

Bioquímica

Volumen
Volume **31**

Número
Number **1**

Enero-Marzo
January-March **2006**

Artículo:

Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertensión arterial en adultos mayores

Derechos reservados, Copyright © 2006:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertensión arterial en adultos mayores

Ada Saraí Beristain-Pérez,* Martha A. Sánchez-Rodríguez,* Mirna Ruiz-Ramos,* Víctor Manuel Mendoza-Núñez*

RESUMEN

Se ha reportado que el estrés oxidativo (EOx) es un factor de riesgo para el desarrollo de algunas enfermedades crónicas-degenerativas (ECD) durante la vejez; sin embargo, las evidencias científicas no son del todo concluyentes. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue determinar la influencia del EOX como factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (DM), osteoartritis (OA) o hipertensión arterial (HTA) en una población de adultos mayores (AM). Para tal efecto, se realizó un estudio transversal y comparativo en una muestra de 162 AM: 33 con DM, 40 con HTA, 26 con OA y 63 clínicamente sanos. Se determinaron los lipoperoxídos plasmáticos, el daño oxidativo al ADN, la actividad eritrocitaria de las enzimas antioxidantes SOD y GPx, la capacidad sérica antioxidante total, la razón SOD/GPx y la brecha de antioxidantes (GAP), como marcadores biológicos de EOX. Los datos fueron analizados a través de análisis de varianza, y el cálculo de razón de momios (RM). Los resultados mostraron que los AM con HTA o DM presentan mayor EOX, caracterizado por mayor daño oxidativo al ADN aunado a una menor actividad de la GPx, que los sujetos sanos o con OA, y que el EOX es un factor de riesgo para la presencia de enfermedad con una RM de 2.45 (IC_{95%} 1.11-5.40, p = 0.025). Nuestros hallazgos sugieren que el EOX constituye un factor de riesgo para enfermedades crónicas-degenerativas, especialmente para DM e HTA.

Palabras clave: Envejecimiento, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, osteoartritis, estrés oxidativo.

ABSTRACT

It has been reported that oxidative stress (OxS) is a risk factor for the development of some chronic-degenerative diseases (CDD) during aged; however the scientific evidences are not conclusive. The aim of this study was to determine the influence of the OxS as a risk factor for type 2 diabetes mellitus (DM), arterial hypertension (AH) or osteoarthritis (OA) in elderly. A cross-sectional and comparative study was carried out in 162 older people: 33 with DM, 40 with AH, 26 with OA and 63 healthy subjects. Plasma lipoperoxide levels, oxidative DNA damage, red blood cell SOD and GPx activities, total antioxidant status, SOD/GPx ratio and antioxidant gap (GAP), were determined like OxS biological markers. The data were analyzed through of variance analysis and odds ratio (OR). The results showed that the elderly with AH or DM had higher OxS, characterized by higher DNA oxidative damage linked to lower GPx activity, than healthy or OA subjects, and the OxS is a risk factor for CDD with an OR of 2.45 (CI_{95%} 1.11-5.40, p = 0.025). Our finds suggest that the OxS is a risk factor for CDD, mainly for DM and AH.

Key words: Ageing, type 2 diabetes mellitus, arterial hypertension, osteoarthritis, oxidative stress.

* Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F.

Correspondencia:

Ada Saraí Beristain-Pérez

Batalla 5 de mayo s/n, Esquina Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, 09230 México, DF., México. Fax: (+ 52)(55) 5773-6330,
e-mail: mendovic@servidor.unam.mx

Recibido: 10-10-2005

Aceptado: 13-03-2006

INTRODUCCIÓN

La influencia del estrés oxidativo (EOx) en el proceso de envejecimiento humano es tema de discusión en las investigaciones recientes. Originalmente, en la teoría de los radicales libres (RL) se propuso que la acumulación de daño oxidativo en las macromoléculas, propiciado por una inadecuada protección contra las especies reactivas de oxígeno (EROs) derivadas del metabolismo aeróbico, constituye el factor principal que da origen al envejecimiento e incrementa la vulnerabilidad para enfermedades crónico-degenerativas (ECD).¹⁻⁴ No obstante, a pesar del gran cúmulo de evidencias experimentales que sugieren que el EOX está relacionado con el envejecimiento y con más de 100 ECD,^{5,6} para los biogerontólogos ha sido un problema fundamental el poder discernir entre los eventos que causan el envejecimiento y los que son secundarios a este proceso; por lo cual la relación existente entre el EOX y las ECD de mayor prevalencia durante la vejez es controversial.

