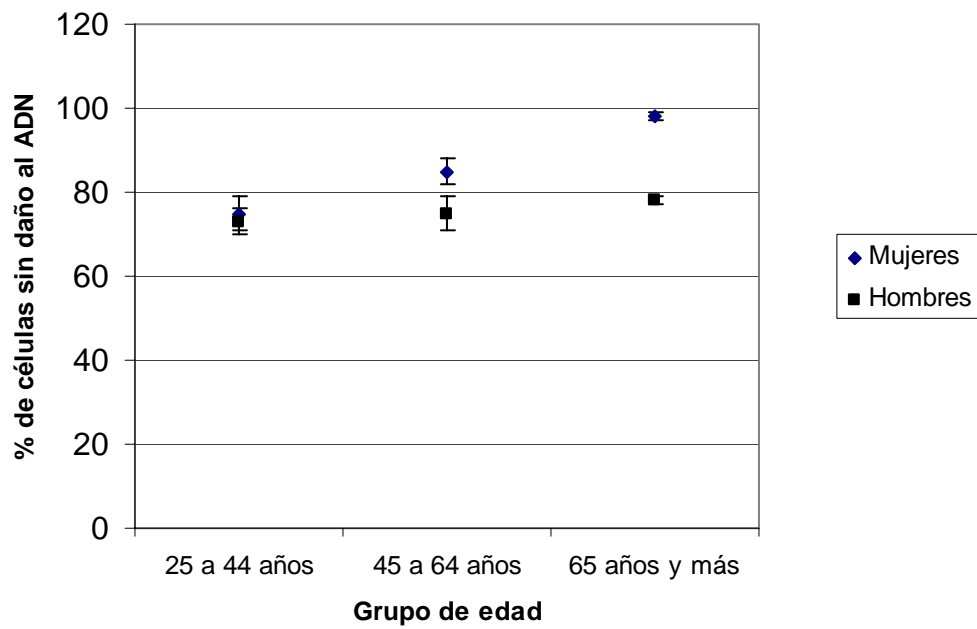


Figura IX.1. Células sin daño al ADN por sexo.
Prueba t de Student: Mujeres de 45 a 64 años vs. hombres de 45 a 64 años, $p < 0.05$.

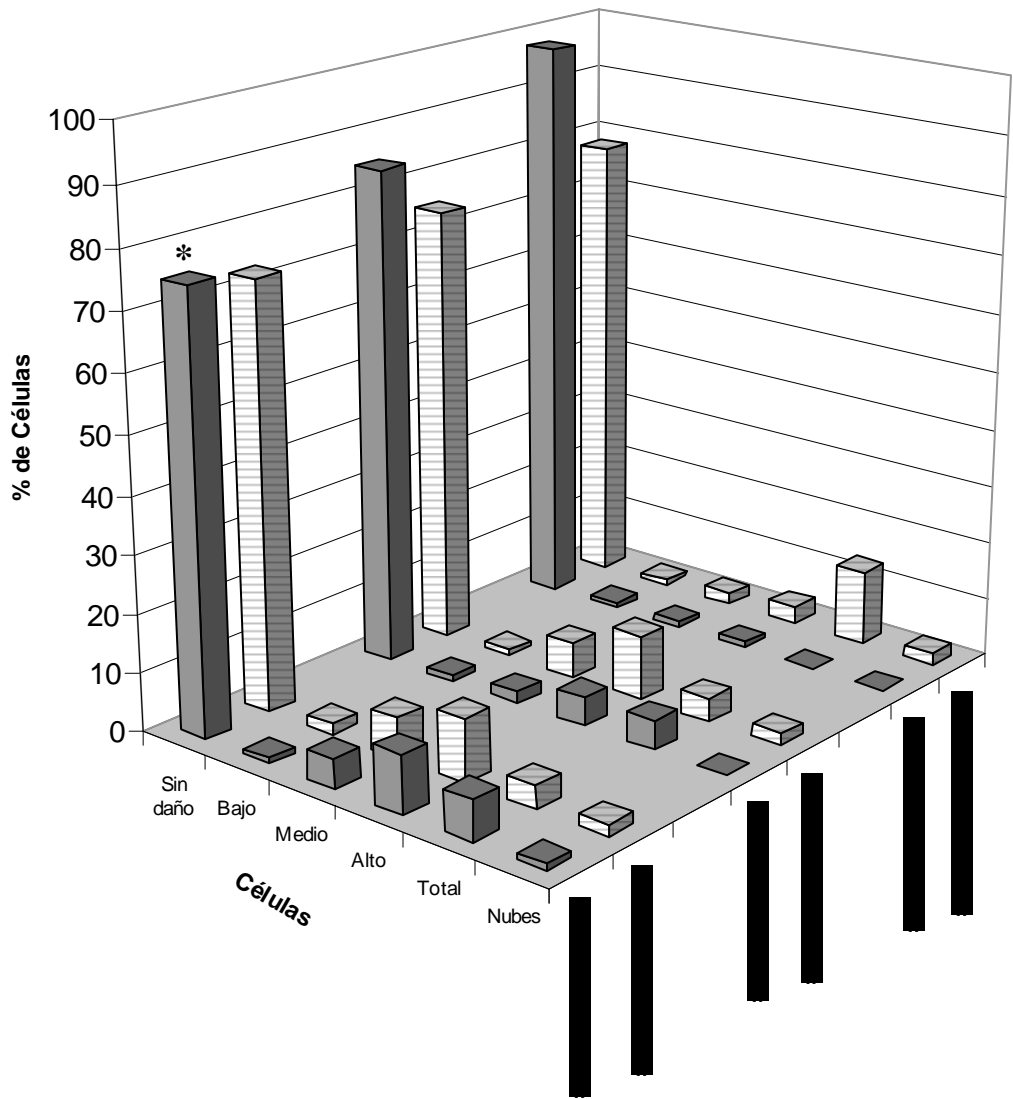


Figura IX.2. Células con daño al ADN por grupo de edad y sexo de acuerdo a la clasificación de Anderson et al. (1997)
 Prueba ANDEVA: *Mujeres 25-44 vs. ≥ 65 años, $p < 0.05$.

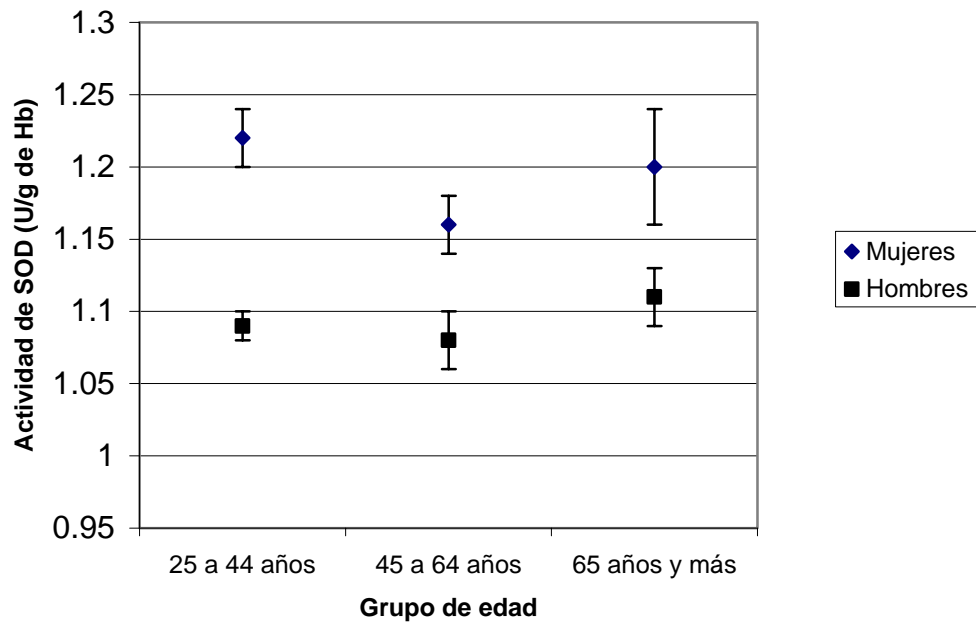


Figura IX.3. Actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa (SOD, U/g Hb) de acuerdo al sexo. Prueba t de Student: Mujeres 25 a 44 vs. hombres 25 a 44, $p < 0.0001$ y mujeres 45 a 64 vs. hombres 45 a 64, $p < 0.01$.

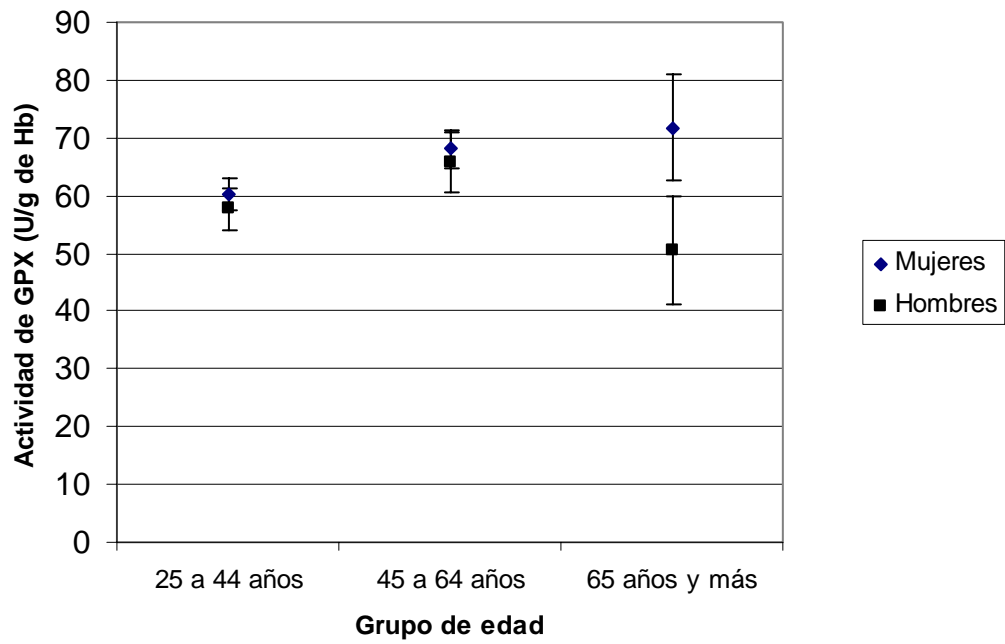


Figura IX.4. Actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa (GPx, U/g Hb) de acuerdo al sexo. Prueba t de Student: Mujeres \geq 65 años vs. hombres \geq 65 años $p < 0.05$.

