



Facultad de medicina  
Departamento Fisiología  
Universidad de Murcia

Tesis doctoral

Análisis de los factores de riesgo  
cardiovascular en el proceso de  
envejecimiento y su relación con el estrés  
oxidativo. Estudio Piloto Observacional.

Santiago Cuevas González  
2008

Director  
Dr Luis F. Carbonell Meseguer

# ÍNDICE

## RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

<b>1. Estrés oxidativo</b> .....	15
<b>1.1</b> Producción de pro-oxidantes.....	18
<b>1.2</b> Principales antioxidantes.....	19
<b>1.3</b> Envejecimiento y estrés oxidativo.....	21
<b>1.4</b> Extensión del daño por oxidantes.....	23
<b>1.5</b> Papel de las mitocondrias en el envejecimiento celular..	25
<b>1.6</b> El estrés oxidativo y la expresión génica.....	26
<b>2. Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular</b> .....	29
<b>2.1 Factores de riesgo cardiovascular</b> .....	30
<b>2.1.1 Factores de riesgo personales no modificables</b> ...	31
• 2.1.1.1 Sexo.....	31
• 2.1.1.2 Edad.....	32
• 2.1.1.3 Herencia o antecedentes familiares.....	32
<b>2.1.2 Factores de riesgo que pueden corregirse</b> .....	32
<b>2.1.2.1 Directos</b> .....	32
• 2.1.2.1.1 Niveles de colesterol total y LDL elevado.....	32
• 2.1.2.1.2 Niveles de HDL bajos.....	33
• 2.1.2.1.3 Tabaquismo.....	34
• 2.1.2.1.4 Hipertensión.....	34
• 2.1.2.1.5 Diabetes.....	35
• 2.1.2.1.6 Tipo de alimentación.....	35
<b>2.1.2.2.Indirectos</b> .....	36
• 2.1.2.2.1 Sedentarismo.....	36
• 2.1.2.2.2 Obesidad.....	36
• 2.1.2.2.3 Estrés social.....	36
<b>2.1.3 Índice de Framingham</b> .....	37
<b>3. Variables resultado de nuestro estudio</b> .....	39
<b>3.1</b> Homocisteína.....	39
<b>3.2</b> Proteína C Reactiva. ....	42
<b>3.3</b> Mieloperoxidasa.....	43
<b>3.4</b> Malonildialdehído.....	45
<b>3.5</b> Ácido Úrico.....	46
<b>4. Críticas a la teoría del estrés oxidativo en el envejecimiento.</b>	48

<b>5. Justificación del estudio</b> .....	49
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</b> ....	53
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	57
<b>1. Características generales del estudio</b> .....	57
1.1 Criterios de inclusión.....	57
1.2 Criterios de exclusión.....	57
<b>2. El protocolo</b> .....	58
<b>3. Cálculo de diferentes índices a partir de los valores obtenidos en el cuaderno de recogida de datos</b> .....	91
3.1. Índice de masa corporal.....	91
3.2 Índice Aterogénico.....	91
3.3 Índice de Framingham. Formula para el cálculo del riesgo cardiovascular según el modelo del estudio Framingham.....	91
<b>4. Determinaciones analíticas</b> .....	95
4.1 Homocisteína.....	95
4.2 Proteína C reactiva.....	96
4.3 Malondialdehido (MDA).....	97
4.4.Mieloperoxidasa.....	98
<b>5. Análisis estadístico</b> .....	99
5.1- Análisis descriptivo.....	100
5.2- Estudio analítico.....	100
5.3- Modelo de regresión múltiple.....	100
<b>RESULTADOS</b> .....	105
<b>1. Análisis descriptivo</b> .....	105
<b>1.1 Estadísticos descriptivos</b> .....	105
1.1.1. Prevalencia de factores clásicos de riesgo cardiovascular.....	106
1.1.2 Edad de los sujetos del estudio.....	107
1.1.3 Características antropométricas.....	109
1.1.3.1 Índice de masa corporal.....	110
1.1.3.2 Circunferencia de cintura.....	110
1.1.4 Presión arterial.....	110
1.1.5. Índice de Framingham.....	111
1.1.6. Glucemia.....	112
1.1.7. Perfil lipídico.....	114
1.1.8 Perfil hepático.....	116

---

1.1.9 Dieta.....	116
<b>1.2 Correlaciones entre la edad y el resto de los parámetros.....</b>	<b>118</b>
<b>1.3 Correlaciones entre el índice aterogénico, circunferencia de cintura e índice de masa corporal con otros parámetros del estudio.....</b>	<b>122</b>
<b>2. Estudio Analítico.....</b>	<b>124</b>
2.1 Homocisteína.....	124
2.2 Proteína C reactiva (PCR).....	130
2.3 Mieloperoxidasa (MPO).....	135
2.4 Malondialdehido (MDA).....	138
2.5 Ácido Úrico.....	143
<b>3. Regresiones Múltiples.....</b>	<b>145</b>
3.1 Regresión múltiple de la Homocisteína como variable dependiente y la edad, glucemia, circunferencia de cintura y presión arterial.....	145
3.2 Regresión múltiple de la PCR como variable dependiente y la edad, IMC, ácido úrico y el Índice Aterogénico.....	146
3.3 Regresión múltiple del Ácido Úrico con variable dependiente y la edad, IMC, HDL, LDL y Homocisteína y PCR.....	147
3.4 Regresiones múltiples de MDA, Edad, colesterol y otros parámetros del estudio.....	149
3.5 Regresiones múltiples del índice aterogénico y los triglicéridos con otras variables del estudio.....	149
<b>4. Dieta.....</b>	<b>151</b>
4.1 Consumo de Frutas.....	151
4.2 Consumo de aceite de Oliva.....	153
4.3 Consumo de verduras y hortalizas asociado a la edad.....	154
4.4 Consumo conjunto de frutas, verduras, hortalizas y legumbres.....	155
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>161</b>
1. Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular en el envejecimiento.....	164
2. Estrés oxidativo y envejecimiento.....	177
3. Limitaciones del estudio.....	183
4. Perspectiva del estudio.....	183
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>193</b>



## RESUMEN

---

---



## Resumen

Según datos del Ministerio de Sanidad y Consumo la enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en España, representando el 33% de todas las defunciones, seguido del cáncer con un 25% ([www.cardioalert.net](http://www.cardioalert.net)). Dentro de las enfermedades cardiovasculares las más recurrentes son la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular. La Región de Murcia está a la cabeza en el porcentaje de muertes por enfermedad cardiovascular con respecto al resto del país. Los procesos de arteriosclerosis parecen ser uno de los desencadenantes de los problemas degenerativos cardiovasculares, estando muy documentado en la bibliografía que el desajuste del estado redox hacia procesos oxidativos desempeña un papel importante en los mecanismos inflamatorios que desencadenan el deterioro de la función endotelial y la formación de la placa de ateroma (Díaz *et al.*, 1997; Bonomini *et al.*, 2008).

Por otro lado, el aumento de la expectativa de vida en los países occidentales ha originado el envejecimiento de la población y por consiguiente, un incremento relativo de las enfermedades asociadas a éste. El envejecimiento es un proceso multifactorial sobre el que se han postulado numerosas hipótesis con el fin de explicar los procesos moleculares degenerativos que actúan en el mismo (Hayflick, 1985; Medvedev, 1990). Harman en 1956 fue el primero en formular la hipótesis de que los procesos bioquímicos generados en gran medida por el metabolismo oxidativo celular, son los responsables de numerosas alteraciones fisiopatológicas y que podrían favorecer los procesos moleculares asociados al envejecimiento (Harman, 1956a).

De lo expuesto anteriormente se puede extraer que los procesos oxidativos subyacen en la fisiopatología de la enfermedad vascular degenerativa así como participan en el deterioro funcional que implica el envejecimiento.

Se denomina *estrés oxidativo* aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente pro-oxidante que puede afectar la homeostasis del estado redox. Paralelamente, los mecanismos defensivos antioxidantes desarrollados para contrarrestar la acción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) son sobrepasados, dando lugar a una desprotección tisular frente a la acción de estos compuestos tan reactivos, y que parecen participar en algunos procesos degenerativos de los sistemas biológicos.

En la presente memoria de tesis doctoral presentamos un estudio realizado con 160 personas residentes en el área metropolitana de Murcia en el que pretendemos estudiar la evolución de diversos determinantes de riesgo cardiovascular con la edad y su relación con marcadores de estrés oxidativo. Además, reconociendo la importancia que los hábitos, tanto alimenticios como sociales, tienen para una adecuada salud cardiovascular y para el grado de deterioro ligado al envejecimiento, hemos considerado algunos de estos hábitos para intentar evaluar cuales son más influyentes en los procesos de envejecimiento y riesgo cardiovascular. De forma que los objetivos de nuestro estudio fueron: -Primero: *“Describir y analizar factores asociados al riesgo cardiovascular a lo largo del proceso natural de envejecimiento humano y su relación con marcadores de estrés oxidativo.”*

-Segundo: *“Establecer posibles relaciones entre ciertos hábitos nutricionales y el estrés oxidativo en una población sana de amplio rango de edad.”*

Se realizó un protocolo que se entregó a los médicos que voluntariamente accedieron a participar en este estudio. El protocolo es un documento en el que se aporta toda la información y los procedimientos para la realización del estudio. Este consta de 3 apartados, el primero es donde aparece detalladamente toda la información y procedimientos requeridos por los médicos y personal sanitario para la realización del

mismo. El segundo apartado contiene cuatro anexos con documentos relacionados con el mismo y el tercer punto, son los Cuadernos de Recogida de Datos (CRD). Los CRD son una parte importante del estudio, ya que son los documentos en donde el médico recoge toda la información que se le requiere al paciente. La recogida de datos de los pacientes se llevo a cabo gracias a la colaboración por 14 médicos de familia de 3 centros de atención primaria diferentes del área metropolitana de la ciudad de Murcia, los cuales completaron rigurosamente los cuadernos de recogida de datos de cada uno de los pacientes. Los criterios de inclusión y exclusión utilizados para la incorporación de los pacientes en el estudio fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

1. Individuos atendidos en el ámbito ambulatorio del área metropolitana de la ciudad de Murcia, sanos o con patología tratada y compensada.
2. Edad comprendida entre 14 y 90 años.
3. Que el médico, por un motivo ajeno a este estudio, tuviera la intención de hacerle un estudio analítico que implicase una extracción de sangre.

Criterios de exclusión:

1. Antecedentes de isquemia coronaria, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardiaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inmunodeficiencias, tratamiento renal sustitutivo ó procesos tumorales.
2. Incapacidad para otorgar el consentimiento informado para poder utilizar sus datos en el estudio o que se negase a hacerlo.