Al respecto, se ha demostrado que el malondialdehído (MDA), un producto derivado de la peroxidación lipídica, y el daño oxidativo al ADN se incrementan durante el envejecimiento.⁷⁻⁹ Adicionalmente, se ha demostrado que el aumento en el daño oxidativo a biomoléculas, la insuficiente capacidad de reparación de las lesiones producidas y la disminución en el nivel y actividad de enzimas y antioxidantes exógenos, son factores que contribuyen en la etiopatogenia de enfermedades como diabetes mellitus tipo 2 (DM) y sus complicaciones, hipertensión arterial (HTA), enfermedad cardiovascular (ECV), ateroesclerosis, cáncer, desórdenes neurodegenerativos, osteoartritis (OA), osteoporosis, enfermedades del sistema inmune e inflamación, entre otras.¹⁰⁻¹⁴

Por otro lado, hay investigadores que reportan que los niveles de MDA y el daño oxidativo al ADN no se incrementan con la edad, y aunque en diversas investigaciones se ha observado que la actividad de los antioxidantes enzimáticos y exógenos no se ve alterada con el envejecimiento, realmente el patrón de cambio en la actividad de estos antioxidantes no está definida, por lo que también se ha sugerido que el EOX se produce como consecuencia de las ECD, lo cual contribuye a las complicaciones de éstas, pero no como factor etiológico.^{15,16}

La divergencia en los resultados de estos trabajos probablemente se debe a que el análisis del proceso de EOX se realiza de manera parcial, es decir, se han determinado y analizado los resultados de los biomarcadores de EOX en forma aislada, sin integrar el efecto que pueden ejercer todos los elementos que están involucrados en el desequilibrio prooxidante-antioxidante. En consecuencia, se interpreta como EOX el incremento en la cantidad de biomoléculas oxidadas y/o la disminución en la actividad de los componentes antioxidantes enzimáticos y exógenos sin considerar que los niveles de los marcadores de daño oxidativo a biomoléculas no necesariamente se correlacionan con los cambios en los elementos que conforman el sistema antioxidante, por lo que se producen confusiones y problemas de interpretación teórica.¹⁶⁻¹⁸

Entre las ECD de mayor prevalencia durante la vejez, vinculadas con el EOX, se pueden resaltar la DM, la HTA y la OA; por tal motivo, la finalidad del presente estudio, fue determinar la influencia del EOX sobre dichas enfermedades en adultos mayores de la ciudad de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población y diseño de estudio

Se realizó un estudio observacional, prolectivo, transversal y comparativo en una muestra a conveniencia por cuotas de 162 adultos mayores de ambos sexos con una edad promedio de 67 ± 7 años; 33 con DM2, 40 con HTA, 26 con OA y 63 clínicamente sanos. Todos los sujetos eran funcionales física y mentalmente, sin ingesta de suplementos antioxidantes y residentes, en los últimos 5 años o más, de la ciudad de México. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la FES Zaragoza, UNAM.

Como mediciones iniciales se les realizó, a todos los sujetos, una historia clínica y exploración física para establecer su estado de salud, realizados por personal médico.

Muestras sanguíneas y preparación

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

Parámetros bioquímicos y hematológicos

Se tomó una alícuota de las muestras sanguíneas colectadas en el tubo con heparina, para la determina-

ción de la citometría hemática completa (hemoglobina, hematocrito y cuenta total de leucocitos). La hemoglobina se midió en forma manual por la reacción de cianometahemoglobina. Se determinó el hematocrito por el micrométodo y el conteo de leucocitos se realizó en una cámara de Newbauer.

El tubo sin anticoagulante se centrifugó a 3,000 rpm durante 7 min. para obtener el suero, en el cual se determinó la concentración de glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, albúmina, colesterol, triglicéridos y HDL, por métodos manuales empleando estuches comerciales de Randox Laboratories, Ltd. (Crumlin, Co. Antrim, RU). Las determinaciones se realizaron en un autoanalizador Eclipse (Merck, México).

Con fines de control de calidad se incluyó en cada corrida una muestra de suero de control comercial con valores altos y otra con valores en rango normal (Randox Laboratories, Ltd, Crumlin, Co. Antrim, RU) obteniéndose coeficientes de variación inter- e intra- ensayo inferiores al 7% en promedio para todas las determinaciones.

Los puntos de corte para los valores de referencia fueron obtenidos en el Laboratorio de Investigación Clínica Gerontológica de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Zaragoza en la ciudad de México.¹⁹

Biomarcadores de estrés oxidativo

- Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Se tomó una alícuota de 500 µL de sangre total del tubo con heparina, se centrifugó a 3,000 rpm durante 7 min., se separó el paquete eritrocitario y se obtuvo un hemolizado de eritrocitos que se diluyó posteriormente en amortiguador de fosfatos 0.01 mmol/L. La determinación de SOD se realizó empleando el estuche comercial RANSOD (Randox Laboratories, Ltd), que se basa en la inhibición de la formación de radicales superóxido derivados de xantina y xantinioxidasa por la SOD en una reacción colorimétrica. La cinética de la reacción fue seguida a 505 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, Columbia, MD, USA). El material de control utilizado es el proporcionado por la misma casa comercial con el cual se obtuvo un coeficiente de variación inter-ensayo de 3.8%. La actividad de SOD se expresó en U/g de hemoglobina y se consideraron como valores bajos aquellos que son ≤ 1.20 U/g de hemoglobina y como valores normales los que están por arriba de ese valor.

- Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

Se emplearon 50 µL de sangre total heparinizada diluidos con reactivo de Drabkin a doble concentración; se utilizó el estuche comercial RANSEL (Randox Laboratories Ltd) para determinar GPx por un método espectrofotométrico que emplea glutatión reductasa, usando hidroperóxido de cumeno como substrato y midiendo la absorción a 340 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, Columbia, MD, USA). Con fines de control de calidad se utilizó el material de control proporcionado por la misma casa comercial observándose un coeficiente de variación de 6%. Su actividad se expresó en U/g de hemoglobina; se consideraron como valores normales a aquéllos > 50 U/g de hemoglobina y como valores bajos a todos aquéllos iguales o menores a este valor.