Cuadro IX.5. Correlación entre la edad y los marcadores biológicos de EOx, en la población en general

	Edad	LPO	Migrac	Céls	8-OHdG	SOD	GPX	SOD/GPX	AT	GAP	
Valor de r	Edad	1.000	0.084	-0.138	0.220	0.130	-0.071	0.017	0.059	0.065	0.046
	LPO		1.000	0.151	-0.270	-0.164	-0.168	-0.068	0.144	0.149	0.306
	Migrac			1.000	-0.612	-0.013	-0.096	0.013	-0.090	0.069	0.075
	Céls				1.000	0.098	0.098	-0.130	0.129	-0.056	-0.121
	8-OHdG					1.000	0.096	-0.046	0.000	0.023	-0.062
	SOD						1.000	0.121	0.106	-0.177	-0.050
	GPX							1.000	-0.771	0.146	0.218
	SOD/GPX								1.000	-0.099	-0.128
	AT									1.000	0.700
	GAP										1.000
Valor de p	Edad		0.208	0.088	0.015	0.103	0.246	0.433	0.284	0.262	0.238
(una cola)	LPO			0.070	0.004	0.055	0.050	0.254	0.079	0.072	0.001
	Migrac				<0.0001	0.448	0.176	0.451	0.191	0.250	0.233
	Céls					0.169	0.169	0.103	0.104	0.292	0.119
	8-OHdG						0.174	0.328	0.500	0.410	0.273
	SOD							0.118	0.151	0.042	0.312
	GPX								<0.0001	0.077	0.016
	SOD/GPX									0.168	0.105
	AT										<0.0001

Análisis de regresión lineal múltiple, 95% de confianza. $R = 0.340$, $R^2 = 0.116$ y $p = 0.268$, $n=97$.

LPO = Lipoperóxidos plasmáticos, Migrac = Migración de ADN, Céls = Células sin daño al ADN, 8-OHdG = Concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, SOD/GPx = razón SOD/GPX, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

Cuadro IX.6. Correlación entre la edad y los marcadores biológicos de EOx, en mujeres de 25 a 44 años

	Edad	LPO	Migrac	Céls	8-OHdG	SOD	GPX	SOD/GPX	AT	GAP	
Valor de r	Edad	1.000	0.187	0.231	-0.121	-0.256	0.024	0.463	-0.437	0.611	0.577
	LPO		1.000	0.292	-0.341	0.022	-0.150	0.237	-0.207	0.517	0.646
	Migrac			1.000	-0.494	-0.190	-0.244	0.077	-0.177	0.282	0.231
	Céls				1.000	0.358	0.379	-0.232	0.296	-0.301	-0.395
	8-OHdG					1.000	0.273	-0.202	0.311	-0.316	-0.264
	SOD						1.000	0.048	0.173	-0.308	-0.285
	GPX							1.000	-0.927	0.401	0.369
	SOD/GPX								1.000	-0.419	-0.402
	AT									1.000	0.832
	GAP										1.000
Valor de p	Edad		0.202	0.150	0.296	0.125	0.458	0.015	0.021	0.001	0.002
(una cola)	LPO			0.094	0.060	0.461	0.252	0.144	0.178	0.007	0.001
	Migrac				0.010	0.199	0.137	0.366	0.215	0.102	0.150
	Céls					0.051	0.041	0.150	0.091	0.087	0.035
	8-OHdG						0.109	0.183	0.079	0.076	0.117
	SOD							0.416	0.220	0.082	0.099
	GPX								<0.0001	0.032	0.045
	SOD/GPX									0.026	0.032
	AT										<0.0001

Análisis de regresión lineal múltiple, 95% de confianza. $R = 0.760$, $R^2 = 0.577$ y $p = 0.165$, $n=22$.

LPO = Lipoperóxidos plasmáticos, Migrac = Migración de ADN, Céls = Células sin daño al ADN, 8-OHdG = Concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, SOD/GPx = razón SOD/GPX, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

Cuadro IX.7. Correlación entre la edad y los marcadores biológicos de EOX, en hombres de 25 a 44 años

	Edad	LPO	Migrac	Céls	8-OHdG	SOD	GPX	SOD/GPX	AT	GAP	
Valor de r	Edad	1.000	-0.044	-0.109	0.028	0.159	0.133	0.115	-0.103	-0.191	-0.037
	LPO		1.000	0.355	-0.547	-0.377	-0.297	-0.191	0.085	0.064	0.110
	Migrac			1.000	-0.507	-0.143	-0.111	-0.082	-0.046	-0.139	-0.183
	Céls				1.000	0.030	0.012	-0.157	0.127	0.187	0.166
	8-OHdG					1.000	-0.092	-0.041	-0.108	-0.112	-0.232
	SOD						1.000	0.134	0.299	-0.348	-0.279
	GPX							1.000	-0.836	0.338	0.402
	SOD/GPX								1.000	-0.330	-0.380
	AT									1.000	0.904
	GAP										1.000
Valor de p	Edad		0.418	0.302	0.447	0.223	0.262	0.292	0.313	0.180	0.430
(una cola)	LPO			0.041	0.002	0.032	0.074	0.180	0.342	0.381	0.300
	Migrac				0.005	0.247	0.298	0.348	0.414	0.060	0.191
	Céls					0.444	0.477	0.227	0.273	0.185	0.214
	8-OHdG						0.331	0.423	0.304	0.298	0.132
	SOD							0.262	0.073	0.044	0.088
	GPX								<0.0001	0.049	0.023
	SOD/GPX									0.054	0.031
	AT										<0.0001

Análisis de regresión lineal múltiple, 95% de confianza. $R = 0.540$, $R^2 = 0.292$ y $p = 0.710$, $n=25$.

LPO = Lipoperóxidos plasmáticos, Migrac = Migración de ADN, Céls = Células sin daño al ADN, 8-OHdG = Concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, SOD/GPx = razón SOD/GPX, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

Cuadro IX.8. Correlación entre la edad y los marcadores biológicos de EOx, en mujeres de 45 a 64 años

	Edad	LPO	Migrac	Céls	8-OHdG	SOD	GPX	SOD/GPX	AT	GAP	
Valor de r	Edad	1.000	-0.125	-0.312	0.478	0.270	-0.385	-0.429	0.198	-0.152	-0.460
	LPO		1.000	0.223	-0.372	-0.128	-0.081	0.077	-0.125	-0.244	0.229
	Migrac			1.000	-0.632	0.079	0.005	0.170	-0.057	0.304	0.432
	Céls				1.000	-0.121	-0.260	-0.546	0.346	-0.200	-0.508
	8-OHdG					1.000	0.079	-0.206	0.210	0.179	0.022
	SOD						1.000	-0.044	0.400	0.224	0.050
	GPX							1.000	-0.894	0.076	0.376
	SOD/GPX								1.000	-0.013	-0.362
	AT									1.000	0.466
	GAP										1.000
Valor de p	Edad		0.295	0.084	0.014	0.118	0.042	0.026	0.195	0.255	0.018
(una cola)	LPO			0.166	0.049	0.289	0.363	0.370	0.295	0.143	0.159
	Migrac				0.001	0.367	0.491	0.231	0.403	0.090	0.025
	Céls					0.300	0.127	0.005	0.063	0.193	0.009
	8-OHdG						0.368	0.185	0.180	0.218	0.463
	SOD							0.424	0.036	0.164	0.415
	GPX								<0.0001	0.372	0.046
	SOD/GPX									0.477	0.053
	AT										0.017

Análisis de regresión lineal múltiple, 95% de confianza. $R = 0.745$, $R^2 = 0.555$ y $p = 0.252$, $n=21$.

LPO = Lipoperóxidos plasmáticos, Migrac = Migración de ADN, Céls = Células sin daño al ADN, 8-OHdG = Concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, SOD/GPx = razón SOD/GPX, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

Cuadro IX.9. Correlación entre la edad y los marcadores biológicos de EOx, en hombres de 45 a 64 años

	Edad	LPO	Migrac	Céls	8-OHdG	SOD	GPX	SOD/GPX	AT	GAP	
Valor de r	Edad	1.000	-0.329	-0.400	0.378	-0.144	-0.128	-0.327	0.331	-0.022	0.105
	LPO		1.000	0.193	-0.333	-0.109	-0.097	0.135	-0.280	-0.231	-0.133
	Migrac			1.000	-0.545	0.266	-0.470	0.020	-0.170	0.054	-0.354
	Céls				1.000	0.090	0.203	-0.182	0.094	0.208	0.266
	8-OHdG					1.000	0.414	0.093	0.198	0.259	0.185
	SOD						1.000	0.021	0.460	-0.094	0.222
	GPX							1.000	-0.789	0.302	0.258
	SOD/GPX								1.000	-0.260	-0.158
	AT									1.000	0.400
	GAP										1.000
Valor de p	Edad		0.091	0.050	0.061	0.285	0.306	0.093	0.090	0.466	0.339
(una cola)	LPO			0.221	0.088	0.334	0.351	0.296	0.130	0.178	0.299
	Migrac				0.010	0.143	0.024	0.469	0.250	0.416	0.075
	Céls					0.361	0.210	0.234	0.256	0.204	0.143
	8-OHdG						0.044	0.357	0.215	0.150	0.231
	SOD							0.467	0.027	0.356	0.188
	GPX								<0.0001	0.111	0.151
	SOD/GPX									0.149	0.266
	AT										0.050