Además de los datos de bioquímica general, antropométricos, personales y dietéticos de cada individuo, se extrajeron dos tubos de sangre de los que se obtuvieron alícuotas de plasma y suero que fueron almacenadas a -80 °C, y utilizadas posteriormente para la determinación

de la concentración de variables relacionadas con el estrés oxidativo y/o riesgo cardiovascular: Mieloperoxidasa (MPO), Homocisteína, Proteína C Reactiva (PCR) ultrasensible y Malondialdehído (MDA). Una vez recogida toda la información requerida en este estudio, se realizó el análisis estadístico de los datos. En primer lugar se hizo un estudio descriptivo de todas las variables importantes que se han recogido. Después se realizó un estudio analítico en el que compararon de medias entre los diferentes grupos de individuos, principalmente entre hombres y mujeres, y utilizando los test estadísticos adecuados se hicieron las correlaciones bivariadas entre los distintos datos de interés. Por último, se realizaron diversas regresiones múltiples en las que se analizaron más profundamente las asociaciones bivariadas encontradas, identificando los factores de confusión y las variables más influyentes sobre los distintos parámetros de estrés oxidativo.

Los valores encontrados están dentro de los rangos normales con las variaciones esperadas de una población sana de un amplio rango de edad, aunque el valor medio de índice de masa corporal (IMC) indica una población con sobrepeso (<25). Se encontraron diversas asociaciones de la edad con varios parámetros del estudio, entre ellos con variables como la presión arterial, la glucemia o el IMC.

Las diferentes correlaciones encontradas en este estudio con las variables Homocisteína, PCR y Ácido Úrico revelan que estas tres moléculas se comportan según los datos obtenidos como marcadores de riesgo cardiovascular.

La PCR, la MPO y el Malondialdehído MDA se asocian de forma contundente a la concentración de lípidos en sangre, siendo el colesterol y los triglicéridos las variables lipídicas que más se asocian a los marcadores de estrés oxidativo. De forma que los procesos inflamatorios crónicos podrían estar favorecidos por los altos valores plasmáticos de

lípidos, y éstos a su vez incrementar el estrés oxidativo en el entorno vascular.

El IMC y la circunferencia de cintura se han comportado como las variables más influyentes sobre los valores de lípidos, así como sobre otros valores de interés en nuestro estudio, destacando PCR, Homocisteína, Acido úrico, glucemia y presión arterial.

Las concentraciones plasmáticas de MDA no se asocian con la edad, pero al realizar una correlación entre éstas variables con sólo individuos menores de 65 años, encontramos una correlación significativa positiva. El consumo de frutas y alimentos de origen vegetal parece aumentar con la edad, e influir de forma significativa en la relación entre MDA y edad. La asociación más fuerte encontrada entre la edad y el MDA ha sido en individuos de 40 a 65 años. De forma que es posible que el estrés oxidativo aumente con la edad, pero debido a ciertos hábitos alimenticios de nuestra población, especialmente el mayor consumo de frutas y vegetales en los individuos de mayor rango de edad (65-90 años), estarían influyendo junto con otros factores a que precisamente en los individuos de mayor rango de edad tienda a reducirse el estrés oxidativo.



# INTRODUCCIÓN

---

---



## Introducción

Según datos del Ministerio de Sanidad y Consumo la enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en España, representando el 33% de todas las defunciones, seguido del cáncer con un 25% ([www.cardioalert.net](http://www.cardioalert.net)). Dentro de las enfermedades cardiovasculares las más recurrentes son la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular. La Región de Murcia está a la cabeza en el porcentaje de muertes por enfermedad cardiovascular con respecto al resto del país. Los procesos de arteriosclerosis parecen ser uno de los desencadenantes de los problemas degenerativos cardiovasculares, estando muy documentado en la bibliografía que el desajuste del estado redox hacia procesos oxidativos desempeña un papel importante en los mecanismos inflamatorios que desencadenan el deterioro de la función endotelial y la formación de la placa de ateroma (Díaz *et al.*, 1997; Bonomini *et al.*, 2008).

Por otro lado, el aumento de la expectativa de vida en los países occidentales ha originado el envejecimiento de la población y por consiguiente un incremento relativo, de las enfermedades asociadas a éste. El envejecimiento es un proceso multifactorial sobre el que se han postulado numerosas hipótesis con el fin de explicar los procesos moleculares degenerativos que actúan en el mismo (Hayflick, 1985; Medvedev, 1990). Harman en 1956 fue el primero en formular la hipótesis de que los procesos bioquímicos generados en gran medida por el metabolismo oxidativo celular, son los responsables de numerosas alteraciones fisiopatológicas y que podrían favorecer los procesos moleculares asociados al envejecimiento (Harman, 1956a).

De lo expuesto anteriormente se puede extraer que los procesos oxidativos subyacen en la fisiopatología de la enfermedad vascular degenerativa así como participar en el deterioro funcional que implica el envejecimiento.

En la presente memoria de tesis doctoral presentamos un estudio realizado con 160 personas residentes en el área metropolitana de Murcia en el que pretendemos estudiar la evolución de diversos determinantes de riesgo cardiovascular con la edad y su relación con marcadores de estrés oxidativo. Además, reconociendo la importancia que los hábitos, tanto alimenticios como sociales, tienen para una adecuada salud cardiovascular y para el grado de deterioro ligado al envejecimiento, hemos considerado algunos de estos hábitos para intentar evaluar cuales son más influyentes en los procesos de envejecimiento y riesgo cardiovascular. De esta forma tratamos de cumplir la premisa de que para mejorar el bienestar de la población y su calidad de vida, el primer paso es el conocimiento del estado de salud de esa población para, a continuación, adecuar una actuación sanitaria que intervenga sobre los factores determinantes de la salud integral del individuo.

En esta introducción trataremos de hacer una breve exposición de los conceptos básicos y antecedentes bibliográficos que nos resultan más importantes para el buen entendimiento y la justificación de nuestro estudio. En primer lugar empezaremos con la descripción de los mecanismos que inducen estrés oxidativo, es decir el desajuste redox hacia procesos oxidativos, cuáles son las principales fuentes de formación de los prooxidantes, y los mecanismos de defensa antioxidante más importantes del organismo. Después hablaremos de envejecimiento en el marco del estrés oxidativo, y finalmente del sistema cardiovascular en el envejecimiento, deteniéndonos en los principales factores de riesgo cardiovascular y la influencia de los procesos oxidativos sobre el deterioro vascular.

## 1. Estrés Oxidativo.

El oxígeno ha sido seleccionado por la evolución en todos los seres vivos aerobios como la molécula receptora de electrones en los procesos para formar ATP y obtener energía. Esta circunstancia ha aportado numerosas ventajas a estos seres aeróbicos, pero también desventajas debido a la fuerte naturaleza oxidativa del oxígeno. El oxígeno es una molécula altamente inestable con gran capacidad para aceptar los electrones de otras moléculas. Esta afinidad por captar electrones hace que en procesos de metabolismo aerobio, en ocasiones, bien como consecuencia de la actividad enzimática oxidativa, bien como oxidación incompleta en la cadena respiratoria mitocondrial, se formen moléculas de oxígeno inestables con un electrón desapareado en su última capa, es decir radicales libres de oxígeno, de ahí que genéricamente se les denomine especies reactivas de oxígeno (ERO), con una alta capacidad de reacción, prácticamente con cualquier principio activo, lo que también condiciona su corta existencia y su capacidad lesiva.

Se denomina *estrés oxidativo* aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente pro-oxidante que puede afectar la homeostasis del estado redox. Paralelamente, los mecanismos defensivos antioxidantes desarrollados para contrarrestar la acción de las ERO son sobrepasados, dando lugar a una desprotección tisular frente a la acción de estos compuestos tan reactivos y que parecen participar en algunas procesos degenerativos de los sistemas biológicos. Uno de los sistemas más sensibles a la acción de las ERO es el sistema cardiovascular (Reynolds *et al.*, 2007). Dentro de la denominación de ERO se incluyen los radicales libres de oxígeno, y otros compuestos de oxígeno que si bien no pueden catalogarse químicamente como radicales libres ( $H_2O_2$ ,  $OONO^-$ ...), sí que son altamente pro-oxidantes, y durante su metabolismo pueden generar especies de oxígeno muy reactivas ( $OH^-$ ,  $NO_2^-$ ).

## 1.1 Producción de Pro-oxidantes

Las ERO se generan en las células fundamentalmente por reacciones con transferencia de electrones. Éstas pueden estar mediadas por la acción enzimática o producirse sin la intervención de enzimas, a menudo con la colaboración de iones metálicos de transición como hierro y cobre reducidos. El radical libre que suele generar la existencia de las demás EROs endógenas es el anión superóxido. Su origen en la célula se sitúa en la mitocondria y en las membranas celulares tras la actuación de enzimas de membrana. En la mitocondria, el oxígeno molecular se metaboliza en la cadena respiratoria por la vía tetravalente para la obtención de ATP, pero una pequeña proporción de él (2-5%) se escapa por una vía univalente, el oxígeno capta un electrón y se convierte en el anión superóxido. En las membranas celulares realizan su función diversas enzimas (Tabla 1) que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones y consecuentemente se forma anión superóxido. La activación de estas enzimas forma parte de la actuación de diferentes hormonas y moduladores hormonales, de esta forma el anión superóxido puede considerarse como segundo mensajero en la actuación hormonal (Yu, 1994).

**Tabla 1. Enzimas productoras de Anión superóxido.**

Enzimas	ERO
Monoaminooxidasa	$O_2^-$ Anión superóxido
NADPH oxidasa	$O_2^-$ Anión superóxido
Xantina oxidasa	$O_2^-$ Anión superóxido
Ciclooxigenasa	$O_2^-$ Anión superóxido
Lipooxigenasa	$O_2^-$ Anión superóxido

A partir del anión superóxido se forman el resto de ERO, destacando el peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, hipoclorito y cloraminas y los radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno.

Conviene recordar que las ERO son también herramientas de las defensas celulares contra la agresión. Leucocitos monocitos-macrófagos y células del llamado sistema retículo-endotelial (células endoteliales, histiocitos, células alveolares II, células de Kupffer, células gliales etc.) una vez activados liberan importantes cantidades de EROs que ayudan a combatir la agresión y participan del proceso inflamatorio (Duthie, 1993). En algunos casos, si estos procesos inflamatorios se producen de forma sistémica y crónica y en determinados individuos, puede condicionar, por ejemplo, el inicio y la progresión del proceso arteriosclerótico.