- Capacidad plasmática antioxidante total (CPAT)

El tubo con heparina sódica se centrifugó a 3,000 rpm durante 7 min. para obtener plasma. Se emplearon 20 µL de plasma y el estuche comercial *Total Antioxidant Status* (Randox Laboratories Ltd). La presencia de antioxidantes en el plasma inhibe la formación del radical catión ABTS⁺, producto de la incubación de ABTS con peroxidasa y H₂O₂. La cinética de la reacción fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, Columbia, MD, USA). Se utilizó como material de control el proporcionado por la misma casa comercial. Con esta técnica se obtuvo un coeficiente de variación inter-ensayo del 4.3%. La CPAT se expresó en mmol/L, considerándose valores de CAT normales los > 0.90 mmol/L y valores de CPAT bajos los ≤ 0.90 mmol/L.

- Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)

La técnica se realizó acorde a Singh y cols. (1991).²⁰ Una muestra de sangre de 10 µL se mezcló con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión (al 0.5% en PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺), 75 µL de esta mezcla se colocaron en un portaobjetos esmerilado que contenía previamente una capa de 120 µL de agarosa regular (al 75% en PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺) solidificada a 4°C e inmediatamente se cubrió con un cubreobjetos. Se dejó solidificar la muestra a 4°C, se retiró el cubreobjetos para, posteriormente, adicionar 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión y dejar solidificar siguiendo el procedimiento anterior. Al retirar nuevamente el cubreobjetos de cada laminilla, éstas fueron sumergidas en una solución de lisis fría por lo menos 1 h (1% de

laurilsarcosianato de sodio, 2.5 M NaCl, 10 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl pH 10, 1% tritón y 10% DMSO). Posteriormente las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis que contenía solución amortiguadora fresca a pH 13 (1 mmol/L Na₂EDTA, 300 mmol/L NaOH) permitiendo que se desenrollara el ADN por 20 min., para efectuar la electroforesis por 20 min. más a 25V y 300 mA. Pasado este tiempo, las laminillas se lavaron en solución amortiguadora de neutralización 3 veces por 5 min. (0.4 mol/L Tris-HCl, pH 7.5). Se eliminó el exceso de neutralizador de las laminillas y se tiñeron con bromuro de etidio (20 µg/mL), se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron al microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Alemania) con un filtro de excitación de 515-560 nm, utilizando el aumento de 40X. Finalmente, con un ocular graduado se determinó la migración del ADN en 100 células por laminilla. Como criterio de evaluación se dividió el daño en cinco categorías, dependiendo de la longitud de la "cola" formada por la migración del ADN (diferencia entre la longitud de la "cola" y el diámetro del núcleo): sin daño < 5%; nivel bajo, 5 - 20%; nivel medio, 20 - 40%; nivel alto, 40 - 95%; daño total > 95%, de acuerdo a la propuesta de Anderson y cols. (1994).²¹ El punto de corte para decidir daño oxidativo fue la presencia de ≥ 6 células con migración y un alto grado de daño al ADN se estableció cuando la migración en la electroforesis fue > 40% con relación al diámetro nuclear.²¹

Lipoperóxidos

La técnica se realizó acorde a Jentzsch (1996)²³ empleando 400 µL de plasma heparinizado. En este método se mide el malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, acoplado a ácido tiobarbitúrico (TBA): una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de TBA para producir un aducto cromogénico rosa conocido como sustancias reactivas al TBA (del inglés TBA reactive substances, TBARS) que tiene un máximo de absorción a 532-535 nm. Durante la reacción se pueden incrementar los TBARS por auto-oxidación, por lo que agregando butiril-hidroxitolueno (BHT) se reduce la formación de lipoperóxidos *in vitro*.

En el procedimiento, la alícuota de plasma se colocó en un tubo de reacción en el que se adicionaron 50 µL de butiril-hidroxitolueno (BHT, 12.6 mmol/L) (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO. USA) y 400 µL de ácido orto-fosfórico (0.2 mol/L) (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO. USA); se mezcló durante 10 seg. en vor-

tex y posteriormente se adicionaron 50 µL de TBA (0.11 mol/L en NaOH 0.1 mol/L) (Fluka Chem., Buchs, Switzerland). Despues de agitación vigorosa en vortex, la mezcla de reacción se incubó a 90°C por 45 min. en un baño metabólico. Al concluir el tiempo, los tubos se colocaron en un baño de hielo para detener la reacción. Posteriormente las TBARS se obtuvieron después de adicionar 1.2 mL de n-butanol (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO. USA) en el tubo de reacción y centrifugar 2 min. a 5,000 rpm para obtener la fase alcohólica que se lee a 535 y 572 nm para restar la interferencia de los reactivos. El MDA en equivalentes TBARS se calculó empleando una curva de calibración por hidrólisis del 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO. USA) en concentraciones de 0.2-4 µmol/L. Se calcularon los equivalentes de MDA (TBARS) utilizando la diferencia de la absorción de las dos longitudes de onda y la cuantificación se realizó interpolando en la curva de calibración. El coeficiente de variación inter-ensayo para este método fue de 4.6% obtenido con los calibradores, pues no existe material de control para esta determinación. Se considera que los valores de lipoperóxidos (LPO) son normales cuando están por debajo de 0.320 µmol/L y elevados cuando son ≥ 0.320 µmol/L, siendo el 90 percentil de un grupo control de adultos jóvenes de un área rural.