Análisis de regresión lineal múltiple, 95% de confianza. $R = 0.838$ $R^2 = 0.703$, $p = 0.154$, $n=18$

LPO = Lipoperóxidos plasmáticos, Migrac = Migración de ADN, Céls = Células sin daño al ADN, 8-OHdG = Concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, SOD/GPx = razón SOD/GPX, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

Cuadro IX.10. Correlación entre la edad y los marcadores biológicos de EOX, en mujeres de 65 años y más

	Edad	LPO	Migrac	Céls	8-OHdG	SOD	GPX	SOD/GPX	AT	GAP	
Valor de r	Edad	1.000	-0.587	0.641	‘	-0.330	-0.200	0.287	-0.319	-0.888	-0.817
	LPO	1.000	-0.425	‘	-0.112	-0.242	-0.532	0.407	0.521	0.737	
	Migrac		1.000	‘	-0.799	-0.690	-0.150	0.425	-0.730	-0.712	
	Céls			1.000	‘	‘	‘	‘	‘	‘	
	8-OHdG				1.000	0.708	0.214	-0.557	0.598	0.469	
	SOD					1.000	0.795	-0.845	0.171	0.015	
	GPX						1.000	-0.847	-0.443	-0.574	
	SOD/GPX							1.000	0.243	0.305	
	AT								1.000	0.947	
	GAP									1.000	
Valor de p	Edad	0.149	0.122	<0.0001	0.294	0.373	0.320	0.300	0.022	0.046	
(una cola)	LPO		0.238	<0.0001	0.429	0.347	0.178	0.248	0.184	0.078	
	Migrac			<0.0001	0.053	0.099	0.405	0.238	0.081	0.089	
	Céls				<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
	8-OHdG					0.090	0.365	0.165	0.143	0.213	
	SOD						0.054	0.036	0.392	0.490	
	GPX							0.035	0.227	0.156	
	SOD/GPX								0.347	0.309	
	AT									0.007	

Análisis de regresión lineal múltiple, 95% de confianza. R = 1.000, R² = 1.000 y p =, n=5.

‘ = Valor considerado como constante en el análisis de regresión. LPO = Lipoperóxidos plasmáticos, Migrac = Migración de ADN, Céls = Células sin daño al ADN, 8-OHdG = Concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, SOD/GPx = razón SOD/GPX, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

Cuadro IX.11. Correlación entre la edad y los marcadores biológicos de EOX, en hombres de 65 años y más.

	Edad	LPO	Migrac	Céls	8-OHdG	SOD	GPX	SOD/GPX	AT	GAP	
Valor de r	Edad	1.000	0.588	0.638	-0.520	-0.119	-0.297	-0.236	0.266	0.525	0.518
	LPO		1.000	0.439	-0.547	-0.456	0.126	0.032	0.190	0.345	0.359
	Migrac			1.000	-0.922	-0.036	-0.258	-0.558	0.704	0.985	0.814
	Céls				1.000	0.355	0.157	0.635	-0.847	-0.891	-0.928
	8-OHdG					1.000	-0.503	0.025	-0.294	0.016	-0.443
	SOD						1.000	0.726	-0.442	-0.179	-0.274
	GPX							1.000	-0.924	-0.505	-0.788
	SOD/GPX								1.000	0.665	0.932
	AT									1.000	0.761
	GAP										1.000
Valor de p	Edad		0.110	0.087	0.145	0.411	0.284	0.326	0.305	0.142	0.146
(una cola)	LPO			0.192	0.130	0.182	0.406	0.476	0.359	0.251	0.242
	Migrac				0.004	0.473	0.311	0.125	0.059	<0.0001	0.024
	Céls					0.245	0.383	0.088	0.017	0.009	0.004
	8-OHdG						0.155	0.481	0.286	0.488	0.190
	SOD							0.051	0.190	0.367	0.300
	GPX								0.004	0.153	0.031
	SOD/GPX									0.075	0.003
	AT										0.039

Análisis de regresión lineal múltiple, 95% de confianza. R = 1.000, R² = 1.000 y p =, n=6.

LPO = Lipoperóxidos plasmáticos, Migrac = Migración de ADN, Céls = Células sin daño al ADN, 8-OHdG = Concentración urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, SOD/GPx = razón SOD/GPX, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

Cuadro IX.12. Marcadores de la actividad del sistema antioxidante por grupo de edad y sexo

PARÁMETRO	25-44 años n = 73	45-64 años n = 68	≥ 65 años n = 21
SOD (U/g de Hb)			
Mujeres	1.22 ± 0.02	1.16 ± 0.02	1.20 ± 0.04
Hombres	1.09 ± 0.01	1.08 ± 0.02	1.11 ± 0.02
GPx (U/g de Hb)			
Mujeres	60.33 ± 2.83	68.08 ± 3.30	71.81 ± 9.23
Hombres	57.77 ± 3.67	65.73 ± 5.13	50.45 ± 9.42
Razón SOD/GPx			
Mujeres	0.022 ± 0.001	0.020 ± 0.002	0.024 ± 0.006
Hombres	0.023 ± 0.002	0.019 ± 0.001	0.025 ± 0.002
AT (umol/L)			
Mujeres	945 ± 55	1032 ± 45	1083 ± 70
Hombres	1165 ± 48	1051 ± 46	1099 ± 68
GAP (umol/L)			
Mujeres	239 ± 43	321 ± 39	342 ± 61
Hombres	339 ± 42	228 ± 32	244 ± 44

Los datos presentados son promedio ± EE. Análisis de varianza (ANDEVA) entre grupos de edad y prueba de Tukey como Post Hoc, $p > 0.05$ entre grupos de edad en todos los parámetros.

SOD = actividad eritrocitaria de superóxido dismutasa, GPX = actividad eritrocitaria de glutatión peroxidasa, AT = capacidad antioxidante plasmática total y GAP = capacidad antioxidante residual.

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El progresivo aumento de la esperanza de vida ha llevado al constante crecimiento de la población de ancianos. Sin embargo, la variabilidad biológica, el gran número de factores genéticos y ambientales que lo determinan, hacen que el envejecimiento sea un proceso difícil de comprender.¹

En la actualidad uno de los principales objetivos de la Gerontología es que un mayor número de individuos gocen un envejecimiento exitoso libre de enfermedades crónico-degenerativas incapacitantes; para ello, es de gran importancia determinar que factores moleculares y ambientales son los que contribuyen especialmente en el proceso de envejecimiento que cursa sin fragilidad, con la finalidad de proponer medidas preventivas o terapéuticas que impacten positivamente en el estado de salud de los ancianos y evitar en gran medida el envejecimiento asociado a una o varias enfermedades crónico degenerativas que en última instancia, aumentan la dependencia funcional de los individuos y degradan su calidad de vida y la de su familia.¹³¹

Al respecto, la exposición de los organismos al EOx es una consecuencia inevitable de su gran capacidad para producir energía a partir de la actividad respiratoria, sin embargo, en el intento de establecer el efecto del envejecimiento sobre el desarrollo de EOx se han generado propuestas controversiales.

Parte de esta controversia se debe principalmente a la elevada reactividad e inestabilidad de las EROs que ha provocado que su medición en sistemas biológicos se realice a través de una gran diversidad de métodos indirectos que cuantifican los subproductos derivados de su interacción con biomoléculas orgánicas, haciendo que los resultados entre los estudios no sean comparables y limitando su aplicación al ámbito clínico humano.¹³²

En este sentido, por un lado se ha propuesto que el EOx se incrementa durante el envejecimiento y se ha vinculado con la etiopatogenia de más de 100 enfermedades crónicas de la vejez, no obstante algunos autores cuestionan dicha propuesta, señalando que el envejecimiento es un proceso gradual y adaptativo en el que no hay un incremento sustancial del

EOx y por lo tanto, la presencia de enfermedades crónico degenerativas no es una condición *per se* del envejecimiento.^{95,96}

Debido a estas discrepancias, actualmente hay una creciente necesidad de evaluar integralmente el EOx incluyendo la medición de algunos productos del daño oxidativo como la LPO y el daño oxidativo al ADN y algunos de los componentes enzimáticos y exógenos que forman parte del sistema de defensa antioxidante, con el fin de establecer el verdadero estado redox de los sistemas biológicos, incluido el ser humano.¹³¹

Se ha observado que el malondialdehído (MDA), es un buen marcador de la lipoperoxidación y que las concentraciones elevadas de este aldehído indican que el tejido en estudio mantiene un persistente estado oxidativo. De igual manera, la determinación de la migración de ADN detectada a través del ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica es ampliamente utilizado como marcador confiable de daño oxidativo.

Por otro lado, la capacidad del sistema de defensa antioxidante está determinada por la interacción dinámica entre los componentes enzimáticos como la SOD y GPx, y algunos antioxidantes como las vitaminas A, E, C, beta-caroteno y moléculas biológicas de bajo peso molecular como la bilirrubina, el ácido úrico, la albúmina, los estrógenos, entre otras, que pueden ser cuantificadas individualmente o como la actividad total del sistema antioxidante.

Algunos autores han observado que el proceso de envejecimiento cursa con un incremento significativo en el daño oxidativo expresado como un incremento en la LPO o en el daño al ADN,^{89,90 133-136} no obstante, en este estudio no se encontraron diferencias significativas en el promedio de la concentración de LPO durante el proceso de envejecimiento, resultado que concuerda con Hazane et al. (2006)⁹⁷ quienes al evaluar el EOx no encontraron diferencias significativas en el valor promedio de TBARS en fibroblastos de individuos de 2 a 88 años, lo cual sugiere que el envejecimiento *per se* no causa estrés oxidativo. Al respecto, Mendoza-Núñez et al. (2007)¹³³ señalan que el incremento de los radicales libres y el daño que estos pueden provocar durante el envejecimiento están vinculados a factores pro-oxidantes relacionados con el estilo de vida y el ambiente y no al envejecimiento *per se*.