En lo anteriormente mencionado se excluye aquellas agresiones externas provocadas por xenobióticos que o bien son ERO, o durante su relación con nuestro organismo inducen su generación. La lista de estos compuestos o situaciones sería muy extensa pero cabría señalar ambientes hiperóxicos (cámaras hiperbáricas), el ozono, herbicidas como el diquat y el paraquat, el alcohol y la cocaína, el tabaco, drogas diabéticas como el alloxan y la estreptozotocina, el tetracloruro de carbono, intoxicación por paracetamol, etc.

## **1.2 Principales antioxidantes.**

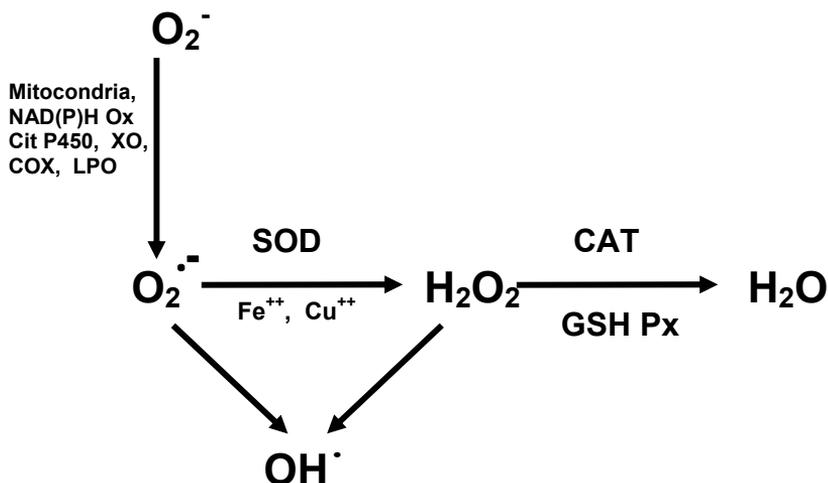
Antioxidantes son aquellas moléculas que inhibe o retrasan la oxidación de un sustrato estando presente a concentraciones inferiores a éste. Su función es donar un electrón interrumpiendo una interminable secuencia de oxidaciones y reducciones provocada por las ERO, sin que ello origine un hueco inestable en su estructura electrónica,

Existen antioxidantes de origen no enzimático como son, el tripéptido Glutation que es de origen endógeno y que está ampliamente extendido por los tejidos, representando el antioxidante con mayor concentración intracelular. Existen importantes antioxidantes que no pueden ser sintetizados por el organismo y se ingieren en la dieta como son la vitamina E, la vitamina C o la vitamina A. Otros compuestos con capacidad antioxidante presentes en el organismo son la albúmina, el ácido úrico, la bilirrubina, las proteínas captadoras de hierro y cobre, y últimamente incorporados a esta lista los estrógenos y la melatonina. En algunos casos, su capacidad antioxidante no es muy alta, pero es compensada por su alta concentración plasmática.

Otro grupo importante de antioxidantes son los de origen enzimático. Hay algunas enzimas que tienen como sustrato ERO, como es el caso de la catalasa y la súperoxido dismutasa. Otra enzima que participa en la acción antioxidante de forma decisiva es la Glutation Peroxidasa, su función principal es la de reducir las moléculas de glutacion que previamente han sido oxidadas, y de esta forma le devuelve a la molécula su capacidad antioxidante. Estas enzimas tienen un importante papel en la defensa antioxidante de las células. En la tabla 2, se describe cual es el sustrato que utilizan las distintas enzimas antioxidantes y el producto consecuente de su actuación. En la Figura 1, se representa la formación del anión superóxido tras la actuación enzimática y su transformación posterior.

**Tabla 2. Enzimas que eliminan Especies reactivas de Oxígeno.**

Enzima.	Sustrato	Producto
Superoxido dismutasa	$O_2^-$ Anión Superóxido	$H_2O_2$ Peróxido de hidrógeno
Catalasa	$H_2O_2$ Peróxido de hidrogeno	$H_2O$ Agua
Glutation Peroxidasa	<b>GSSG</b> Glutación oxidado	<b>2GSS</b> Glutación reducido



**Figura 1.** Este esquema representa las distintas reacciones que puede sufrir el anión superóxido según la presencia enzimática y de algunos metales. SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GSH Px: glutatión peroxidasa. Fe: hierro; Cu: Cobre.

### 1.3 Envejecimiento y estrés oxidativo.

El envejecimiento es un proceso multifactorial, del que se han propuesto numerosas teorías muchas de ellas no excluyentes mutuamente.

Una de estas teorías fue postulada por Harman en 1956 (HARMAN, 1956a), según la cual un aumento de la oxidación de las células y tejidos que se acumulan de forma irreversible con el tiempo, afectan a la funcionalidad de las células y tejidos y contribuyen a su deterioro gradual. Es decir, que las ERO producidas en el metabolismo del oxígeno podrían ser responsables en gran medida de los procesos degenerativos asociados al envejecimiento. Así que, según Harman, el envejecimiento se podría considerar un proceso oxidativo crónico.

En los últimos años se han obtenido gran cantidad de resultados que avalan esta teoría, con lo que el interés de muchos investigadores por ella es creciente. A continuación se enumeran algunos de estos resultados:

1. El concepto de índice basal metabólico como una determinante de la longevidad fue introducido por Rubner en 1908. Él encontró que la cantidad de energía metabolizada por gramo de peso desde la madurez hasta la muerte en 5 especies diferentes de mamíferos era relativamente similar. Hay estudios que sugieren que la relación inversa entre la expectativa de vida de los mamíferos y su metabolismo basal se correlaciona inversamente con el tiempo de vida de la especie.(Sohal, 1993; Villa *et al.*, 1993). Así pues, estos resultados apuntan a que las especies más longevas producen menos radicales libres que las especies menos longevas.
2. Sohal y otros autores encontraron que existe relación entre el potencial de vida máximo y los niveles de defensa antioxidante en 6 especies diferentes de mamíferos y en insectos.(Sohal *et al.*, 1990; Villa *et al.*, 1993; Vina *et al.*, 2005).
3. El hecho de que la vida media de algunas especies aumenta cuando se le administran antioxidantes (Melov *et al.*, 2000).
4. La evidencia del papel que desempeñan los radicales libres en enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento, como el parkinson, Alzheimer (Loh *et al.*, 2006), arteriosclerosis o diabetes (Madamanchi & Runge, 2007) entre otras.
5. Estudios realizados por Viña y cols sugieren que la diferencia de longevidad entre machos y hembras esta asociada a una protección derivada de los estrógenos. Esta protección parecen estar relacionada con la expresión de genes que aportan mayor protección antioxidante al organismo (Vina *et al.*, 2005).
6. Se ha descrito una disminución significativa de la capacidad antioxidante en plasma en una población humana adulta, frente a otra de individuos jóvenes (Chehab *et al.*, 2008).

7. La restricción calórica o la ingesta de dieta baja en calorías de forma continuada aumentan la longevidad del individuo de forma significativa (Finkel, 2003).
8. Hay estudios en ratas en los que se ha observado asociada a la edad una disminución de grupos SH en plasma (Iciek *et al.*, 2004), y la consecuente disminución de la capacidad antioxidante, así como el aumento de la aparición de daños o moléculas producto de la oxidación en las células.
9. Las mitocondrias de individuos jóvenes producen menos ERO que las mitocondrias de los individuos viejos (Sohal, 1991).

## **1.4 Extensión del daño por oxidantes.**

Las ERO dirigen su poder citotóxico a los diferentes componentes del organismo, causando lesiones que en muchos casos son reparadas por una compleja maquinaria celular. Dependiendo de si la ERO ha sido neutralizada por una proteína, ácido nucleico o lípido, encontraremos en los tejidos diferentes sustancias que en ocasiones no han sido reparadas y se estabilizan permaneciendo en los tejidos. Estas moléculas que se forman producto de la acción de ERO nos pueden ayudar a medir el grado de oxidación del tejido como marcadores de oxidación. Existen evidencias que con la edad se produce un aumento de la presencia de estas sustancias en el organismo.

### **1.4.1 Daño al ADN**

- Se ha observado durante el envejecimiento un incremento de 8 hidroxí-2-desoxiguanosina (8-OHdG), subproducto de la oxidación del ADN, tanto en el ADN nuclear como el mitocondrial (Ames, 1989; Beal, 1995).

- Incremento progresivo, relacionado con la edad, en el número de enlaces iónicos entre proteínas no histonas y grupos fosfatos del ADN, y aumento en la concentración de residuos de desoxiguanosina-malondialdehídos en el ADN. (Shull *et al.*, 1991)
- Aumento en la condensación de la cromatina con la edad.(Sohal & Allen, 1990)
- Estudios realizados en humanos documentan un aumento de 8-OHdG, con la edad en biopsias de músculo esquelético (Mecocci *et al.*, 1999).

#### **1.4.2 Daño a proteínas**

- El aumento en el contenido de grupos carbonilos por oxidación de proteínas se ha correlacionado de forma directa con la edad (Sohal & Allen, 1990; Sohal, 1993; Mo *et al.*, 1995; Sohal *et al.*, 1995).

#### **1.4.3 Daño a lípidos**

- Estudios de fluorescencia, han mostrado mayores niveles de dienos conjugados y malondialdehído (MDA), productos de peroxidación lipídica, en tejidos de animales viejos respecto a los jóvenes (Sohal *et al.*, 1981; Sohal *et al.*, 1990; Sohal, 1993; Shi *et al.*, 1994; Warner, 1994; Mo *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1995; Patterson *et al.*, 2000; Block *et al.*, 2002).
- Hay estudios realizados en humanos en los que se describe un aumento de la concentración de MDA y otros productos de la peroxidación lipídica asociado a la edad (Mecocci *et al.*, 1999; Franzoni *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2006).
- Se han utilizado los niveles de exhalación de alcanos como indicador de la peroxidación lipídica *in vivo* en mamíferos e insectos (el n-pentano y el etano son productos del catabolismo de los

ácidos grasos polinsaturados omega-3 y omega-6 respectivamente) y se ha observado que son mayores en animales envejecidos respecto a los jóvenes (Sohal *et al.*, 1981; Sohal, 1993; Villa *et al.*, 1993; Jialal & Devaraj, 2000) .

- Con la edad aumentan las concentraciones de lipofucsina en la célula, el componente mayoritario de este pigmento es producto de la peroxidación lipídica (Sohal & Allen, 1990; Sohal, 1993; Oenzil *et al.*, 1994).