• Cálculo de la razón SOD/GPx

Se obtuvo el cociente entre la actividad de SOD y GPx. Se consideró razón SOD/GPx normal si los valores eran < 0.022 y alta si los valores eran ≥ 0.022.

• Brecha antioxidantante (GAP)

El GAP antioxidante se calculó a partir de la CPAT en µmol/L, la albúmina (Alb) y el ácido úrico (Aur) séricos en µmol/L, y los valores de TEAC para albúmina y ácido úrico. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\text{GAP} = \text{CPAT} - ([\text{Alb} * \text{TEAC}] + [\text{Aur} * \text{TEAC}])$$

Donde el TEAC de albúmina es 0.69 y el de ácido úrico es de 1.0.²² Se consideraron como valores de GAP normales los > 190 µmol/L y bajos los valores ≤ 190 µmol/L.

Constructo para evaluar el grado de EOx

En este constructo se consideraron siete biomarcadores de EOx incluyendo dos marcadores para el daño oxidativo sobre biomoléculas celulares (lípidos y ADN), tres

biomarcadores del sistema antioxidante enzimático: SOD, GPx y razón SOD/GPx y dos del sistema antioxidante no enzimático: capacidad plasmática antioxidant total (CPAT) y brecha antioxidante (GAP).

Estableciendo los valores de corte del percentil 95 de un grupo de sujetos sanos, se asignó un valor de 1 a cada parámetro alterado y cero a cada parámetro dentro de los valores de corte, se realizó la suma de todos los parámetros alterados para establecer el grado de EOx en cada individuo; de este modo, se consideró como valor máximo de los parámetros alterados el 7 y el menor de cero. Se establecieron 4 categorías para el grado o severidad de EOx en función de la puntuación obtenida: EOx normal, de 0-1 puntos; EOx leve, de 2-3 puntos; EOx moderado de 4-5 puntos y EOx severo de 6-7 puntos. Adicionalmente, se establecieron dos nuevas categorías: (i) sin EOx, los que presentan EOx normal o leve, y (ii) con EOx, si éste es moderado o severo.

Evaluación de los factores pro-oxidantes y ECD

Se aplicó un cuestionario de factores pro-oxidantes para el registro de datos de identificación personal de los individuos, y algunos aspectos de salud, hábitos como tabaquismo, ingesta moderada de bebidas alcohó-

licas (de 1 a 2 copas/día), realización de actividad física y el número de horas de sueño diario. También se elaboró una ficha antropométrica en la cual se captaron datos como la tensión arterial sistólica y diastólica, peso, talla, índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura y cadera y el índice cintura-cadera (ICC).

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se empleó el paquete estadístico SPSS V. 10.0, realizándose el cálculo de promedios, desviación estándar y proporciones para la descripción de los datos. Para la comparación de grupos se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA) con prueba de Dunnett como *posthoc* y *t* de Student con un nivel de confianza al 95%. Adicionalmente se empleó la prueba χ^2 , el cálculo de riesgos a través de la razón de momios (RM) y el análisis de regresión logística que utiliza la RM como estimador de riesgos con un intervalo de confianza al 95%. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

En el cuadro I se muestra la descripción de los parámetros bioquímicos y hematológicos de la población

Cuadro I. Descripción de los parámetros bioquímicos y hematológicos por diagnóstico.

Variable	Sanos (n = 63)	Diabetes mellitus (n = 33)	Hipertensión arterial (n = 40)	Osteoartritis (n = 26)
Edad (años)	67 ± 7	66 ± 6	69 ± 8	67 ± 6
Glucosa (mg/dL)	96 ± 24	184 ± 68*	95 ± 15	95 ± 16
Urea (mg/dL)	35 ± 7	35 ± 10	37 ± 11	34 ± 9
Creatinina (mg/dL)	0.90 ± 0.20	1.02 ± 0.76	0.90 ± 0.21	0.81 ± 0.19
Ac. úrico (mg/dL)	5.14 ± 1.83	4.84 ± 1.53	5.52 ± 1.0	4.46 ± 1.34
Colesterol (mg/dL)	219 ± 38	225 ± 39	212 ± 48	200 ± 52
Triglicéridos (mg/dL)	210 ± 156	238 ± 166	174 ± 75	190 ± 97
HDL (mg/dL)	55 ± 13	61 ± 30	47 ± 9	54 ± 13
Albúmina (g/dL)	4.43 ± 0.53	4.33 ± 0.53	4.62 ± 0.57	4.29 ± 0.40
Hemoglobina (g/dL)				
Mujeres	14.54 ± 1.23	14.00 ± 1.53	14.56 ± 1.35	14.35 ± 0.84
Hombres	15.65 ± 1.59	16.00 ± 1.70	16.62 ± 2.22	16.90 ± 0.42
Hematocrito (%)				
Mujeres	45 ± 4	43 ± 4	45 ± 4	45 ± 3
Hombres	49 ± 5	49 ± 5	51 ± 7	52 ± 3
Eritrocitos X10 ⁶ /mm ³				
Mujeres	5.18 ± 0.53	5.01 ± 0.54	5.15 ± 0.56	5.03 ± 0.43
Hombres	5.70 ± 0.66	5.58 ± 0.62	5.88 ± 0.68	5.87 ± 0.07
Leucocitos (cels/mm ³)	6,293 ± 1,235	6,753 ± 1,583	6,380 ± 1456	5,809 ± 1,263
TAS (mm de Hg)	127 ± 17	137 ± 28	141 ± 22†	131 ± 15
TAD (mm de Hg)	80 ± 9	81 ± 12	84 ± 10	82 ± 10

TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica.