En el mismo sentido, Medina-Navarro et al. (1997)¹³⁷ encontraron niveles de TBARS elevados en sujetos con una residencia muy corta en la ciudad de México (entre 1 y 8 días), no

obstante, al realizar la misma medición 16 semanas después, encontraron que los valores habían disminuido. Los individuos que habitan en la ciudad de México están expuestos al ozono, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y otros hidrocarburos que se aglomeran debido a que la ciudad está rodeada de montañas cercanas que forman valles cerrados donde el movimiento de aire es restringido.¹³⁷

La exposición gradual pero constante ante los contaminantes ambientales genera un incremento en la formación de RL y en respuesta, la actividad de las enzimas SOD, GPx y otras moléculas no enzimáticas aumenta como parte de un proceso de adaptación por parte del sistema antioxidante y de reparación, que ocurre como consecuencia pasiva de la sensibilización al ambiente.¹³⁷⁻¹⁴¹

De hecho, el incremento de LPO durante el envejecimiento se ha asociado a nivel molecular con aumento en el número de instauraciones de los ácidos grasos que forman parte de las membranas celulares como consecuencia de estímulos externos tales como estrés térmico o radiación UV, y a nivel orgánico con enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus tipo 1 y 2, hipertensión arterial e incluso desórdenes neurodegenerativos como Parkinson y Alzheimer, que pueden aumentar la probabilidad para cursar envejecimiento con fragilidad.^{86,139, 142,143}

Por otro lado, en este estudio se ha observado que en el caso de los hombres, el daño al ADN no se modifica considerablemente entre grupos de edad, no obstante las mujeres ≥ 65 años muestran un promedio de migración menor y un mayor porcentaje de células sin daño en comparación con las mujeres de 25-44 años ($p < 0.05$), sugiriendo que el envejecimiento *per se* no está acompañado de mayor daño oxidativo al ADN, esto concuerda con lo encontrado por Hazane et al. (2006)⁹⁷ quienes observaron que el daño basal en el ADN no se incrementa por el proceso de envejecimiento *per se* y que la susceptibilidad de los linfocitos ante el daño oxidativo no se incrementa como lo han sugerido otros autores,¹⁴⁴ sino que incluso paradójicamente puede disminuir como lo sugiere el análisis de regresión realizado en la población general en el que se observó que el número de células sin daño aumenta acorde se incrementa la edad.

Probablemente, en los individuos que participaron en este estudio, el envejecimiento está acompañado por cambios graduales en la estructura y función de un gran número de sistemas de defensa y reparación que permiten mantener la estabilidad genómica e incrementan la resistencia ante el EOx, como lo han sugerido King et al. (1997)⁹⁴ quienes observaron que el daño oxidativo al

ADN en linfocitos de sujetos mayores de 75 años es similar al que presentan los sujetos de 35-39 años, sugiriendo que en estos individuos se presenta un proceso adaptativo similar al observado en centenarios sanos vinculado al mecanismo de hormesis, que explicaría el proceso del envejecimiento exitoso.

Por otro lado, se ha propuesto que bajo condiciones fisiológicas, la actividad de las enzimas que participan en la reparación de lesiones oxidativas en individuos jóvenes y ancianos, es suficiente para contrarrestar el daño producido por las EROs y sólo cuando los mecanismos antioxidantes y de reparación son insuficientes o ineficientes, se altera la homeostasis del organismo y se puede establecer el EOx que contribuye a la declinación funcional de órganos y tejidos relacionada con la edad y con el desarrollo de las enfermedades crónicas que se presentan en individuos que cursan con fragilidad durante el envejecimiento.^{34,102}

Al respecto, se ha demostrado que la determinación de 8-OHdG en orina es un buen marcador de la capacidad de reparación de esta lesión en el ADN por parte de las nucleasas.⁷³ Se ha observado que la concentración de este metabolito en tejidos aumenta durante el envejecimiento y que su excreción urinaria disminuye debido a que también la acción de las nucleasas disminuye y se ha señalado que esto contribuye a la acumulación de mutaciones en el ADN que favorecen al desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer.⁹¹

Los resultados encontrados en este estudio muestran que la concentración de 8-OHdG en orina no se modifica significativamente con la edad, indicando que la capacidad de reparación del ADN en ancianos no presenta cambios relativos al envejecimiento y es congruente con lo encontrado con el daño al ADN, así como se ha reportado en otros estudios.^{74, 94,145}

En este sentido, algunos autores han observado que las células que son resistentes al EOx tienen elevadas concentraciones de endonucleasa AP en su mitocondria a causa de la exposición gradual ante las EROs, lo que les permite mantener valores basales de daño al ADN en la mitocondria.⁴⁸ Asimismo, en un estudio realizado por Al-Baker et al. (2005)¹⁴⁶ se observó que tanto las células jóvenes como las senescentes son capaces de reparar el daño oxidativo después de ser expuestas a diferentes dosis de radiación UV. En este estudio se demostró que en las mismas condiciones de cultivo las células senescentes son más eficientes para reparar ciertos tipos de lesiones apoyando la hipótesis de que el daño oxidativo al ADN no se incrementa con el envejecimiento *per se*.

Por otro lado, el mantenimiento de la integridad del material genético y otras biomoléculas no es exclusivo de los mecanismos de reparación sino también de un sistema antioxidante eficiente. La capacidad del sistema de defensa está determinada por la interacción dinámica entre los componentes enzimáticos, vitaminas y otras moléculas biológicas de bajo peso molecular.⁶²

En algunos estudios se ha sugerido que la eficiencia del sistema antioxidante declina con la edad a partir de los 45 años, aunque se ha señalado que el envejecimiento no está asociado con la declinación global del sistema antioxidante.^{29,114,147}

En este estudio, no se observaron cambios significativos en la actividad de SOD, GPX, razón SOD/GPx, AT y GAP conforme aumenta la edad. Los resultados concuerdan con lo reportado por Habif et al. (2001)¹⁴⁸ quienes observaron que no se presentan cambios significativos en la actividad de GPX relativos al envejecimiento.

En el análisis estratificado por grupo de edad y sexo, no se observaron cambios significativos en la actividad de los marcadores de la eficiencia del sistema antioxidante con relación a la edad en ninguno de los grupos de estudio de varones; no obstante en el grupo de mujeres de 25 a 44 años se encontró que conforme aumenta la edad hay un incremento significativo de la actividad de GPx, AT y GAP aunado a una disminución de la razón SOD/GPx, lo cual concuerda con otros estudios en los que se ha observado un incremento en la actividad de GPx conforme aumenta la edad y la actividad de SOD disminuye o no sufre cambios significativos.^{94,114}

Al respecto, se ha señalado que la elevación en la actividad de la GPx se presenta como una adaptación del organismo en respuesta ante un incremento en las EROs, principalmente H₂O₂, mejorando la eficiencia del sistema antioxidante para contribuir al envejecimiento exitoso,^{94,149} tal como fue observado en la población de este estudio.

Por otro lado, se ha señalado que la razón SOD/GPX es mejor indicador del balance entre las enzimas antioxidantes que la evaluación por separado de cada una de ellas. El aumento en su valor se ha vinculado con un desequilibrio oxidativo que puede potencialmente contribuir al envejecimiento prematuro.¹⁵⁰ De acuerdo a los resultados, se encontró que la razón SOD/GPX disminuye conforme se incrementa la edad en el grupo de mujeres de 25 a 44 años, lo que sugiere que en esta etapa del ciclo vital no hay deficiencias en dichas enzimas antioxidantes.

De acuerdo a los resultados de este estudio se encontró que en el grupo de mujeres de 25 a 44 años se incrementa AT y GAP en relación a la edad, datos que concuerda con Aejmelaeus et al. (1997)¹⁰³ quienes asumen que el incremento en la capacidad antioxidante total se debe a la participación del ácido úrico y al 17-beta-estradiol que regula parcialmente la biosíntesis de purinas y el metabolismo del ácido úrico.

También se subraya la importancia de todos los antioxidantes no identificados que son diferentes al ácido úrico que pueden aportar alrededor del 40-45 % de la protección antioxidante plasmática. Al respecto, en este estudio dichos antioxidantes se ven reflejados en el GAP antioxidante, que se incrementa con la edad en este grupo de mujeres de 25 a 44 años en particular.

En contraste, en las mujeres de 45-64 años se observa que conforme aumenta la edad hay una disminución de la actividad de SOD, GPx y GAP y en las mujeres de 65 años y más conforme se incrementa la edad disminuyen AT y GAP. En este sentido, algunos investigadores han sugerido que la actividad de GPx disminuye cuando el estado redox del sistema glutatión oxidado/glutatión reducido (GSH/GSSG) se inclina hacia la oxidación. El estado redox de este sistema se mantiene constante en los individuos, sin embargo alrededor de la cuarta década de vida, comienza a oxidarse rápidamente, no obstante se ha señalado que esta oxidación no es debida *per se* al envejecimiento sino a otros factores de tipo genético, ambiental, nutricional, e incluso patológico, que necesitan ser evaluados individualmente.¹⁴⁷

Generalmente se ha asociado la disminución en la actividad de SOD con un incremento en la susceptibilidad al EOX debido a la inactivación de la enzima por el exceso de su sustrato o la glucosilación de la misma,¹⁵¹ no obstante, se ha sugerido que la actividad de SOD puede estar disminuida y aun así la protección antioxidante se mantiene.⁸⁷ En algunos experimentos se ha encontrado que la inactivación total de la SOD puede deteriorar la vida adulta, no obstante, se necesita sólo una pequeña actividad de esta enzima para vivir en condiciones normales durante la edad adulta, y adicionalmente, se ha señalado que una actividad de SOD al 50% es suficiente para resistir el EOX, al menos en *D. melanogaster*.¹⁵²

Asimismo, en centenarios se ha encontrado una correlación negativa entre la edad y la actividad de SOD sugiriendo que su sistema antioxidante está mejor adaptado que en los individuos que envejecen normalmente,¹⁰⁵ por lo que no necesariamente la disminución en la actividad de SOD relacionada con la edad en este grupo de edad indica mayor EOX.