## **1.5 Papel de las mitocondrias en el envejecimiento celular.**

En las mitocondrias es donde se realiza el metabolismo de todo el oxígeno que utilizan los mamíferos, y el 2% del mismo, aproximadamente, no se emplea para formar agua, sino que se deriva para la formación de anión superóxido por la vía univalente (Chance *et al.*, 1979) . La tasa de formación de estas ERO aumenta con el envejecimiento, ya que la acción oxidativa del anión superóxido y del peróxido de hidrogeno favorecen que esta tasa aumente con el tiempo. El incremento en la formación de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  se justifica con el hallazgo de que en el envejecimiento se modifican las condiciones del flujo de electrones en la CTE por lo que es más fácil a los electrones escapar de la secuencia normal del flujo tetravalente (Benzi & Moretti, 1995a). En estudios realizados en el músculo esquelético humano se observó un decrecimiento selectivo en los complejos I y IV durante el envejecimiento (Cooper *et al.*, 1992). Sohal y otros autores reportaron un incremento en la concentración de la coenzima Q, en relación con otros componentes de la CTE, en insectos y en tejido de animales viejos (Farmer & Sohal, 1989; Sohal *et al.*, 1990)

Se ha propuesto que la senescencia se debe a la acción de las ERO sobre el genoma mitocondrial de las células postmitóticas. Numerosos estudios describen la presencia de daño oxidativo tanto en el DNA mitocondrial como en proteínas y lípidos mitocondriales. También se muestran cambios funcionales y morfológicos asociados al envejecimiento.(Shigenaga *et al.*, 1994). Estas alteraciones del ADN mitocondrial puede producir mutaciones puntuales y dar lugar a enfermedades neurodegenerativas (Richter *et al.*, 1988; Linnane *et al.*, 1989). Así pues, las mitocondrias de animales viejos producen más ERO que las de individuos jóvenes (Sohal, 1991) lo que refuerza la teoría de que la producción de pro-oxidantes favorece los procesos del envejecimiento.

## **1.6 El estrés oxidativo y la expresión génica.**

Aparte de los efectos citotóxicos celulares de las especies reactivas de oxígeno al alterar estructural y funcionalmente cualquier molécula activa biológicamente, actualmente se le está prestando una atención especial a la relación entre estrés oxidativo y el control de la expresión génica. El balance intracelular entre prooxidantes y antioxidantes influye la homeostasis celular, y la alteración de este balance hacia estrés oxidativo puede modular una gran variedad de procesos biológicos que inducen cambios en la expresión génica (Dalton *et al.*, 1999). Al menos tres factores de transcripción parecen sensibles al estado redox celular, el factor nuclear kB (NFkB), el activador de proteínas (AP-1) y el receptor activado de proliferador de peroxisoma (PPAR).

Además, una de las formas de evitar variaciones del estado redox hacia ambientes prooxidantes es a través de modulaciones en la expresión génica, induciendo la síntesis de proteínas antioxidantes o enzimas que ayuden a neutralizar ERO del entorno celular. Algunas de las sustancias

que parecen tener efectos más eficaces en la protección del estrés oxidativo en el organismo son las moléculas que estimulan la producción de enzimas o sustancias antioxidantes por medio de factores de transcripción. Un ejemplo de una de estas sustancias son los estrógenos, los cuales parecen ser los responsables de la menor incidencia de problemas cardiovasculares en mujeres menores de 50 años, con respecto a los hombres de la misma edad, así como de la mayor longevidad de la mujer (Vina *et al.*, 2005). Este efecto protector de los estrógenos parece ser debido a su capacidad de actuar frente a factores de transcripción como el NFKb que potencian la transcripción en algunas células de sustancias antioxidantes. De esta forma la sobreexpresión de determinados genes influye de forma directa en el estado redox del individuo. La administración o la presencia en el organismo de sustancias que estimulan la transcripción de enzimas o moléculas antioxidantes, como por ejemplo los estrógenos, los fitoestrógenos o la melatonina, podrían resultar más eficaces contra los procesos de oxidación que la administración directa de algunos antioxidantes (Simonini *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2004).

También hay situaciones que favorecen la expresión génica de enzimas que generan ERO, como es el caso de los procesos inflamatorios. Estos procesos se desencadenan por infecciones traumatismos etc., que dan lugar a la activación de células del sistema inmunitario inespecífico, que a través de factores de transcripción aumentan la expresión de moléculas prooxidantes como la interleucina 6, el TNF  $\alpha$  y la Mieloperoxidasa (MPO), favoreciendo así los procesos de estrés oxidativo. (McGeer & McGeer, 2004; Vina *et al.*, 2005; Dinarello, 2006; Jylha *et al.*, 2007).

Un hecho paradójico que se observa en los mecanismos de regulación de la transcripción de algunos genes, es que en algunas ocasiones el propio estrés oxidativo puede actuar como estimulador de la

producción de antioxidantes endógenos y así estimular al organismo para que disponga de un sistema antioxidante más eficaz frente al estrés oxidativo .(Benzi *et al.*, 1990; Shull *et al.*, 1991; Mo *et al.*, 1995; Benzi & Moretti, 1995b) Por ejemplo, el ejercicio físico es una fuente de producción de ERO, ya que además del aumento de la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP y su consecuente formación de anión superóxido, favorece la actividad de la enzima xantina oxidasa que es una enzima productora de ERO, como hemos visto en apartados anteriores. Pero aún así, según un estudio realizado en Pisa (Italia) en el que se compara marcadores de estrés oxidativo en grupos de atletas frente a grupos de personas sedentarias, parece que tienen más lipoperóxidos, así como una menor capacidad antioxidante en plasma el grupo de individuos sedentarios frente al grupo de deportistas, hecho que se repetía tanto en jóvenes como en adultos (Franzoni *et al.*, 2005). Estos resultados podrían ser debido a que el ejercicio físico continuado ayuda a regular la homeostasis, evitando desequilibrios que afectan a la función endotelial y ayuda a mantener el equilibrio redox.

Existen otras publicaciones que refuerzan la hipótesis de que en ciertas ocasiones, el estrés oxidativo puede ejercer un efecto estimulador de la producción de sustancias antioxidantes. A continuación mostramos algunos ejemplos de estos resultados.

- La administración de antioxidantes puede, en algunas ocasiones, suprimir varios componentes de las defensas endógenas.(Sohal, 1993; Beal, 1995).
- Ji y cols realizaron un estudio que demuestran que el estrés oxidativo provocado por ejercicio físico intenso produce una activación de factores de transcripción como el NF-kB, los cuales podrían mediar la transcripción de genes que protegen a los tejidos frente a las ERO. (Ji *et al.*, 2004).

- La inactivación de catalasa aumentó en un 20 % la concentración de GSH en el cerebro de rata.(de Haan *et al.*, 1992).

Estos hallazgos sugieren que el estado redox de la célula se puede mantener en parte por mecanismos de retroalimentación, y que en ocasiones, la generación de oxidantes estimulan la producción antioxidantes,. Esto nos indica que no en todas las circunstancias la prevención de procesos oxidativos va a tener efectos beneficiosos ya que puede evitar la respuesta reguladora que estimula la generación de antioxidantes. Sin embargo, conviene tener presente que los procesos oxidativos participan como causa o consecuencia en la fisiopatología de numerosos síndromes y enfermedades de carácter inflamatorio, acelerando procesos degenerativos que desencadenan la alteración de las funciones vitales de la células dando lugar a la apoptosis y muerte celular. Estudiar las diferentes situaciones que inducen alteraciones del estado redox y las condiciones individuales de los sujetos en estudio nos permitirá elegir la mejor estrategia que nos permitan paliar los efectos deletéreos de las ERO.

## **2 Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular.**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en occidente. Existen diversos tipos de enfermedades cardiovasculares: hipertensión arterial, enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular cardiaca, accidente cerebro vascular (trombosis o derrame cerebral) y fiebre reumática o enfermedad cardiaca reumática. Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares causan 12 millones de muertes en el mundo cada año y representan la mitad de todas las muertes en los Estados Unidos y otros

países desarrollados. De forma que al estudiar el envejecimiento es interesante tener en cuenta los procesos por los que los vasos sanguíneos van deteriorándose con el paso del tiempo, ya que en estos procesos, el estrés oxidativo puede tener un gran protagonismo.

Hay numerosos estudios que relacionan el estrés oxidativo con procesos relacionados con el deterioro del sistema cardiovascular, como son la formación de la placa de ateroma y la disfunción endotelial (Diaz *et al.*, 1997; Kunitomo, 2007; Zalba *et al.*, 2007; Bonomini *et al.*, 2008), procesos que favorecen la aparición de enfermedades cardiovasculares. La disfunción endotelial y el déficit de óxido nítrico favorecen el desequilibrio redox en el entorno vascular y los procesos de estrés oxidativo (Forstermann, 2008). De esta forma, la edad y el estrés oxidativo desempeñan un importante papel en la aparición de estas patologías.

## **2.1 Factores de riesgo cardiovascular.**

Existen hábitos, patologías, antecedentes o situaciones que aumentan de forma significativa la probabilidad de sufrir algún problema cardiovascular, y se conocen como Factores de Riesgos Cardiovascular (FRC). Estos FRC son aditivos (Neaton & Wentworth, 1992), es decir, que cuantos más factores de riesgo se presenten en un individuo mayor será la probabilidad de sufrir un problema cardiovascular. A continuación enumeraremos los FRC que se consideran más importantes, aunque hay estudios en los que aparecen factores como el consumo de anticonceptivos orales, el consumo elevado de alcohol o tener patologías como la apnea del sueño, de los cuales no vamos a comentar en este estudio pero dependiendo del caso, si podrían tener gran protagonismo a la hora de valorar el riesgo cardiovascular de un individuo.

Hay otras clasificaciones que se utilizan en clínica, pero por resultarnos la forma más intuitiva clasificamos los FRC en 2 grupos.

### **2.1.1 Factores de riesgo personales no modificables**

- 2.1.1.1 Sexo
- 2.1.1.2 Edad
- 2.1.1.3 Herencia o antecedentes familiares

### **2.1.2 Factores de riesgo que pueden corregirse.**

#### **2.1.2.1 Directos**

- 2.1.2.1.1 Niveles de colesterol total y LDL elevados
- 2.1.2.1.2 Niveles de HDL bajos
- 2.1.2.1.3 Tabaquismo
- 2.1.2.1.4 Hipertensión
- 2.1.2.1.5 Diabetes
- 2.1.2.1.6 Tipo de alimentación.