Promedio ± desviación estándar. ANDEVA, prueba de Dunnett vs grupo sin enfermedad: * $p < 0.0001$, † $p < 0.05$.

de estudio, en el cual se observa que los valores de dichos parámetros son similares en todos los grupos excepto en los niveles de glucosa que fueron significativamente más altos para el grupo de diabéticos ($p < 0.0001$) y la presión arterial sistólica para el grupo con HTA ($p < 0.05$), por lo que podemos señalar que los grupos son homogéneos y comparables.

Por otro lado, se observó que en adultos mayores con DM la actividad de GPx y la CPAT se encuentran significativamente disminuidas en comparación con el grupo de adultos mayores sanos ($p < 0.05$). Asimismo se observó que los adultos mayores con HTA presentan un incremento en el daño oxidativo al ADN ($p < 0.05$), y una disminución en la actividad de la GPx ($p < 0.0001$) con un concomitante incremento en la razón SOD/GPx ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de individuos sanos. Por otro lado, el grupo de adultos mayores con OA no presenta diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los marcadores de EOx determinados con respecto al grupo de individuos sanos (*Cuadro II*).

Aplicando el constructo propuesto para evaluar la severidad del EOx, se observó que los adultos mayores con DM o HTA tienen tendencia a presentar una

mayor frecuencia de EOx severo o moderado en comparación con los adultos mayores sanos y con OA (*Cuadro III*). En este sentido, al realizar el análisis univariado se encontró que el EOx severo es un factor de riesgo para la presencia de HTA (RM = 10.5, IC_{95%}: 1.01-108.58, $p < 0.01$), lo mismo que el moderado (RM = 15.75, IC_{95%}: 1.77-19.94, $p < 0.05$).

Se realizó una reclasificación para la presencia o ausencia de EOx, para lo cual se catalogaron como (i) sujetos sin EOx aquellos individuos con EOx normal o leve, y (ii) sujetos con EOx, cuando presentaban EOx moderado o severo. Con esta nueva clasificación, se observó que un 70% de los adultos mayores con HTA y un 54% de los individuos diabéticos presentan EOx en comparación con el 29% de los individuos sanos y 35% de los sujetos con OA (*Cuadro IV*). Asimismo, al realizar el análisis univariado se encontró que el EOx es un factor de riesgo para la presencia de HTA y DM (RM = 3.0, IC_{95%}: 1.25-7.21, $p < 0.0001$ y RM = 5.83, IC_{95%}: 2.44-1.91, $p < 0.05$, respectivamente).

Considerando el estado de salud de los adultos mayores, se observó que en sujetos sanos es más frecuente el EOx leve en comparación con los adultos

Cuadro II. Descripción de los marcadores biológicos de estrés oxidativo por diagnóstico, promedio ± desviación estándar.

Variable	Sanos (n = 63)	Diabetes mellitus (n = 33)	Hipertensión arterial (n = 40)	Osteoartritis (n = 26)
Lipoperóxidos plasmáticos (μmol/L)	0.317 ± 0.107	0.337 ± 0.112	0.307 ± 0.100	0.323 ± 0.087
Migración de ADN (%)	31 ± 18	35 ± 15	41 ± 21*	32 ± 15
Superóxido dismutasa (U/g de hemoglobina)	1.16 ± 0.15	1.17 ± 0.14	1.09 ± 0.15	1.14 ± 0.11
Glutatión peroxidasa (U/g de hemoglobina)	54.9 ± 25.3	42.8 ± 21.1*	36.2 ± 15.0†	47.7 ± 23.8
Razón SOD/GPx	0.026 ± 0.014	0.033 ± 0.015	0.035 ± 0.014*	0.031 ± 0.019
Capacidad plasmática antioxidante total (mmol/L)	1.07 ± 0.24	0.91 ± 0.21*	1.01 ± 0.24	1.01 ± 0.20
Brecha antioxidante (μmol/L)	380 ± 519	229 ± 185	263 ± 185	301 ± 196

*ANDEVA, prueba de Dunnett vs grupo sin enfermedad: * $p < 0.05$, † $p < 0.0001$.

Cuadro III. Grado de estrés oxidativo por diagnóstico.

Variable	Sanos	Diabetes mellitus	Hipertensión arterial	Osteoartritis
Estrés oxidativo normal	9 (14)	2 (6)	1 (2)	2 (8)
Estrés oxidativo leve	36 (57)	13 (39)	11 (28)	5 (58)
Estrés oxidativo moderado	12 (19)	13 (39)	21 (53)*	8 (30)
Estrés oxidativo severo	6 (10)	5 (16)	7 (17)†	1 (4)
Total	63 (100)	33 (100)	40 (100)	26 (100)

Frecuencia (porcentaje). Prueba χ^2 vs grupo sin enfermedad, * $p < 0.01$, † $p < 0.05$.

mayores que presentan alguna de las 3 enfermedades estudiadas. En este sentido, se encontró que el 42% de los individuos con enfermedad presentan EOx moderado en comparación con el 19% de los individuos sanos ($p < 0.001$).