Por otro lado, en este estudio se ha observado una disminución en AT y GAP. Al respecto, se ha señalado que ésta disminución se debe a que la capacidad del organismo para absorber las vitaminas antioxidantes se ve disminuida, no obstante en la población de estudio se observa que la disminución de AT y GAP con respecto a la edad sólo se presenta en los grupos de mujeres a

partir de los 45 años pero no en los grupos de hombres, sugiriendo que esta disminución en la eficiencia del sistema antioxidante puede deberse a la disminución de los niveles de estrógenos a causa de la menopausia y no a una deficiencia en la absorción de vitaminas.¹⁵³

Recientemente se ha descubierto que las células son capaces de regular y expresar el grueso de sus fuentes de protección antioxidante en respuesta ante el estrés oxidativo como un proceso adaptativo en el que un gran número de genes sufren modificaciones en su expresión.

Adicionalmente, se ha observado que la actividad y función de diversos compuestos y moléculas antioxidantes está regulado por sus sustratos, que pueden directa o indirectamente provocar la sobre expresión o por el contrario disminuir la expresión de ciertos genes. De hecho también se ha mencionado que existen algunos genes relacionados con la actividad antioxidante que pueden activarse muy temprano en el proceso de adaptación o por el contrario en estadios tardíos de dicho proceso lo que puede limitar la resistencia ante el EOx.⁶⁴⁻⁶⁷ En este sentido se ha hecho énfasis en la diferencia de la eficiencia de la respuesta antioxidante con respecto al sexo.

En algunos estudios se han demostrado diferencias en el daño oxidativo y la eficiencia del sistema antioxidante con respecto al sexo, y que los niveles de LPO se encuentran significativamente más altos en hombres con respecto a las mujeres.^{134,155,156} No obstante en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la concentración de LPO entre hombres y mujeres del mismo grupo de edad, lo que concuerda con lo reportado Özbay et al. (2002).¹⁵⁷ Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en el daño oxidativo al ADN, ya que las mujeres de 45 a 64 años mostraron un porcentaje de células sin daño mayor que los hombres del mismo grupo de edad.

Por otro lado, los resultados muestran diferencias significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes con respecto al sexo: La actividad de SOD es mayor en las mujeres de 25 a

64 años en comparación con los hombres de la misma edad, así mismo, la actividad de GPx está significativamente incrementada en mujeres de 65 años y más en comparación con los hombres del mismo grupo de edad. Estos datos coinciden con lo reportado por otros autores, sugiriendo que el sistema antioxidante enzimático es más eficiente en las mujeres.^{114, 158}

Al respecto, se ha señalado que los estrógenos participan en la protección contra el daño oxidativo provocado por las EROs en las mujeres, el mecanismo propuesto sugiere que la respuesta antioxidante se inicia cuando el estradiol se une a su receptor celular, activando la vía de las MAP cinasas que a su vez activan el factor NF-κB que estimula la expresión de los genes de SOD y GPX al unirse a los promotores de estas enzimas.¹⁵⁸ También se ha observado que en tejidos como cerebro, corazón y pulmón, las hembras de algunos modelos animales, expresan una mayor actividad de sus enzimas antioxidantes en comparación con los machos, lo que podría explicar por qué en los humanos las mujeres son más longevas, debido probablemente a una mayor resistencia al EOx.^{146,147}

Algunos autores sugieren que en las mitocondrias de mujeres se produce sólo la mitad de peróxido de hidrógeno que en las mitocondrias de los hombres y que esto obviamente debe representar menos daño oxidativo a macromoléculas, del mismo modo que han encontrado que en los hombres la actividad de las enzimas antioxidantes se encuentra sensiblemente disminuida en comparación con las mujeres, por lo que sugieren que de acuerdo a estos hallazgos las mujeres son biológicamente más jóvenes que los hombres a la misma edad cronológica y pueden estar mejor adaptadas y por lo tanto ser más resistentes al estrés oxidativo.¹⁵⁸

Por otra parte, los resultados muestran que en la población general conforme se incrementan los LPO hay una disminución de la actividad eritrocitaria de SOD y un incremento en GAP. Asimismo, en los grupos de mujeres de 25 a 44 y de 45 a 64 años se encontró que los LPO se asocian positivamente con AT y GAP; estos hallazgos son congruentes con lo reportado por otros autores,^{90,111} apoyando la hipótesis de que un incremento en los LPO no necesariamente está relacionado con la disminución en la eficiencia del sistema antioxidante.

Se ha propuesto que todos los sistemas biológicos que están constantemente expuestos a una gran variedad de agentes estresantes que incluyen la radiación, cambios de temperatura, infección y compuestos tóxicos generados endógenamente y exógenamente cuyo efecto puede ser

potenciado por el oxígeno y las EROs, desarrollan muchas respuestas; algunas de ellas inmediatas con efecto breve, y otras se adquieren lentamente pero tienen un efecto permanente, y que pueden por un lado, estimular el mantenimiento y la reparación o, por otro lado, pueden inhibir el mantenimiento y la defensa del organismo en función de la dosis y del tiempo que se es sometido al estímulo. Dicho fenómeno se conoce con el nombre de hórmesis.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

Casi cualquier estímulo puede tener un efecto hormético.¹⁶⁰ En la actualidad se ha observado que las EROs presentan este efecto e incluso se ha considerado que la longevidad depende de la eficiencia de los organismos para adaptarse a un ambiente oxidativo.

Esta eficiencia se refiere a la manera en que los organismos son capaces de adaptarse a un medio aeróbico en el cual el efecto de las EROs potencialmente dañinas se modifica hasta convertirlas en moléculas con funciones útiles como mensajeros celulares que intervienen en los sistemas de transducción de señales para inducir la expresión de genes moduladores de la actividad antioxidante en función del equilibrio redox del organismo.^{42,43,159}

El organismo de manera natural provee una amplia protección contra la incesante generación de EROs y el subsecuente daño que ocasionan, ya que mantiene a los elementos de defensa en sitios estratégicos a lo largo de todo el sistema biológico, tal como la mitocondria, el núcleo, los microsomas, el citosol, las membranas y aun los compartimentos extracelulares. Sin embargo, se cree que para estimular la respuesta de estos sistemas de protección es necesaria la exposición ante las EROs en forma gradual.¹⁵⁹

Se han realizado múltiples investigaciones sometiendo células y modelos animales a diferentes estímulos. En un estudio realizado *in vitro* se observó que cuando las células reciben pre tratamiento con dosis muy bajas de un oxidante en diferentes ocasiones antes de ser expuestas al mismo oxidante en condiciones letales, son capaces de sobrevivir y de combatir el estímulo de una manera más efectiva que las células que nunca recibieron un estímulo previo.¹⁶²

Existen otros estudios en los que se ha observado que se puede inducir una respuesta adaptativa de las células con bajas dosis de un agente genotóxico o radiación UV estimulando la protección contra dosis letales subsecuentes en varios sistemas biológicos. La propuesta es que se inducen mecanismos de transducción que aumentan la velocidad de reparación de las biomoléculas, principalmente el ADN, se incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx) para remover más rápidamente las EROs y reducir el daño celular.^{45,163, 164}

Se ha reportado que algunos de los hábitos que forman parte de nuestro estilo de vida pueden modificar positivamente la resistencia del organismo ante el EOx si se sigue el principio de hormesis y se proporciona el estímulo en bajas dosis.¹⁶²

Así, en algunos estudios se ha formulado la hipótesis que sugiere que la ingesta moderada de medicamentos, suplementos vitamínicos, alcohol y cafeína, el consumo moderado de cigarro, el ejercicio periódico, las horas de sueño, la exposición gradual a radiación UV y contaminantes ambientales e incluso el estrés psicológico, al ser factores que pueden presentar un efecto hormético, pueden disminuir el daño o incrementar la capacidad de reparación de las biomoléculas e incrementar la actividad de las enzimas antioxidantes, aunque los mecanismos bioquímicos por los cuales realizan su efecto sean variables de un estímulo a otro.^{115,161,165,166}

Debemos recordar que los individuos que han participado en este estudio son sujetos sanos, que residen en la ciudad de México, por lo que están expuestos constantemente a la radiación solar y otros contaminantes ambientales, realizan ejercicio físico moderadamente, consumen tabaco e ingieren bebidas alcohólicas en cantidad moderada, lo que sugiere que están expuestos constantemente a las EROs producidas como consecuencia de estos y otros factores endógenos que permiten estimular gradualmente su sistema antioxidante y su capacidad de reparación favoreciendo así la adaptación, razón por la cual mantienen el EOx en condiciones fisiológicas aceptables.

Además por la condición de su sistema antioxidante, podemos observar que en las mujeres se presenta en forma más temprana esta adaptación y mucho mejor, de lo que ocurre en los varones, estas variaciones se deben, como lo han mencionado otros autores, a la interacción de los factores genéticos, ambientales y estocásticos que explican porqué si todos los individuos del estudio son sanos, y están expuestos prácticamente al mismo tipo de estímulos pueden mostrar diferentes grados de adaptabilidad.¹⁶⁶

Finalmente podemos resaltar que el envejecimiento *per se* no incrementa el EOx y el daño al ADN en los individuos sanos que residen en la ciudad de México, lo cual podría estar vinculado a un mecanismo de adaptación o resistencia ante el EOx similar al proceso de hormesis desarrollado en respuesta ante la constante exposición a la contaminación ambiental, al estrés psicológico y a otros factores pro-oxidantes que forman parte del estilo de vida, que puede estar favorecido por un incremento en la eficiencia del sistema antioxidante.