#### **2.1.2.2.Indirectos.**

- 2.1.2.2.1 Sedentarismo
- 2.1.2.2.2 Obesidad
- 2.1.2.2.3 Estrés social

### **2.1.1 Factores de riesgo personales no modificables.**

#### **2.1.1.1 Sexo**

Según las estadísticas, los hombres por debajo de 50 años tienen una incidencia mas elevada de sufrir problemas cardiovasculares que las mujeres de igual edad. Esto puede ser debido al efecto protector que ejercen los estrógenos sobre los vasos sanguíneos y sistema cardiovascular (Vina *et al.*, 2005). Estudios realizados con ratas ovariectomizadas parecen demostrar que los estrógenos protegen los vasos sanguíneos y ayudan de forma significativa a mantenerlos en buen estado durante más tiempo (Garcia *et al.*, 2005; Gimenez *et al.*, 2006).

### **2.1.1.2 Edad**

Aunque el envejecimiento no es causa directa de afecciones coronarias, son más comunes entre las personas de edad avanzada. Con el paso del tiempo los sistemas que regulan la homeostasis del organismo van perdiendo eficacia, los tejidos pierden elasticidad y los sistemas defensivos como el inmunitario o el antioxidante se van debilitando de forma que el organismo es más susceptible de sufrir ciertas patologías, de las cuales las más comunes son las cardiovasculares. Sin embargo, no son parte inevitable del envejecimiento. Los hábitos poco saludables y la acumulación de factores de riesgo, son en muchas ocasiones, más influyentes en la aparición de enfermedades cardiovasculares que la edad del individuo. De la misma forma unos hábitos saludables alargan de forma significativa el buen funcionamiento de los sistemas y el equilibrio homeostático del organismo.

### **2.1.1.3 Herencia o antecedentes familiares.**

Los miembros de familias con antecedentes de ataques cardíacos o de algún otro problema cardiovascular se consideran en una categoría de riesgo cardiovascular alta. Esto puede ser debido a una cuestión genética o quizás a una transmisión de hábitos poco saludables de padres a hijos.

## **2.1.2 Factores de riesgo que pueden corregirse.**

### **2.1.2.1 Directos**

#### **2.1.2.1.1 Niveles de colesterol total y LDL elevados.**

El colesterol es un lípido que pertenece del grupo de los esteroides y que forma parte de las membranas celulares. Las fuentes de colesterol

pueden ser exógenas por la dieta, o endógena por reacciones anabólicas en el retículo endoplasmático celular. Debido a naturaleza hidrofóbica, forma parte de Lipoproteínas para su transporte por el torrente sanguíneo. Las lipoproteínas pueden ser de baja densidad como las LDL, de alta densidad como las HDL o de muy baja densidad como las VLDL. El aumento de las moléculas de LDL en el plasma sanguíneo favorece la formación de la placa de ateroma (Diaz *et al.*, 1997) así como aumenta la densidad de la sangre favoreciendo la aparición de trombos. De esta forma los valores altos de colesterol en sangre están considerados como un factor de alto riesgo cardiovascular aumentando de forma muy significativa la probabilidad de sufrir un problema cardiaco, hecho demostrado en el estudio Framingham (Kannel *et al.*, 1979). La relación entre concentraciones plasmáticas de colesterol y mortalidad, es directa, continúa y aunque no existe un valor concreto en el que podríamos decir que empieza el riesgo, este valor podría estar entre los 180 a 200 mg/dl. A partir de 200 mg/dl, el riesgo coronario aumenta de forma más acentuada, de modo que un sujeto con colesterol entre 240 mg/dl y 300 mg/dl tiene un riesgo coronario muy superior al de un sujeto con un colesterol inferior a 200 mg/dl (Stamler *et al.*, 1986). Con la edad y el paso del tiempo los mecanismos de regulación del colesterol van perdiendo efectividad y al organismo le resulta más difícil mantener la homeostasis. En este sentido, con la edad la dieta parece desempeñar un papel más determinante sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol. Además de la edad y el sobrepeso, existen otros factores que intervienen en la relación de estos marcadores como son hábito de fumar, tipo de dieta, factores genéticos, HTA etc...

#### **2.1.2.1.2 Niveles de HDL bajos.**

También ha sido ampliamente comprobado en numerosos estudios el valor predictivo de los niveles HDL en relación inversa a la aparición de enfermedades cardiovasculares (Windler *et al.*, 2007). Sin embargo,

todavía no hay evidencias de que el tratamiento dirigido específicamente a aumentar los niveles de HDL en plasma sean eficaces en la prevención cardiovascular, aunque se están realizando estudios en esta dirección.

#### **2.1.2.1.3 Tabaquismo.**

El tabaco produce una contaminación de niveles incrementados de adrenalina, ritmo cardíaco acelerado, elevación de la presión sanguínea, falta de oxígeno en las células y daños en las paredes de las arterias. El resultado de todos estos procesos han sido suficientemente comprobados en numerosos estudios epidemiológicos en los que se ha encontrado una alta correlación entre el hábito de fumar y la morbilidad o mortalidad por enfermedad cardiovascular (Lannerstad, 1980).

#### **2.1.2.1.4 Hipertensión arterial.**

La Hipertensión arterial obliga al corazón a trabajar con más esfuerzo, lo que en un periodo de tiempo suficientemente largo puede provocar una hipertrofia con insuficiencia cardíaca. Por otra parte, la presión sanguínea alta mantenida daña las células endoteliales de las arterias, facilita la arteriosclerosis y provoca un aumento de rigidez en las arterias. Esto daña los vasos, y a menudo se ve dificultada la distribución de oxígeno en los tejidos sobre todo cuando la demanda aumenta, favoreciendo procesos de isquemia y en el peor de los casos infarto y muerte celular (Messerli *et al.*, 2007).

Se considera Hipertensión arterial a valores de presión superiores a 140/90 mmHg, aunque según la campaña de formación sobre riesgo cardiovascular Cardio Alert (2004-2008), patrocinada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, se considera sin evidencia relacionada con mortalidad sólo por debajo de 115/75 mmHg.

### **2.1.2.1.5 Diabetes**

Estudios epidemiológicos han demostrado que los pacientes con diabetes mellitus e intolerancia a la glucosa tienen un riesgo incrementado para padecer alguna enfermedad cardiovascular. En los primeros 20 años del estudio Framingham la incidencia cardiovascular entre hombres con diabetes mellitus fue dos veces superior que en aquellos sin diabetes (Kannel & McGee, 1979). Y fue tres veces mayor la incidencia de enfermedad cardiovascular entre las mujeres diabéticas que las no diabéticas. Así pues, parece ser que mantener de forma continuada altos valores de glucosa en sangre puede favorecer la aparición de complicaciones de origen vascular como alta concentración de lípidos en sangre, enfermedades coronarias, hipertensión y otros problemas circulatorios

### **2.1.2.1.6 Hábitos alimenticios.**

El efecto de la alimentación sobre el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, es más bien de tipo indirecto ya que modificando ciertos hábitos podemos modificar de forma efectiva valores como el colesterol o la hipertensión. Por ejemplo, los hábitos alimentarios ricos en grasas de origen animal, azúcares, sal o alcohol en grandes cantidades aumentan de forma significativa la concentración de colesterol y LDL en sangre y favorecen la aparición de hipertensión arterial entre otras complicaciones (Esposito *et al.*, 2007).

Sin embargo existen variables dependientes de la dieta que afectan de forma directa a la protección de los vasos sanguíneos. El consumo de antioxidantes, fibra, ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos  $\omega$ -3 favorece el flujo sanguíneo de forma directa y aumenta la vida media de las arterias (Ortega, 2006; Ruel & Couillard, 2007).

## **2.1.2.2. Indirectos.**

### **2.1.2.2.1 Sedentarismo**

La mayoría de los estudios relacionados con ejercicio físico y riesgo cardiovascular coinciden en que la práctica del ejercicio físico, incluso un ejercicio físico moderado, ayuda a disminuir la presión sanguínea y los niveles de colesterol. Además favorece la pérdida de peso y la asimilación de hidratos de carbono (Windler *et al.*, 2007; Slentz *et al.*, 2007).

### **2.1.2.2.2 Obesidad.**

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y favorece de forma directa el desarrollo de hipertensión arterial, diabetes e hipercolesterolemia. Las personas obesas tienen una gran cantidad de grasa acumulada en los tejidos, esto hace que aumenten las resistencias periféricas, y sobrecarga la actividad del corazón. De esta forma, la obesidad a medio plazo, puede provocar enfermedades coronarias (Mighty & Fahey, 2007).

### **2.1.2.2.3 Estrés Social.**

Diversos estudios epidemiológicos consideran que el tipo de personalidad y la capacidad de las personas para manejar el estrés son factores importantes para la salud y la calidad de vida. El estrés así como la urgencia o la gravedad en la que nuestro cerebro interpreta y recibe las actividades o estímulos cotidianos, tiene un importante componente subjetivo. Las personas con mayor capacidad para la paciencia, menos irascibles, y con mayor calma para afrontar imprevistos y problemas cotidianos, poseen un factor de protección frente a la aparición de enfermedades cardiovasculares (Everson-Rose & Lewis, 2005; Smith & MacKenzie, 2006).

El estrés fisiológico actúa produciendo un sobre-expresión de hormonas adrenérgicas como la adrenalina, que a su vez movilizan las reservas de glucógeno, aumentando la presión sanguínea y el ritmo cardiaco. Cuando esta sobre-estimulación se prolonga en el tiempo y se convierten en comportamientos o respuestas cotidianas del individuo, podrían causar a al larga, daños en el sistema cardiovascular así como arritmias e hipertensión entre otras patologías.

## **2.2. Índice de Framingham.**

Como venimos comentando, las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. Por ello existe un gran interés en el desarrollo de los modelos de predicción del riesgo de padecer enfermedades de este tipo, tanto para intentar intervenirlas precozmente mediante medidas preventivas, o en su momento con tratamientos adecuados.

Posiblemente, el estudio más importante realizado sobre la enfermedad cardiovascular y los factores de riesgo asociados a ella, es el estudio Framingham. En 1948 se inició un estudio prospectivo a largo plazo sobre las enfermedades cardiovasculares en la población general adulta de la ciudad de Framingham, Massachusetts, con el propósito de investigar la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y los factores, tanto del huésped como ambientales, que pueden contribuir a su desarrollo.

Desde entonces hay cientos de artículos publicados sobre este estudio, desde el año 1951 (DAWBER *et al.*, 1951) a nuestros días. También existen numerosas páginas y referencias en Internet sobre el estudio Framingham, como por ejemplo ([www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/index.html](http://www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/index.html)). Con el paso de los años,

este estudio ha ayudado en la identificación de los factores de riesgo más importantes para la enfermedad cardiovascular como la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial, el tabaco, la diabetes mellitus, la obesidad y el sedentarismo; y a suministrado información valiosa sobre otros factores relacionados, como la edad, el sexo, la hipertriglicemia, la disminución del complejo lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol), algunos factores trombogénicos y las situaciones psicosociales adversas (stress).