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis de regresión logística con la finalidad de determinar cuál es la influencia ponderada de algunos de los considerados factores de riesgo pro-oxidantes sobre la presencia de las enfermedades de estudio y se encontró que el EOx es un factor de riesgo estadísticamente significativo para la presencia de enfermedad. Asimismo, la ingesta moderada de bebidas alcohólicas, resultó ser un factor protector para la presencia de enfermedad (*Cuadro V*).

DISCUSIÓN

La prevalencia e incidencia de las ECD es significativamente mayor durante la vejez, así mismo, se ha señalado que el EOx está vinculado con la etiología y fisiopatología de este grupo de enfermedades. En este sentido, las ECD de mayor prevalencia en esta etapa de la vida son la HTA, la DM y la OA, por lo que se ha propuesto que los adultos mayores que cursan con mayor EOx tienen más probabilidad de sufrir alguna de estas enfermedades y sus complicaciones, no

obstante las evidencias científicas no son del todo concluyentes.^{24,25}

En algunos estudios se ha demostrado que el EOx constituye una de las alteraciones bioquímicas fundamentales en la DM, HTA y OA. Al respecto, en este estudio se encontró que los individuos con DM presentan una disminución estadísticamente significativa en los niveles de GPx en comparación con individuos sanos, cuyos resultados son congruentes con lo reportado por Palanduz y cols. (2001)²⁶ quienes demostraron que los pacientes diabéticos presentan mayor actividad de la SOD aunada a una disminución de la actividad de la GPx. No obstante Majchrzak y cols. (2001)²⁷ observaron que los diabéticos con un buen control glicémico no presentan EOx y la actividad de la SOD y la GPx es similar a la de los sanos, de ahí que se propone que el monitoreo del EOx y específicamente de las enzimas SOD y GPx podrían ser un marcador biológico confiable para el pronóstico de los sujetos con DM.

Con relación a la CPAT se observó una disminución estadísticamente significativa en los adultos mayores con DM en comparación con los sanos, lo cual concuerda con lo reportado por Bhatia y cols. (2003),²⁸ no obstante, algunos estudios han reportado que no existe diferencia estadísticamente significativa en la CPAT de sujetos diabéticos y sanos,^{29,30} por lo

Cuadro IV. Estrés oxidativo global por diagnóstico.

Variable	Sanos	Diabetes mellitus	Hipertensión arterial	Osteoartritis
Sin estrés oxidativo	45 (71)	15 (46)	12 (30)	17 (65)
Con estrés oxidativo	18 (29)	18 (54)*	28 (70)†	9 (35)
Total	63 (100)	33 (100)	40 (100)	26 (100)

Frecuencia (porcentaje). Prueba χ^2 vs. grupo sin enfermedad, * $p < 0.05$, † $p < 0.0001$.

Cuadro V. Factores de riesgo asociados a la presencia de enfermedad.

Factor de riesgo	Porcentaje*	RM	IC _{95%}	Valor de p [†]
Estrés oxidativo	56	2.45	1.11-5.40	0.025
Tabaquismo	21	3.05	0.88-10.88	0.085
Género (masculino)	23	1.56	0.56-4.31	0.460
Inactividad física	41	0.71	0.32-1.58	0.405
Edad (> 70 años)	35	0.94	0.40-2.20	0.894
Obesidad (IMC ≥ 27 kg/m ²)	43	0.68	0.31-1.49	0.338
Dormir menos de 6 horas	24	0.55	0.24-1.26	0.158
Ingesta moderada de bebidas alcohólicas	30	0.33	0.14-0.78	0.012

Análisis de regresión logística, $r^2 = 0.182$, $p = 0.014$. RM: Razón de momios, IC_{95%}: Intervalo de confianza al 95%, IMC: índice de masa corporal.

* Porcentaje de individuos con enfermedad que presentan el factor de riesgo, †nivel de significancia.

que es evidente que la medición y análisis de un solo marcador biológico para EOx genera confusiones en la interpretación de su posible influencia etiológica y fisiopatológica.

Por otro lado, en los sujetos con HTA se encontró un incremento significativo en el daño oxidativo al ADN, aunado a una disminución en la actividad GPx en comparación con los sujetos sanos, lo cual es congruente con los hallazgos publicados por Pedro-Botet y cols. (2000)³¹ quienes observaron que la actividad de las enzimas antioxidantes se ve afectada en los pacientes con HTA con respecto a controles sanos, disminuyendo la eficacia en la remoción del radical superóxido ocasionando la inactivación del óxido nítrico endotelial; así mismo, en este estudio se observó un incremento significativo en la razón SOD/GPx en individuos con HTA, desequilibrio enzimático que propicia mayor EOx, por la acumulación del H₂O₂ como consecuencia de la acción de la SOD sobre el anión superóxido e insuficiente actividad de la GPx,³² lo cual favorece mayor daño oxidativo al ADN.³³