Es importante señalar que el diseño de la investigación es de tipo trasversal, además de que el número de sujetos no es representativo y la selección de la muestra no fue probabilística, lo cual constituye una limitante del estudio, de ahí que para confirmar nuestros hallazgos será necesario llevar a cabo estudios de cohorte con muestras representativas.

XI. CONCLUSIONES

Hipótesis

Acorde con las evidencias científicas respecto a que el envejecimiento es un proceso fisiológico adaptativo, suponemos que los adultos sanos de 25 a 85 años de edad no presentarán diferencias estadísticamente significativas en los parámetros y grados de EOx conforme avanza la edad.

Conclusión

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros de EOx en nuestro estudio conforme aumenta la edad. Sugiriendo que los individuos sanos de la ciudad de México, al estar expuestos gradualmente a dosis constantes de contaminación ambiental, estrés psicológico y otros factores pro-oxidantes, como lo sugiere el fenómeno de hórmesis, favorecen el desarrollo de mecanismos de adaptación que incrementan la eficiencia del sistema antioxidante y las enzimas que participan en la reparación de las lesiones oxidativas. Por lo tanto, el envejecimiento *per se* no incrementa el EOx.

Hipótesis

Considerando que el envejecimiento es un proceso gradual y adaptativo, suponemos que los adultos sanos de 25 a 85 años de edad no presentarán diferencias estadísticamente significativas en el daño y capacidad de reparación del ADN conforme avanza la edad.

Conclusión

Nuestros hallazgos sugieren que el envejecimiento *per se* no se acompaña de un incremento en el daño oxidativo en el ADN, e incluso se puede cursar con menor daño al ADN conforme aumenta la edad como consecuencia de un proceso adaptativo similar al de hórmesis.

Hipótesis

Considerando que el envejecimiento es un proceso gradual y adaptativo, suponemos que los adultos sanos de 25 a 85 años de edad no presentarán diferencias estadísticamente significativas en la actividad de los componentes enzimáticos y exógenos que forman parte del sistema de defensa antioxidante conforme avanza la edad.

Conclusión

No se presentaron diferencias significativas en los marcadores de la eficiencia del sistema antioxidante con respecto a la edad, por lo que el envejecimiento *per se* no está acompañado de una disminución en la eficiencia del sistema antioxidante, por el contrario, se ve favorecido un proceso de adaptación.

Hipótesis

Tomando en cuenta que el sistema antioxidante es fundamental para evitar el EOX durante el envejecimiento saludable, suponemos que la eficiencia del sistema antioxidante estará asociada al daño oxidativo y capacidad de reparación del ADN, independientemente de la edad y género.

Conclusión

La actividad de los marcadores del sistema antioxidante muestran relación con respecto al daño oxidativo en biomoléculas, en función de la edad y sugieren que el proceso de adaptación es más eficiente en las mujeres que en los hombres.

XII. PERSPECTIVAS

- Es recomendable continuar con esta línea de investigación, diseñando estudios de tipo longitudinal con muestras de población representativas que permitan la evaluar los marcadores de EOx de manera más amplia, considerando algunos marcadores del daño oxidativo a proteínas, mitocondrias y lípidos, con el fin confirmar nuestros hallazgos.
- Por otro lado, es importante explorar los factores que favorecen este fenómeno adaptativo similar al de hórmesis en diferentes poblaciones y zonas geográficas, considerando la influencia de sexo y algunas otras características constitucionales, tales como el índice de masa corporal y estilos de vida como el ejercicio físico y restricción calórica.
- Adicionalmente, sería de gran utilidad, llevar a cabo estudios de cohorte, con el fin de determinar los factores vinculados con el estrés oxidativo que incrementan la prevalencia e incidencia de las enfermedades crónicas en la vejez y sus complicaciones.

XIII. REFERENCIAS

1. Semsei I. On the nature of aging. *Mech Ageing Dev.* 2000; 117: 93-108.
2. Sánchez-Rodríguez M, Mendoza-Núñez VM. Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2003. p.5-87.
3. Seeman TE, Singer BH, Riff CD, Love GD, Levy-storms L. Social relationships, gender, and allostatic load across two age cohorts. *Psychosom Med.* 2002; 64: 395-406.
4. Mc Ewen BS. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging.* 2002; 23: 921-939.
5. Karlamangla AS, Singer BH, Mc Ewen BS, Rowe JW, Seeman TE. Allostatic load as a predictor of functional decline Mac Arthur studies of successful aging. *J Clin Epidemiol.* 2002; 55: 696-710.
6. Mendoza-Núñez VM, Correa-Muñoz E, Sánchez-Rodríguez M, Retana-Ugalde R. Modelo de atención comunitaria de núcleos Gerontológico. *Geriatrka.* 1996; 12: 447-453.
7. Strehler B, North D. Cell-type specific codon usage and differentiation. *Mech Ageing Dev.* 1982; 18: 285-313.
8. Rowe JW, Kahn RL. Human aging: usual and Successful. *Science.* 1987; 237: 143-149.
9. Rowe J, Kahn RL. Successful aging. *Gerontologist.* 1997; 37: 433-440.
10. Secretaria de Desarrollo Social. Ley de los derechos de las personas adultas mayores. México: Diario oficial 2002 jun 25; sección 1: 43-59.
11. United Nations. Population ageing 2002. Division departament of economic and Social Affairs. United Nations 2002. Available from: <http://www.un.org/esa/population/publication>.
12. Partida BV. Monto y estructura de la población en el año 2000 y perspectivas en el 2050. *Demos. Carta demográfica sobre México* 2001; 1: 6-7.

-
-
13. Negrete SME. Distribución geográfica de la población mayor. *Demos. Carta demográfica sobre México* 2001; 1: 18-20.
 14. Secretaría de Salud. Causas de mortalidad general. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx>.
 15. Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, et al. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México: INSP, 2003: 106-114.
 16. knight JA. The process and theories of aging. *Ann Clin Lab Sci.* 1995; 25: 1-12.
 17. Martínez-Arronte F. *Tópicos de Gerontología.* México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 1998.
 18. Merry BJ. Biological mechanisms of ageing. *Eye.* 1987; 1: 163-170.
 19. Weinert BT, Timiras PS. Theories of aging. *J Appl Physiol.* 2003; 95: 1706-1716.
 20. Troen BR. The Biology of aging. *Mount Sinai J Med.* 2003; 70: 3-22.
 21. Gavrilov LA, Gavrilova NS. Evolutionary theories of aging and longevity. *Sci World J.* 2002; 2: 339-356.
 22. Gutteridge JMC. Free radicals and aging. *Rev Clin Gerontol.* 1994; 4: 279-288.
 23. Browner WS, Kahn AJ, Ziv E, Reiner AP, Oshima J, Cawthon RM, Hsueh WC, Cummings SR. The genetics of human longevity. *Am J Med.* 2004; 117: 851-860.
 24. Warner HR. Longevity genes: from primitive organisms to humans. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126: 235-242.
 25. Malavolta M, Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C. New Trends in Biomedical aging research. *Gerontol.* 2004; 50: 420-424.
 26. Shin JS, Hong A, Solomon MJ, Lee CS. The role of telomeres and telomerase in the pathology of cancer and aging. *Pathol.* 2006; 38: 103-113.
 27. Mc Lean AJ, Le Couteur DG. Aging biology and geriatric clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 163-184.
 28. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res.* 1992; 275: 257-266.
 29. Martin I, Grotewiel MS. Oxidative damage and age-related functional declines. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127: 411-423.
 30. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78: 7124-7128.

-
-
31. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: An appraisal of oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 575-586.
 32. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* 2004; 125: 811-826.
 33. González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica.* 2000; 25: 3-9.
 34. Pacifici RE, Davies KJA. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress. The free-radical theory of aging revisited. *Gerontol.* 1991; 37: 166-180.
 35. Mc Cord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 108: 652-659.
 36. Rodríguez-Perón JM, Menéndez-López JR, Trujillo-López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 2001; 30: 36-44.
 37. Halliwell B, Gutteridge MC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?. *J Lab Clin Med.* 1992; 119: 598-619.
 38. knight JA. Free radicals: Their presence in biological systems. En: Knight JA. Free radicals, antioxidants, aging and disease. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry Press; 1999. p. 21-43.
 39. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 7915-7922.
 40. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29: 222-230.
 41. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552.2: 35-344.
 42. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: L1005-L1028.
 43. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.
 44. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408: 239-247.
 45. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Comm.* 2005; 336: 1-9.

-
-
46. Arshag D, Mooradian NCWW. Molecular biology of aging part II: A synopsis of current research. *JAGS*. 1991; 39: 717-723.
 47. Kowaltowski A, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26: 463-471.
 48. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Rep*. 2006; 5: 145-152.
 49. Wallace SS. Biological consequences of free radical damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33: 1-14.
 50. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004; 567: 1-61.
 51. Bohr Va. DNA damage and its processing. Relation to human disease. *J Inherit Metab Dis*. 2002; 25:215-222.
 52. Martínez GR, Loureiro APM, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LF, Onuki J, Almeida EA, Garcia CCM, Barbosa LF, Medeiros MHG, Di Mascio P. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res*. 2003; 544: 115-127.
 53. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003; 17: 1195-1214.
 54. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 361-370.
 55. Dizdaroglu M. Mechanisms of oxidative DNA damage; lesions and their measurement. En: Dizdaroglu M, Karakaya AE [Eds.] *Advances in DNA damage and repair*. New York: Kluwer Academia/Plenum Publishers; 1999. p.67-87.
 56. Dronkert MLG, Kanaar R. Repair of DNA cross-links. *Mutat Res*. 2001; 486: 217-247.
 57. Céspedes CT, Sánchez SD. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol*. 2000; 14: 55-60.
 58. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 176-186.
 59. Niki E. Action of antioxidants against oxidative stress. En: Dizdaroglu M, Karakaya AE [Eds.]. *Advances in DNA damage and repair*. New York: Kluwer Academia/Plenum Publishers. 1999. p.313-318.