A raíz de los resultados y conocimientos obtenidos, se calculo una fórmula matemática con el fin de poder estimar el riesgo de que una persona en concreto pueda tener una enfermedad cardiovascular. Para ello se han utilizando los valores de los factores de riesgo cardiovascular más importantes. Así pues, con la fórmula Framingham podemos obtener la probabilidad que tienen un individuo de padecer un problema cardiovascular en los próximos 10 años.

Según algunos autores, el estudio Framingham aplicado a poblaciones Europeas, sobreestima el Riesgo en la población caracterizada por la baja incidencia de eventos cardiovasculares respecto al lugar de origen del estudio Massachussets (EEUU). Por este motivo se realizó el modelo Score que pretendía siguiendo las bases del Framingham, acercarse más a la realidad de las poblaciones europeas. Según estudios realizados en la población europea parece ser que este marcador sigue sobre estimando el riesgo cardiovascular de los pacientes y los resultados no corresponden con la realidad de la población (Neuhauser *et al.*, 2005), al igual de lo que parecía esperar del estudio Framingham. Por otro lado, se realizó un estudio con población asiática comparando varios modelos de marcadores de riesgo cardiovascular (Bhopal *et al.*, 2005) y se observó que el Framingham se acercaba más a la realidad de la población, posiblemente porque en el estudio Score no tienen en cuenta si los

pacientes son o no diabéticos, así como los niveles de HDL, factores que se consideran importantes para la estimación del riesgo cardiovascular. Por ello, pensamos que la obtención del Índice de Framingham en nuestro estudio puede ser una herramienta eficaz para estudiar asociaciones entre variables relacionadas con inflamación y estrés oxidativo, lo que llamaremos variables resultado, con una valoración homologada y sintetizada de riesgo cardiovascular. Además, con la peculiaridad de que el índice de Framingham incluye la edad y el sexo en su formulación. Nosotros no pretendemos hacer estimaciones de riesgo cardiovascular que sirvan de diagnóstico, ni de comparación entre poblaciones, de tal forma que el pequeño reajuste que requiere el Índice de Framingham para que la estimación fuera más real al tratarse de una población española, no resulta importante en nuestro caso

Por todo lo expuesto anteriormente en nuestro estudio hemos aplicado la fórmula para el cálculo del riesgo cardiovascular según el modelo de Framingham.

### **3. Variables resultado de nuestro estudio.**

Además de las variables que se utilizan en la práctica clínica habitual como son glucemia, creatinina, colesterol,..etc, se han determinado las concentraciones de otras moléculas en suero o plasma relacionadas con el estrés oxidativo y el riesgo cardiovascular que describimos a continuación.

#### **3.1 Homocisteína.**

A fines de la década del 60, Mc Cully describió la asociación entre los niveles elevados de homocisteína y el daño vascular. Esto lo hizo al reportar en niños con altos niveles plasmáticos de homocisteína y homocisteinuria severas trombosis arteriales y aterosclerosis (Welch &

Loscalzo, 1998). Estudios posteriores avalaron esta descripción, y en la actualidad ya se ha demostrado que la hiper-homocisteinemia es un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular arterosclerótica, tanto coronaria, cerebrovascular como vascular periférica (Welch & Loscalzo, 1998). Otros autores son más reservados al respecto y sólo la aceptan como un marcador de enfermedad vascular (Hankey & Eikelboom, 1999). La hiperhomocisteinemia posee una prevalencia en la población general del 5 al 7%. (Welch & Loscalzo, 1998)

### **3.1.1 Metabolismo de la homocisteína**

La homocisteína es un aminoácido que se origina a partir de la desmetilación sucesiva de la metionina, a través de dos pasos metabólicos. Inicialmente la metionina es desmetilada a 5-adenosilmetionina, pasando luego a 5-adenosilhomocisteína, para finalmente transformarse en homocisteína.

Un fallo en la vía de remetilación debido a hipovitaminosis conduciría a una hiperhomocisteinemia de ayuno, mientras que un fallo de la vía de transulfuración sería responsable de la hiperhomocisteinemia secundaria a una carga dietética de metionina. Aproximadamente del 70 al 80 % de la homocisteína circulante lo hace unida a proteínas (albúmina), constituyendo el resto su fracción libre. Se considera hiperhomocisteinemia si la concentración supera los 15 Micromol/L y puede producirse a partir de dos mecanismos fisiopatológicos:

**1** - una deficiencia enzimática en alguno de los pasos de su metabolismo. El más prevalente es la presencia de una variante termolábil de la 5-metiltetrahidrofolato reductasa (enzima del ciclo del folato) (Kang *et al.*, 1988)

**2** - una deficiencia en una o varias de las vitaminas hidrosolubles que participan de su metabolismo, de hecho el tratamiento con el ácido fólico, la vitamina B6 y la vitamina B12 baja los niveles de homocisteína.

Las elevaciones plasmáticas de Homocisteína se asocian a procesos de aterosclerosis prematura y a trombosis de origen coronario, cerebral, periférico o venoso. Diversos estudios han mostrado en estos últimos años que incluso los niveles moderadamente elevados de homocisteína aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. (Kang *et al.*, 1988; Marcus *et al.*, 2007), siendo hoy día la hiperhomocisteinemia reconocida como un marcador de riesgo cardiovascular independiente. Se han realizado estudios epidemiológicos que indican a que las poblaciones masculinas parecen tener una mayor tendencia a tener mayores concentraciones de Homocisteína que las femeninas. También se han encontrado diferencias entre las población de mujeres posmenopáusicas con respecto a las mujeres premenopáusicas, siendo este último grupo el que tiende a tener una menor concentración de esta molécula en sangre (De *et al.*, 2002).

Un posible mecanismo por el cual la Homocisteína incrementa el riesgo cardiovascular puede ser por medio del estrés oxidativo. Perna y cols. sugieren que los valores altos de Homocisteína favorecen el estrés oxidativo, dañan la función endotelial e incrementan la oxidación de LDL en plasma (Perna *et al.*, 2003). Además, hay estudios que relacionan la Homocisteína con procesos inflamatorios relacionados con la respuesta auto inmune (Wierzbicki, 2007).

### 3.2 Proteína C Reactiva.

La Proteína C Reactiva (PCR) se produce en el hígado cuando hay una infección o inflamación aguda en el organismo. Este incremento se debe a un aumento en la concentración plasmática de IL-6 (Woodward *et al.*, 2003; Cesari *et al.*, 2003), que es producida por macrófagos, células endoteliales y linfocitos T, como también lo hacen los adipocitos y otras células del sistema retículo endotelial. La PCR se liga a la fosforilcolina de los microbios. Se piensa que colabore al complemento ligándose a células extrañas y dañadas, y que realce la fagocitosis realizada por macrófagos, quienes expresan un receptor para PCR. También se ha sugerido que desempeña un papel importante en la inmunidad innata, como un sistema de defensa temprano contra infecciones. Es una proteína de fase aguda y se incrementa en el suero en una gran variedad de enfermedades inflamatorias. Aumenta ante un proceso inflamatorio o infeccioso y desaparece en la etapa de recuperación (solamente aumenta en la fase activa del proceso).

Entre las condiciones que producen cambios marcados en PCR se incluyen infección, trauma, cirugía, quemaduras, artritis, fiebre reumática, infarto del miocardio, infarto pulmonar y cáncer avanzado. Se han medido cambios leves o moderados con el ejercicio, durante el parto, tras transfusiones sanguíneas y en algunas enfermedades psiquiátricas.

La inflamación es una fuente de producción de ERO, por lo que desempeña un papel importante en el deterioro de los vasos y tejidos del sistema cardiovascular cuando es un proceso crónico. Por esto, hay numerosos estudios que relacionan la concentración plasmática de PCR con el riesgo cardiovascular y el ataque cardíaco (Woodward *et al.*, 2003; Cesari *et al.*, 2003; Fortmann *et al.*, 2004).

Además de encontrarse altas concentraciones de esta molécula en plasma en cuadros infecciosos y en algunas patologías, se ha descrito que

con la edad las concentraciones de PCR tienden a aumentar, asociándose no sólo con factores de riesgo cardiovascular (Wilson *et al.*, 2005), sino también con marcadores de estrés oxidativo (Dohi *et al.*, 2007).

Se ha realizado un estudio reciente en que se documenta una mayor concertación de PCR en una población Boliviana con respecto a una población de E.E.U.U. Este autor expone la hipótesis de que quizá el hecho de que la concentración de PCR aumente con la edad este influenciada por la exposición del individuo a infecciones o enfermedades crónicas, las cuales son mas comunes en países pobres, (Gurven *et al.*, 2008). De esta manera, la concentración de PCR o el grado de inflamación crónica de la población estaría afectando a esperanza de vida de los individuos.

Otros autores relacionan la concentración de PCR con factores antropométricos como son el IMC y la circunferencia de cintura. Un estudio realizado en una población Europea frente a otra Asiática encuentra una mayor concentración de PCR en la población asiática, desapareciendo las diferencias entre ambas poblaciones al introducir en regresión múltiple el IMC o la circunferencia de cintura. También se han encontrado diferencias entre sexos, relacionando significativamente en mujeres el IMC y la circunferencia de cintura con la PCR, resultando que en mujeres con índices similares de circunferencia de cintura que hombres, se aprecian mayores concentraciones de PCR (Lear *et al.*, 2003).

### **3.3 Mieloperoxidasa.**

La mieloperoxidasa es una enzima ampliamente distribuida y sus fuentes fundamentales las constituyen los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos, a pesar de que ha sido aislada a partir de diferentes fluidos biológicos: saliva, líquido sinovial y semen, entre

otros (van den *et al.*, 1992; Wolff *et al.*, 1992). También se ha aislado en diferentes tejidos como en corazón, riñón, piel, hígado y placenta (Komatsu *et al.*, 1992; Meuwese *et al.*, 2007). No obstante, el origen más importante son los neutrófilos, donde la enzima se encuentra localizada a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos. Constituye del 2-5 % de las proteínas del neutrófilo (Marquez *et al.*, 1990).

La mieloperoxidasa es la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos; sin embargo, puede ser capaz de actuar sobre las células del propio organismo en el caso de una activación prolongada y extendida de esta enzima. En estos casos, el alto poder oxidante del ácido hipocloroso participaría en el desajuste del estado redox, y consecuentemente podría provocar estrés oxidativo sistémico. Dado el amplio espectro de reactividad, el ácido hipocloroso es un mediador del daño a células y tejidos en numerosos procesos inflamatorios.