Respecto al EOx como factor etiológico de OA, hay evidencias científicas que apoyan dicha propuesta,³⁴ sin embargo en nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los marcadores biológicos del EOx en comparación con los sujetos sanos. En este sentido, la OA aunque cursa con un proceso inflamatorio crónico, éste es de poca intensidad y con períodos agudos intermitentes, a diferencia de la artritis reumatoide, cuyo proceso inflamatorio es más intenso y por lo tanto en esta enfermedad el EOx es más intenso.³⁵

Si bien el EOx se ha considerado una de las principales causas de envejecimiento, y se ha relacionado con más de 100 padecimientos crónico-degenerativos, uno de los grandes problemas para su análisis e interpretación es la falta de un constructo internacionalmente aceptado para catalogar la presencia y grados de EOx.³⁶ Al respecto nuestro grupo de investigación ha desarrollado una propuesta de un constructo para evaluar integralmente el EOx.^{17,37} Este constructo para evaluar el EOx consideró los siguientes parámetros: (i) daño oxidativo al ADN medido a través del ensayo cometa, (ii) daño oxidativo a lípidos, medido a través del método TBARS, (iii) actividad enzimática de SOD, GPx y la razón SOD/GPx, considerando que este último es un buen estimador del balance celular entre las enzimas antioxidantes,³⁸ (iv) CPAT y (v) GAP que refleja la actividad combinada de antioxidantes plasmáticos diferentes de albúmina y ácido úrico.

Aplicando dicho constructo se observó que no todos los adultos mayores presentan EOx, por lo que no debe ser considerado una característica normal del envejecimiento. En este sentido Sánchez-Rodríguez y cols. (2005)³⁹ señalaron que durante el envejecimiento se lleva a cabo un proceso adaptativo, por lo que sugieren que el EOx no es una característica biológica propia del envejecimiento y la vejez; además, se ha observado que los cambios que ocurren en los tejidos como consecuencia del envejecimiento no necesariamente generan un deterioro estructural y funcional vinculado con el envejecimiento.⁴⁰ Por tal motivo, aunque el EOx constituye un factor biológico asociado con el envejecimiento y las ECD, no se deben perder de vista otros mecanismos como la apoptosis y los procesos autoinmunes.

Debido a que los radicales libres (RL) intervienen como moléculas de señalización en múltiples funciones fisiológicas, la afinidad de los antioxidantes por sus sustratos oxidantes está relacionada con un nivel de RL permisible para las células, manteniéndose así un equilibrio prooxidante-antioxidante estable.²⁵ Uno de los mecanismos que permite mantener este equilibrio dentro de rangos fisiológicos aceptables para la célula, es el proceso denominado hormesis, en el que la exposición a dosis pequeñas de RL por períodos breves, induce una respuesta celular al EOx leve en la que se ponen en marcha procesos de expresión genética que desencadenan cascadas de inactivación de RL y de reparación de lesiones a través de la sobreexpresión de SOD y GPx y enzimas reparadoras de macromoléculas.^{41,42} Esta es una respuesta que se produce en casi todos los organismos, sin embargo, si el estímulo estresante se produce de manera repetida por períodos prolongados puede volver defectuosa esta respuesta adaptativa al estrés, produciéndose la acumulación gradual de subproductos tóxicos que condiciona la integridad estructural y funcional a lo largo de la vida del individuo.^{25,43} Por esta razón es que encontramos individuos mayores de 60 años sin padecimientos crónico-degenerativos que poseen EOx normal o leve, ya que han desarrollado una respuesta adaptativa ante la exposición gradual a especies oxidantes, sin embargo en los adultos mayores que no se consigue esta respuesta se produce mayor EOx, ECD y muerte prematura.⁴⁴

Por otro lado, es importante considerar que el envejecimiento es un proceso estocástico muy complejo en el que intervienen factores de tipo genético, de género y ambientales que pueden influir negativamente en la regulación del equilibrio prooxidante-antioxidante, y con el tiempo, este efecto se hace más evi-

dente en la longevidad y en la presencia de enfermedades crónico-degenerativas.^{40,43,44} En este estudio se observó, al realizar el análisis multivariado, que el EOx es un factor de riesgo para la presencia de enfermedad en los adultos mayores de la ciudad de México y que el tabaquismo es un factor de riesgo límitrofe, además, se observó que el consumo moderado de bebidas alcohólicas es un factor protector, lo cual es congruente con lo reportado en la literatura, ya que se ha demostrado que el consumo de 2 copas al día (< 23 g/d de etanol) tiene un efecto protector para enfermedades cardiovasculares y muerte prematura.⁴⁵⁻⁴⁷

También se observó en este estudio que los adultos mayores con HTA y DM presentan con mayor frecuencia EOx severo o moderado en comparación con los adultos mayores sanos. Al respecto, el poder diferenciar el grado de EOx en este tipo de pacientes a través del constructo, nos da la oportunidad de monitorear la eficacia terapéutica y el pronóstico vinculado al EOx en adultos mayores con ECD.

Finalmente, es conveniente señalar que el tamaño de la muestra y el diseño de tipo transversal son dos de las limitaciones más importantes de esta investigación, por lo que sería necesario llevar a cabo estudios longitudinales de cohorte en muestras representativas de población rural y urbana para confirmar nuestros hallazgos.