-
-
60. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17: 235-248.
 61. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32 (8): 595-603.
 62. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, Cerutti P. The balance between Cu,Zn-Superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochem.* 1991; 30: 9305-9313.
 63. Amstad P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J Biol Chem.* 1994; 269: 1606-1609.
 64. Peterson CL, Coté J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes and Develop.* 2004; 18: 602-616.
 65. Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacements systems. *IUBMB Life.* 2000; 50: 279-289.
 66. Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions (Abstract). *Biochem. (Mosc)* 2007; 72:132-145.
 67. Valco M, Leibfritz D, Moncol J, Conin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases (Abstract). *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
 68. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology-terminology and critical thinking. *FEBS Lett.* 2004; 558: 3-6.
 69. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006; 52: 601-623.
 70. Karakaya AE, Sardas S, Burgaz S. Application to occupational exposure as biomarkers. En: Dizdaroglu M, Karakaya AE [Eds.]. *Advances in DNA damage and repair.* New York: Kluwer Academia/Plenum Publishers. 1999. p.181-191.
 71. de Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 202-226.

-
-
72. Mc Call MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1034-1053.
 73. Wu LL, Chiou C-C, Chang P-Y, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004; 339: 1-9.
 74. Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res.* 2005; 574: 58-66.
 75. Singh NS. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res.* 2000; 455: 111-127.
 76. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35: 206-221.
 77. Collins AR, Horvathová E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Transac.* 2001; 29: 337-341.
 78. Gedik CM, Boyle SP, Wood SG, Vaughan NJ, Collins AR. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogen.* 2002; 23: 1441-1446.
 79. de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet.* 1996; 5:283-292.
 80. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 1173-1181.
 81. Malliaraki N, Mpliamplias D, Kampa M, Perakis K, Margioris A, Castanas E. Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. *BMC Nephrol.* 2003; 4: 1-6.
 82. Miller NJ. Non vitamin plasma antioxidants. En: Armstrong D, [Ed.] *Methods in Molecular Biology.* New Jersey: Humana Press, 1998. p. 285-297.
 83. Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *British Med Bull.* 1993; 49:653-667.
-
-

-
-
84. Barja G. Free radicals and aging. *TRENDS Neurosci.* 2004; 27: 595-600.
 85. Sastre J, Pallardo FV, Viña J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35: 1-8.
 86. Hulbert AJ. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol.* 2005; 234: 277-288.
 87. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection, and aging. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1362: 116-127.
 88. Gil F, Fariñas F, Casado A, López-Fernández E. Malondialdehyde: A possible marker of ageing. *Gerontology.* 2002; 48:209-214.
 89. Mutlu-Turkoglu U, Ilhan E, Oztezcan S, Kuru A, Aykac-Toker G, Uysal M. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Chem.* 2003; 36: 397-400
 90. Rea IM, Mc Master D, Donnelly J, Mc Grath LT, Young IS. Malondialdehyde and measures of antioxidant activity in subjects from the Belfast elderly longitudinal free-living aging study. *Ann NY Acad Sci.* 2004; 1019: 392-395.
 91. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 4533-4537.
 92. Hamilton ML, Van Rammen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98: 10469-10474.
 93. Cabelof DC, Raffoul JJ, Ge Y, Van Remmen H, Matherly LH, Heydari AR. Age-related loss of the DNA repair response following exposure to oxidative stress. *J Gerontol.* 2006; 61A: 427-434.
 94. King CM, Bristow-Craig HE, Gillespie Esm, Barnett YA: In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA capacity in cultured lymphocytes from healthy 75- to 80-year-old humans. *Mutat Res.* 1997; 377: 137-147.
 95. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res.* 1994; 307: 323-333.

-
-
96. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol. Med* 2002; 32: 804-812.
 97. Hazane F, Sauvaigo S, Douki T, Favier A, Beani JC. Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation. *J Photochem Photobiol. B* 2006; 82: 214-22.
 98. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res.* 1990; 237: 123-130.
 99. Collins AR, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, et. al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25 : 373-377.
 100. Andreasi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 2003; 543: 67-86.
 101. Collins A, Harrington V. Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis.* 2002; 17: 489-493.
 102. Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 192-200.
 103. Aejmelaeus RT, Holm P, Kaukinen U, Metsa-Ketela TJA, Laippala P, Hervonen ALJ, Alho HER. Age-related changes in the peroxy radical scavenging capacity of human plasma. *Free Rad Biol Med.* 1997; 23: 69-75.
 104. Adachi T, Wang J, Wang XL. Age-related change of plasma extracellular-superoxide dismutase. *Clin Chim Acta.* 2000; 290: 169-178.
 105. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: A study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 1243-1248.
 106. Cristiano F, de Haan JB, Rocco CI, Kola I. Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage. *Mech Ageing Dev.* 1995; 80: 93-105.

-
-
107. Nelson JL, Berstein PS, Smidth MC, Von Tress Ms, Askew EW. Dietary modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels, and markers of oxidative stress in older humans. *J Nutr.* 2003; 133: 3117-3123.
108. Moller P, Vogel U, Pedersen A, Dragsted LO, Sandstrom B, Loft S. No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12: 1016-1022.
109. Sánchez-Rodríguez MA, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica.* 2004; 29: 81-90
110. Beristain-Pérez AS, Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Mendoza-Núñez VM. ¿Cómo evaluar la eficiencia del sistema antioxidante en el estrés oxidativo? Propuesta de un constructo. *Arch Geriat.* 2003; 6: 100-104.
111. Mendoza-Núñez VM, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Vargas-Guadarrama LA, Altamirano-Lozano MA: Total antioxidant levels, gender, and age as risk factors for DNA damage in lymphocytes of elderly. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122: 835-847.
112. Weidner MS. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta.* 2004; 347: 15-24.
113. Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA. Oxidative stress induced by environmental tobacco smoke in the workplace is mitigated by antioxidant supplementation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7: 981-988.
114. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem.* 1997; 43: 562-568.
115. Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: Oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontol.* 2005; 6: 71-75.
116. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.* 2003; 27: 277-284.

-
-
117. Retana-Ugalde R, Altamirano-Lozano M, Mendoza-Núñez VM. Is there a similarity between DNA damage in adults with chronic alcoholism and community-dwelling healthy older adults?. *Alcohol Alcohol*. 2007; 42: 64-69.
118. Barclay L. Light to moderate alcohol intake linked to lower CVD mortality in hypertensive men. *Arch Intern Med*. 2004; 164: 623-628.
119. Javanovic SV, Simic MG, Antioxidant in nutrition. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 899: 326-334.
120. Beltowski J, Wojcicka G, Gorny D, Marciniak A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol*. 2000; 51: 883-896.
121. Kazimirova A, Barancokova M, Volkovova K, Staruchova M, Krajcovicova-Kudlackova M, Wsolova L. Does a vegetarian diet influence genomic stability?. *Eur J Nutr* 2004; 43: 32-38.
122. Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH. Comparative study of PM2.5-and PM10-induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci*. 2004; 5: 11-18.
123. Rattan SIS, Clark BFC. Understanding and modulating ageing. *IUBMB Life* 2005; 57: 297-304.
124. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM, García-Sánchez A, González-González B, Rodríguez-Torres E, González-Obregón A. Valores de referencia de población selecta y adulta de la ciudad de México. *Parámetros bioquímicos y hematológicos*. *Acta Bioquím. Clin L*. 1998; 32: 397-405.
125. Jenttusch A, Bachmann H, Fürst P, Bielsaski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 251-256.
126. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrell CH, Schneider EL. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res*. 1991; 256: 1-6.
127. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmerzer 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.

-
-
128. Miller N. Non vitaminic plasma antioxidants. In: Armstrong D, Ed. *Methods in molecular Biology. Free radical and antioxidant protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 285-297.
129. Secretaría de Salud. Norma oficial mexicana NOM-174-SSA1-1998, para el manejo integral de la obesidad. México DF: Diario Oficial de la Federación; 2000.
130. Secretaría de Salud. Norma oficial mexicana NOM-030-SSA2-1999, para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial. México DF: Diario Oficial de la Federación; 2000.
131. Lane N. A unifying view of ageing and disease: the double agent theory. *J Theor Biol*. 2003; 225: 531-540.
132. Rattan SIS. Aging, antiaging, and hormesis. *Mech Ageing Dev*. 2004; 125: 285-289.
133. Mendoza-Núñez VM, Ruiz-Ramos M, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Muñoz-Sánchez JL. Aging-related oxidative stress in healthy humans. *Tohoku J Exp Med*. 2007; 213: 261-268.
134. Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res*. 2006; 40: 495-505.
135. Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension*. 2003; 41: 1096-1101.
136. Holliday R. Somatic mutations and ageing. *Mutat Res*. 2000; 463: 173-178.
137. Medina-Navarro R, Lifshitz A, Wachter N, Hicks JJ. Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. *Arch Med Res*. 1997; 28: 205-208.
138. Gilchrest BA, Bohr VA. Aging processes, DNA damage, and repair. *FASEB J*. 1997; 11: 322-330.
139. Tian L, Cai Q, Wei H. Alteration of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24: 1477-1484.