El incremento de la actividad de la MPO se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas (locales o sistémicas), las enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide) y la isquemia/reperfusión. En estos casos se ha encontrado un aumento significativo de la actividad de MPO, en proporción directa al número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que se puede utilizar su actividad como índice de migración leucocitaria y por lo tanto de estrés oxidativo (Komatsu *et al.*, 1992; Alfonso de Vega *et al.*, 2002). La MPO es capaz de generar especies reactivas que dañan lípidos y proteínas (Savenkova *et al.*, 1994), y parece contribuir a la aterogénesis a través de las reacciones oxidativas que

ésta cataliza. El sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al tener como sustrato la L-tirosina produce el radical tirosilo, que es capaz de estimular la peroxidación lipídica. Esta peroxidación es vital para la transformación de las LDL en partículas aterogénicas (Savenkova *et al.*, 1994). Hay autores que apuestan por la MPO como uno de los principales marcadores de estrés oxidativo (Tsimikas, 2006).

La activación leucocitaria y su adhesión al endotelio vascular liberaría MPO que podría la función endotelial y favorecer la formación de la placa de ateroma (Lau & Baldus, 2006). La MPO participa en procesos inflamatorios crónicos que se desarrollan en gran medida con la edad, y podrían favorecer la aparición de enfermedades cardiovasculares. De esta forma, se ha descrito como uno de los principales marcadores de enfermedad vascular coronaria (Baldus *et al.*, 2003; Tsimikas, 2006).

Por otro lado, en enfermos críticos la MPO actúa también como marcador de respuesta inflamatoria sistémica y se correlaciona significativamente con índices de gravedad (Alonso de Vega *et al.*, 2000; Alonso de Vega *et al.*, 2002).

### **3.4 Malonildialdehido (MDA)**

Las membranas celulares están formadas principalmente por ácidos grasos poliinsaturados (Pufa) que forman parte de la familia de los fosfolípidos. En un entorno de estrés oxidativo estos ácidos grasos sufren procesos de oxidación debido a la acción de las ERO, estos procesos oxidativos que sufren estos lípidos son conocidos como peroxidación lipídica. Esta peroxidación es uno de los procesos más importantes ejercidos por los radicales libres a la célula ya que la destrucción de estos ácidos grasos junto con la formación de puentes

disulfuro, deterioran la permeabilidad de la célula y afecta de forma importante a sus funciones, llegando a producir lisis y muerte celular.

El Malonildialdehído (MDA) es un producto final de oxidación que se genera tras la oxidación de las membranas biológicas. Este compuesto es el más común de los conocidos como lipoperóxidos, y se utiliza como marcador de estrés oxidativo en plasma y tejidos (Diaz *et al.*, 1998; Block *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2006)(Carbonell *et al.*, 2007).

En algunos trabajos sobre envejecimiento han analizado la relación del MDA con la edad, utilizando el MDA y otros productos de la lipoperoxidación lipídica como marcadores directos de estrés oxidativo. En el estudio de Gil *et al.* (2006) realizado sobre 198 individuos con edades comprendidas entre los 18-84 años, se encontró correlación entre MDA y edad. También Mecocci, obtuvo concentraciones de MDA superiores en individuos mayores de 70 años respecto a individuos con edades inferiores a los 60 años (Mecocci *et al.*, 1999). Sin embargo, en un estudio realizado en California con un total de 298 personas con edades comprendidas entre los 18-78 años, no se encuentran correlaciones significativas entre el MDA y edad, así como tampoco con otros marcadores de estrés oxidativo (Block *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que el MDA sería un buen candidato como indicador biológico de estrés oxidativo (Block *et al.*, 2002; Franzoni *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2006).

### **3.5 Ácido Úrico.**

El ácido úrico es un producto de desecho del metabolismo de las purinas y los ácidos nucleicos. La Xantina oxidasa es responsable de la

formación de Ácido Úrico a partir de Xantina o hipoxantina. En la sangre humana, la concentración de ácido úrico comprendida entre 3,6 y 8,3 mg/dl es considerada normal por la Asociación Médica Americana, aunque se pueden encontrar niveles más bajos en los vegetarianos. (Lippi *et al.*, 2008).

La gota en el hombre está asociada con niveles anormales de ácido úrico en el sistema. La alta concentración de ácido úrico en sangre puede dar lugar a un tipo de cálculos renales cuando el ácido cristaliza en el riñón. Un porcentaje considerable de enfermos de gota llegan a tener cálculos renales de tipo ácido úrico. La alta concentración de ácido úrico en sangre se trata con Allopurinol un inhibidor de la enzima Xantina Oxidasa. (Lippi *et al.*, 2008).

Durante décadas a la molécula de ácido úrico se le han atribuido propiedades antioxidantes, así que su presencia, en teoría, podría ejercer un efecto protector frente a la acción de las ERO (Lippi *et al.*, 2008). En estos últimos años se ha hablado mucho del ácido úrico como un factor de riesgo cardiovascular independiente, y la relación de la concentración de ácido úrico en sangre con la aparición de enfermedades vasculares. Existen resultados contradictorios sobre este tema y no hay consenso entre los distintos autores sobre si realmente la alta presencia de ácido úrico en sangre podría ser un factor independiente de riesgo cardiovascular e incluso de estrés oxidativo, o un marcador de enfermedad cardiovascular (Glantzounis *et al.*, 2005; Schachter, 2005; Dawson *et al.*, 2007; Lippi *et al.*, 2008). Recientemente se ha descrito que en pacientes de alto riesgo cardiovascular el ácido úrico actuó como preedictor independiente de mortalidad (Ioachimescu *et al.*, 2008a). Por lo tanto, parece que el Ácido Úrico podría estar vinculado a la enfermedad cardiovascular, aunque no hay evidencias claras acerca de cual sería el mecanismo de acción por el cual, el ácido úrico participaría de modo activo

en el deterioro del sistema cardiovascular. Sobre este aspecto, Guiseppe Lippi postula en una reciente publicación, que debido a que el Ácido Úrico es un producto de la enzima xantina oxidasa en la reacción de formación del anión superóxido, la concentración de Ácido Úrico sería directamente proporcional a la formación de esta ERO (Lippi *et al.*, 2008). De esta forma el Ácido Úrico estaría actuando como indicador de la formación de anión superóxido y quizá esta circunstancia favorezca su vinculación al riesgo cardiovascular, ya que el anión superóxido altera la función endotelial y favorece la formación de la placa de ateroma (Diaz *et al.*, 1997).

Por otra parte este mismo autor expone que a altas concentraciones una molécula antioxidante como es el ácido úrico, podría comportarse como pro-oxidante, actuando de forma similar a las ERO y favoreciendo así el progresivo deterioro del sistema cardiovascular, hecho que podría ayudar a explicar la relación entre el ácido úrico y el riesgo cardiovascular, aunque no deja todavía de ser una hipótesis (Lippi *et al.*, 2008).

## **4. Críticas a la teoría del estrés oxidativo en el envejecimiento.**

Una posible objeción a la teoría de la participación del estrés oxidativo en el proceso del envejecimiento es que no explica por qué los cambios son graduales e irreversibles. Si el envejecimiento se debiera sólo al aumento de ERO y a una disminución relativa de antioxidantes endógenos, con la administración de antioxidantes se podría retrasar los procesos del envejecimiento. Estudios experimentales de restricción dietética y suplemento antioxidante en ratón, rata e insectos no

aumentaron el tiempo de vida máximo de estas especies; sólo se logró que más individuos lo alcanzaran y mejoró la calidad de la vida (HARMAN, 1956b; Sohal, 1993).

Pero hay autores (Hayflick, 1985; Medvedev, 1990) que teniendo en cuenta los resultados de varios ensayos clínicos en los cuales miles de personas fueron tratadas con Vitamina E, vitamina C o Vitamina A, para la resolución o prevención de diferentes patologías interpretan que la teoría de los radicales libres ha sido ya descartada por los numerosos resultados negativos obtenidos (Howes, 2006).

## **5. Justificación del estudio.**

El envejecimiento es un proceso multifactorial en el que el estrés oxidativo parece desempeñar un papel importante. Existen numerosos resultados de estudios expuestos en apartados anteriores que avalan esta teoría, aunque también hemos encontrado algunas contradicciones. Esto podría ser debido a que existen numerosos factores que afectan al estrés oxidativo relacionados con los hábitos dietéticos, costumbres, ejercicio físico, factores genéticos, etc, que es posible que intervengan significativamente en la relación entre el estrés oxidativo y la edad, así como en otros aspectos del envejecimiento.

Por otro lado, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y está muy documentado en la bibliografía que las ERO y el estrés oxidativo participan en la fisiopatología de estas enfermedades (Kunitomo, 2007; Zalba *et al.*, 2007; Bonomini *et al.*, 2008). Además, la edad es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. Con todo lo expuesto anteriormente creemos justificada la realización del presente estudio donde

relacionaremos la edad con otros factores de riesgo cardiovascular y con marcadores de estrés oxidativo.

De esta forma, en la presente memoria de tesis doctoral proponemos la realización de un estudio epidemiológico piloto observacional y transversal realizado sobre miembros de nuestra comunidad, en donde se reflejen las relaciones existentes entre el estado redox del plasma, con la edad, el sexo, hábitos alimenticios, patologías con alta tasa de morbilidad-mortalidad, y con marcadores de riesgo cardiovascular. Los resultados del estudio nos pueden proporcionar la base para un mejor conocimiento de cuáles son los factores o hábitos más influyentes en este tipo de procesos degenerativos. A partir de este punto, se podrían estudiar estrategias que incidan de manera significativa en la salud de nuestra población, y especialmente en la salud del segmento de población de mayor edad, que cada vez representa un mayor porcentaje de la población y que es susceptible por razones obvias, de sufrir más patologías de tipo crónico.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

---



## **Hipótesis:**

El estrés oxidativo se relaciona con factores de riesgo cardiovascular e interviene en los procesos de deterioro cardiovascular asociados al envejecimiento humano.

## **Objetivos del estudio:**

1. Describir y analizar factores asociados al riesgo cardiovascular a lo largo del proceso natural del envejecimiento humano y su relación con marcadores de estrés oxidativo.
2. Establecer posibles relaciones entre ciertos hábitos nutricionales y el estrés oxidativo en una población sana de amplio rango de edad.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

---



# Material y Métodos

## 1. Características generales del estudio.

Se han incorporado un total de 161 personas de las cuales 54 fueron identificadas como hombres y 104 como mujeres. Las edades de los pacientes están comprendidas entre 16 y 90 años. Todos son residentes en Murcia. El reclutamiento de los sujetos se ha llevado a cabo gracias a la colaboración de 14 médicos de familia pertenecientes a 3 centros de salud del área metropolitana de la región de Murcia que son:

1. Centro de Salud de Santa Maria de Gracia
2. Ambulatorio de Espinardo.
3. Ambulatorio de Guadalupe.

Los criterios de inclusión y exclusión utilizados para la incorporación de los pacientes en el estudio son los siguientes:

### 1.1 Criterios de inclusión:

Los pacientes deberán cumplir cada uno de los siguientes criterios.