REFERENCIAS

1. Sohal R. Oxidative stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 573-574.
2. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7124-7128.
3. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992; 275: 257-266.
4. Gutteridge JMC. Free radicals and aging. *Rev Clin Gerontol* 1994; 4: 279-288.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-619.
6. Mc Cord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
7. Mecocci P, Fanò G, Fulle S, Mac Garcey U, Shinobu L, Polidori MC, et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 303-308.
8. Muchová J, Sustrová M, Garajová I, Liptáková A, Blazícek P, Kinasnická P, et al. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 499-508.
9. Gil P, Fariñas F, Casado A, López-Fernández E. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology* 2002; 48: 209-214.
10. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrożny M, Kasznicki J, et al. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 2004; 554: 297-304.
11. Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003; 41: 1096-1101.
12. Tamer L, Sucu N, Polat G, Ercan B, Aytacoglu B, Yücebilgic G, et al. Decreased serum total antioxidant status and erythrocyte-reduced glutathione levels are associated with increased serum malondialdehyde in atherosclerotic patients. *Arch Med Res* 2002; 33: 257-260.
13. Andreassi MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003; 543: 67-86.
14. Olszki R, Gackowski D, Foksiński 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.
15. King CM, Bristow-Craig HE, Gillespie ES, Barnett YA. In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75- to 80 years-old-humans. *Mutat Res* 1997; 377: 137-147.
16. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 116-127.
17. Sánchez-Rodríguez MA, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímia* 2004; 29: 81-90.
18. 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 the elderly. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 835-847.
19. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM, García-Sánchez A, González-González B, Rodríguez-Torres E, González-Obregón A. Valores de referencia para una población de ancianos y adultos de la ciudad de México. Parámetros bioquímicos y hematológicos. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 1998; 32: 812-821.
20. Singh N, Danner DB, Tice R, Pearson JD, Brant LJ, Morrel CH, et al. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991; 256: 1-6.
21. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1994; 307: 261-271.
22. Miller N. *Non vitamine plasma antioxidants*. In: Armstrong D, Ed. *Methods in molecular Biology*. Free radical and antioxidant protocols. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 108, 285-297.
23. Jentzsch A, Bachmann H, Fürst P, Bielsaski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 251-256.
24. González-Torres C, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímia* 2000; 25: 3-9.
25. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247.
26. Palanduz S, Ademoglu E, Gokkusu C, Tamer S. Plasma antioxidants and type 2 diabetes mellitus. *Res Comun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 109: 309-318.
27. Majchrzak A, Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B [Abstract]. Evaluation of selected components in antioxidant systems of blood in patients with diabetes. *Pol Merkuriusz Lek* 2001; 10: 150-152.
28. Bhatia S, Shukla R, Venkata-Madhu S, Kaur-Cambhir J, Madhava-Prabhu K. Antioxidant status, lipid peroxida-

- tion and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem* 2003; 36: 557-562.
29. Duman BS, Östürk M, Yilmazer S, Hatemi H. Thiols, malondialdehyde and total antioxidant status in the Turkish patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med* 2003; 247: 147-155.
30. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status an lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996; 90: 255-260.
31. Pedro-Botet J, Covas MI, Martin S, Rubies-Prat J. Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2000; 14: 343-345.
32. de Haan JB, Cristiano F, Ianello 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.
33. Negishi H, Ikeda K, Kuga S, Noguchi T, Kanda T, Njeleke-la M, et al. The relation of oxidative DNA damage to hypertension and other cardiovascular risk factors in Tanzania. *J Hypertens* 2001; 19: 529-533.
34. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 2005; 38: 981-986.
35. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R380-391.
36. De Zwart LL, Merman 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.
37. 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 Geriatr* 2003; 6: 100-104.
38. Cristiano F, de Haan JB, Iannello RC, Kola I. Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occurs during aging and correlate with cellular damage. *Mech Ageing Dev* 1995; 80: 93-105.
39. Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Ruiz-Ramos M, Muñoz-Sánchez JL, Vargas-Guadarrama LA, Mendoza-Núñez VM. Efficient antioxidant capacity against lipid peroxide levels in healthy elderly of México City. *Environ Res* 2005; 97: 322-329.
40. Harman D. The aging process: major risk factor to disease and death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5360-5363.
41. Rattan SIS. Aging, anti-aging, and hormesis. *Mech Ageing Dev* 2004; 125: 285-289.
42. Rattan SIS. Hormetic mechanisms of anti-aging and rejuvenating effects of repeated mild heat stress on human fibroblasts *in vitro*. *Rejuv Res* 2004; 7: 40-48.
43. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 575-586.
44. Kapahi P, Boulton ME, Kirwood TBL. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 495-500.
45. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, Wakai K, Kawamura T, Iso H, Ogimoto I, Yagyu K, Obata Y, Ishibashi T. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly Japanese men and women. *Ann Epidemiol*. 2005;15: 590-597.
46. Malinski MK, Sesso HD, Lopez-Jimenez F, Buring JE, Gaziano JM. Alcohol consumption and cardiovascular disease mortality in hypertensive men. *Arch Intern Med* 2004; 164: 623-628.
47. Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N Engl J Med* 1997; 337: 1705-1714.