-
-
140. Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Ruíz-Ramos M, Muñoz-Sánchez JL, Vargas-Guadarrama LA, Mendoza-Núñez VM. Efficient antioxidant capacity against lipid peroxide levels in healthy elderly of Mexico City. *Environ Res.* 2005; 97: 322-329.
141. León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm.* 1998; 7: 289-294.
142. Öztürk O, Gümüşlü S. Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress. *Life Sci.* 2004; 75: 1551–1565.
143. Walter MF, Jacob RF, Jeffers B, Ghadanfar MM, Preston GM, Buch J, Mason RP. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44: 1996-2002.
144. Mecocci P, Fanò G, Fulle S, Mac Garvey U, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vecchiet J, Senin U, Beal F. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 303-308.
145. Greenberg MM. In vitro and in vivo effects of oxidative damage to deoxyguanosine. *Biochem Soc Transact.* 2004; 32: 46-50.
146. Al-Baker EA, Oshin M, Hutchison CJ, Kill IR. Analysis of UV-induced damage and repair in young and senescent human dermal fibroblasts using the comet assay. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126: 664-672.
147. Jones DP, Mody VC, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1290-1300.
148. Habif S, Mutaf I, Turgan N, Onur E, Duman C, Özmen D, Bayindir O. Age and gender dependent alterations in the activities of glutathione related enzymes in healthy subjects. *Clin Biochem.* 2001; 34: 667-661.

-
-
149. Bolzán AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: Influence of sex, age, and cigarette smoking. *Clin Biochem.* 1997; 30: 449-454.
150. Muchová J, Sustrová M, Garaiová I, Liptaková A, Blazicek P, Kvasnicka P, Pueschel S, Durackova Z. Influence of age on activities of antioxidant and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 499-508.
151. Inal ME, Kanbak G, Suanl E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta.* 2001; 305: 75-80.
152. Le Bourg E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* 2001; 498: 183-186.
153. Young HM, Cochrane B. Healthy aging for older women. *Nurs Clin N Am.* 2004; 39: 131-143.
154. Actis-Goretta L, Carrasquedo F, Fraga CG. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin Chim Acta.* 2004; 349: 97-103.
155. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol. Parte C* 2005; 140: 47-52.
156. Proteggente AR, England TG, Rehman A, Rice-Evans CA, Halliwell B. Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals. *Free Radic Res.* 2002; 36: 157-162.
157. Özbay B, Dülger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med.* 2002; 197: 119-124.
158. Viña J, Borras C, Gambini J, Sastre J, Pallardó F. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett.* 2005; 579: 2541-2545.
159. Yu BP. Hormesis and intervention of aging. *Geriat Gerontol Int.* 2004; 4(Suppl1): S81- S83.
-
-

-
-
160. Bukowski JA, Lewis J. Hormesis and health: A little of what you fancy may be good for you. *South Med J.* 2000; 93: 371-374.
161. Voorhies WV. Hormesis and aging. *Hum Exp Toxicol.* 2001; 20: 315-317.
162. Miura Y. Oxidative stress, radiation-adaptative responses, and aging. *J Radiat Res.* 2004; 45: 357-372.
163. Feinendegen LE. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol.* 2005; 78: 3-7.
164. Rattan SIS, Gonzalez-Dosal R, Nielsen ER, Kraft DC, Weibel J, Kahns S. Slowing down aging from within: mechanistic aspects of anti-aging hormetic effects of mild heat stress on human cells. *Acta Biochim Pol.* 2004; 51: 481-492.
165. Meewes C, Brenneisen P, Wenk J, Kuhr L, Ma W, Alikoski J. Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 238-247.
166. Kirwood TBL, Feder M, Finch CE, Franceschi C, Globerson A, Klingenberg CP, et al. What accounts for the wide variation in life span of genetically identical organisms reared in a constant environment? *Mech Ageing Dev.* 2005; 126: 439-443.

XIV. ANEXOS

ANEXO XIV.1
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

México, D. F. a de de 200 .

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado “Influencia del envejecimiento sobre la eficiencia del sistema antioxidante, daño oxidativo y capacidad de reparación del ADN en sujetos sanos de la ciudad de México”.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

- Permitir que por medio de una punción venosa se me tome una muestra de sangre, con la cual se van a determinar las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, urea, creatinina, albúmina, colesterol-HDL y biometría hemática. Asimismo, la muestra sanguínea servirá para los fines que el investigador requiera.
- Entregar una muestra de orina en las condiciones que sean requeridas por el investigador el día que me sea tomada la muestra de sangre.
- Permitir que se me tomen el peso, la altura, la tensión arterial, se mida el diámetro de mi cintura y mi cadera. Además acepto participar en una entrevista que me realizaran para conocer información fundamental sobre mis hábitos alimenticios, y otros hábitos que han formado parte de mi estilo de vida.

Declaro que se me ha informado que las molestias derivadas de mi participación en el estudio serían mínimas ya que solo se requiere una muestra de sangre y que el beneficio que yo obtendré de mi participación es que recibiré un reporte por escrito de los resultados de la química sanguínea, biometría hemática y examen general de orina, otorgado por la Unidad de Investigación en Gerontología.

El Investigador me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que se deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Nombre y Firma del participante

Nombre y Firma del Testigo

Nombre y Firma del Investigador

ANEXO XIV. 2
CUESTIONARIO DE FACTORES DE RIESGO PRO-OXIDANTES



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES *ZARAGOZA*
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

Cuestionario de factores pro-oxidantes

I. INFORMACIÓN GENERAL

Nombre(s) _____ Apellido Paterno _____ Apellido Materno _____

1. Fecha de nacimiento: _____ Edad: _____

2. Sexo: M F 3. Lugar de nacimiento: _____

4. Estado civil: _____ 5. Religión: _____

6. Lugar de residencia en los últimos 5 años:
Urbano Suburbano Rural Cd. de México
Especifique lugar: _____

¿Desde hace cuanto tiempo vive ahí? _____ años.

7. Escolaridad

- Ninguna Otros _____
Especificar

- Sabe leer y escribir

- Primaria completa o incompleta

- Secundaria completa o incompleta

- Bachillerato completo o incompleto

- Carrera técnica completa o incompleta

- Estudios de licenciatura incompletos

- Estudios de licenciatura completos

8. Ocupación (es) anterior (es): _____
Por más de 5 años

9. Ocupación (es) actual (es): _____
Por más de 2 años

10. ¿Con quién vive?

- Solo

- Esposo (a)

- Hijo (a) (s)

- Nieto (a) (s)

- Otros familiares. Especifique: _____

- Amigos

- Otros. Especifique: _____

11. ¿Con cuántas personas vive?: _____

II. ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS

12. Fuentes de ingreso económico:

- Aún trabaja
- Apoyo del esposo (a)
- Pensión de jubilación
- Pensión de invalidez
- Pensión de viudez
- Apoyo familiar
- Otros

13. Ingreso económico mensual: \$ _____

III. ASPECTOS DE SALUD

14. ¿Tiene alguna enfermedad actualmente? SI NO

Si su respuesta es NO, pase a la pregunta 16.

15. Si su respuesta fue SI, ¿Qué enfermedad (es) tiene?

- Diabetes mellitus
- Hipertensión arterial
- Cardiopatía
- Trastornos articulares
- Otros. Especifique: _____

16. ¿Toma algún medicamento? (Considerar laxantes, antiácidos, vitamínicos específicos, homeopáticos y herbolaria).

Medicamento	Indicado para:	Dosis	Indicado por:	Tiempo de administración

IV. HÁBITOS Y EJERCICIO

17. ¿Ha fumado? SI NO

	Actualmente	En el pasado
Número de cigarrillos		
Tiempo de consumo		
Fumador pasivo		

18. Si ya no fuma, ¿Hace cuanto tiempo dejó de fumar? _____ años.

19. Ingesta de bebidas con cafeína: SI NO

	Actualmente		En el pasado	
	Tazas o vasos al día	Años de consumo	Tazas o vasos al día	Años de consumo
Café de grano				
Café soluble				
Café descafeinado				
Té negro				
Otros té. Especifique				
Refrescos de cola				

20. Ingesta de bebidas alcohólicas: SI NO

A) Frecuencia y cantidad de bebida. Anotar número de copas

	Actualmente	En el pasado
1 vez al mes o menos		
2 a 4 veces al mes		
2 a 4 veces por semana		
Diario		

B) Tipo de bebida

Tipo de bebida	Actualmente	En el pasado
Brandy		
Alcohol al 95%		
Ron		
Tequila		
Cerveza		
Pulque		
Vino tinto		
Vino blanco		
Otros: Especifique		

21. Ejercicio y actividades físicas.

Ejercicio	Actualmente			En el pasado		
	Días/semana	Horas/día	Años	Días/semana	Horas/día	Años
Caminar: Km()						
Correr: Km ()						
Gimnasia						
Yoga						
Natación						
Baile de salón						
Baile regional						
Otros. Especifique:						

22. Actividades en el hogar.

Actividad	Actualmente			En el pasado		
	Días/semana	Horas/día	Años	Días/semana	Horas/día	Años
Subir y bajar escalones () escalones						
Barrer						
Trapear						
Sacudir						
Tender camas						
Lavar trastos						
Tender ropa						
Cortar leña						
Podar pasto						
Acarrear agua						
Preparar alimentos						
Cuidar animales						
Ir de compras. Número de cuadras que camina ()						
Llevar y/o traer a los nietos de la escuela. Número de cuadras que camina ()						

23. ¿Cuántas horas duerme al día (día y noche) en el último año? _____

De día: _____ De noche: _____

OBSERVACIONES:

GRACIAS POR SU COOPERACIÓN:

Encuestador: _____

Supervisor: _____

Fecha de aplicación: _____(día/mes/año)



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES *ZARAGOZA*
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

**Cédula antropométrica y
Registro de Presión arterial**

Nombre: _____

Edad: _____ Género: _____ Fecha de evaluación: _____

Fecha de nacimiento: _____

Antropometría

Medición	Resultado
Peso	Kg
Talla	m
Circunferencia de la cintura	cm
Circunferencia de la cadera (medida como la máxima de los glúteos)	cm
Talla máxima alcanzada durante la vida (por interrogatorio)	Kg/m ²
Índice de masa corporal (IMC)	
Índice cintura-cadera (ICC)	

Presión arterial

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

Realizado por: _____

Supervisado por: _____