4. Individuos atendidos en el ámbito ambulatorio del área metropolitana de la ciudad de Murcia, sanos o con patología tratada y compensada.
5. Edad comprendida entre 14 y 90 años.
6. Que el médico, por un motivo ajeno a este estudio, tenga la intención de hacerle un estudio analítico que implique una extracción de sangre

### 1.2 Criterios de exclusión:

Los pacientes no deberán cumplir cualquiera de los siguientes criterios.

3. Antecedentes de isquemia coronaria, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardiaca, enfermedad pulmonar

obstruktiva crónica, inmunodeficiencias, tratamiento renal sustitutivo ó procesos tumorales.

4. Incapacidad para otorgar el consentimiento informado para poder utilizar sus datos en el estudio o que se niegue a hacerlo.

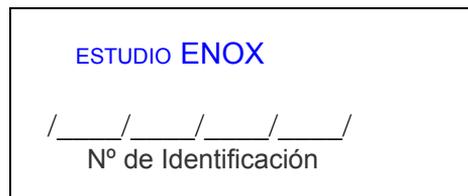
## **2. El protocolo.**

El protocolo es un documento en el que se aporta toda la información y los procedimientos para la realización del estudio. Este consta de 3 apartados, el primero contiene 15 puntos, que ocupan un total de 11 páginas, en donde aparece detalladamente toda la información y procedimientos requeridos por los médicos y personal sanitario para la realización del mismo. El segundo apartado contiene cuatro anexos con documentos relacionados con el mismo y el tercer punto, son los Cuadernos de Recogida de Datos (CRD). Los CRD son una parte importante del estudio, ya que son los documentos en donde el médico recoge toda la información que se le requiere al paciente. Consta de 6 páginas, más 2 copias del consentimiento informado, que firma cada paciente cuando accede a su inclusión en el estudio. Cada encuadernación del protocolo contiene 20 copias del CRD, ya que este es el número máximo de personas que incluirá cada uno de los médicos en el estudio.

Se le ha asignado un nombre corto al estudio, con el fin de poder referirnos a él de forma más adecuada en el día a día del ambulatorio, y en el trato con el personal sanitario. El nombre corto asignado a este estudio es *Estudio Enox*.

En este tipo de estudios el procedimiento de recogida de datos así como el interés y el rigor con el que se rellenen los cuestionarios, es vital para obtener unos datos fiables, de los cuales se puedan extraer conclusiones. Por lo tanto, que los procedimientos estén perfectamente

detallados en el protocolo, desde que el paciente entra en la consulta, hasta que el investigador pasa los resultados a la base de datos para su análisis, es muy importante para la calidad de los mismos. También, hay que prever las posibles dudas o complicaciones que puedan surgir, y especificarlas en los procedimientos a seguir, con el fin de que todos los médicos o investigadores sigan el mismo criterio y los datos estén lo menos sesgados posible. Por este motivo el seguimiento de los médicos y la comunicación con los mismos tanto por teléfono como presencialmente, fue diario en el periodo de la inclusión de los pacientes y en la recogida de los datos en el estudio. Este periodo se extendió desde Octubre del 2004 hasta Junio del 2005. Diariamente se recogieron las muestras por los ambulatorios las cuales eran llevadas al laboratorio del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia para su almacenaje en el congelador. Los tubos de sangre que se extraían para el estudio, se marcaron con unas etiquetas especiales que fueron facilitadas al personal sanitario ( figura 2) . En ellas quedaba reflejado el número de identificación del paciente, que el médico previamente le había asignado, con el fin de que el investigador identificara las muestras. Cada muestra que se recibía en el laboratorio se ha sido apuntada en un registro de entrada, en donde queda constancia de la fecha en la que se había recibido la muestra y a su vez se la asignaba un nuevo código para su posterior análisis.



**Figura 2.** Etiquetas que se facilitaban a el personal sanitario para marcar los tubos de sangre e identificar a los pacientes.

Se entregó un protocolo a cada uno de los médicos que accedieron a realizar este estudio, después de una charla de presentación del mismo, impartida en los centros de Salud. El formato que se ha seguido en la redacción y la organización de diferentes apartados del protocolo, es el formato estándar que se sigue para los protocolos de ensayos clínicos, manteniendo el esquema y los procedimientos habituales en este tipo de estudios clínicos.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado que autoriza al investigador a tener acceso a su historia clínica. Todas las personas implicadas en el estudio respetaron las normas de la Declaración de Helsinki de 1975, revisadas en 1983.

La información acerca del tipo de hábitos dietéticos del paciente ha sido obtenida por un cuestionario de frecuencias alimenticias, que viene incluido en CRD como la hoja número 6 del mismo. A continuación adjuntamos una copia del protocolo así como una copia del CRD en el cual se recogieron los datos.



**Figura 3.** Foto de la encuadernación del protocolo, idéntica a la entregada a los médicos para la realización del estudio.

ESTUDIO  
**ENOX**

**Análisis del estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento y su relación con factores de riesgo cardiovascular. Estudio piloto observacional.**

**Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Murcia**



**índice**

<b>1. Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Objetivos del estudio.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Promotor del estudio.....</b>	<b>4</b>
<b>5. Diseño del estudio.....</b>	<b>5</b>
<b>6. Selección de los médicos participantes.....</b>	<b>5</b>
<b>7. Población del estudio.....</b>	<b>5</b>
<b>8. Tamaño muestral.....</b>	<b>6</b>
<b>9. Variantes del estudio.....</b>	<b>6</b>
<b>10. Plan de trabajo.....</b>	<b>8</b>
<b>11. Comité científico.....</b>	<b>9</b>
<b>12. Aspectos éticos.....</b>	<b>9</b>
<b>13. Análisis de datos.....</b>	<b>9</b>
<b>14. Calendario del estudio.....</b>	<b>10</b>
<b>15. Publicación de resultados.....</b>	<b>11</b>
<b>Anexo 1. Compromisos del investigador.....</b>	<b>13</b>
<b>Anexo 2. Bibliografía.....</b>	<b>14</b>
<b>Anexo 3. Guía Práctica para el médico.....</b>	<b>15</b>
<b>Anexo 4. Informe de la comisión de bioética .....</b>	<b>17</b>

**Por Paciente :**

**Consentimiento informado del paciente**

**Cuaderno de recogida de datos**

**Cuestionario de frecuencias alimenticias**

**( Cada cuaderno contiene la documentación para la inclusión en el estudio de 20 pacientes).**

## 1. Resumen.

En el presente estudio proponemos, mediante un estudio observacional transversal, describir y analizar en sujetos pertenecientes a la población urbana de la Región de Murcia, el estado redox a lo largo del proceso natural de envejecimiento y las variaciones que éste experimenta en presencia de distintos factores asociados con riesgo cardiovascular. El estudio se realizará en 200 individuos sanos o con patología tratada y compensada a los que el médico de cabecera les ofrecerá participar de forma anónima. Tras la obtención del preceptivo consentimiento informado, el médico recogerá datos clínicos y antecedentes personales, asegurándose que cumplan los requisitos de inclusión (edades comprendidas entre 14 y 90 años), y que no presentan criterios de exclusión: pacientes con antecedentes de episodios de enfermedad isquémica coronaria, insuficiencia cardíaca, accidentes cerebro-vasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o inmunodepresión. Cada sujeto responderá a un cuestionario sobre su dieta y hábitos, y se le extraerá una muestra de sangre venosa periférica para su posterior análisis específicos. Las variables del estudio serán: 1) Variables resultado: marcadores plasmáticos del estado redox: isoprostanos, lipoperóxidos, capacidad antioxidante total del plasma, grupos tioles reducidos, LDL-colesterol oxidada. 2) Variables individuales: edad, peso, talla, presión arterial, sexo y profesión. 3) Variables independientes y factores de exposición: marcadores biológicos (glucosa, triglicéridos, colesterol, homocisteína y proteína C reactiva ultrasensible), dieta y hábitos, y consumo de fármacos y suplementos vitamínicos. Los datos

obtenidos serán sometidos a un exhaustivo tratamiento estadístico que incluirá un análisis descriptivo, un estudio analítico y un modelo de regresión múltiple por pasos. Con los resultados que obtengamos esperamos mejorar nuestro conocimiento de la salud de nuestra comunidad, y especialmente del segmento de mayor edad, que cada vez representa un mayor porcentaje de la población, y la más susceptible de sufrir enfermedades crónicas.

## **2. Justificación.**

El conocimiento del estado de salud de la población es la base para una adecuada actuación sanitaria mediante la intervención sobre los determinantes de la salud integral del individuo. Todo ello tendente a mejorar el estado de bienestar individual y social.

El hecho de poder disponer de un estudio epidemiológico observacional, como el que se propone en la presente memoria, realizado sobre miembros de nuestra comunidad, en donde se reflejen las relaciones existentes entre el estado rédox, con la edad, el sexo, hábitos alimenticios, patologías con alta tasa de morbilidad-mortalidad, y con marcadores de riesgo cardiovascular, representa la base para un mejor conocimiento de la salud pública de nuestra región. A partir de ese punto, se podrían estudiar estrategias que incidieran de manera significativa en la salud de nuestra población, y especialmente en la salud del segmento de población de mayor edad, que cada vez representa un mayor porcentaje de la población y que es susceptible por razones obvias, de sufrir más patologías de tipo crónico.

El envejecimiento es un proceso multifactorial en donde los mecanismos ligados al desequilibrio del estado rédox hacia procesos prooxidativos parecen desempeñar un protagonismo destacado. Harman en 1956 propuso una de las teorías que tratan de explicar el envejecimiento y que denominó teoría de los radicales libres (1). Según esta teoría, los radicales libres y otros elementos reactivos derivados del oxígeno (ERO), producidos fundamentalmente durante el proceso de la respiración celular, causan daño a las células, que de forma crónica conduce a alteraciones del metabolismo y funciones celulares que se reflejan en un progresivo deterioro de la homeostasis celular que se asocia al envejecimiento (ver Revisiones: 2-6). Las células disponen de mecanismos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) y no enzimáticos (glutatión, Vitaminas C y E) para detoxificar las ERO. La situación ideal es que los sistemas antioxidantes eviten la formación excesiva de ERO, o contrarresten sus efectos deletéreos, alcanzando lo que denominamos equilibrio rédox. No obstante, cuando se produce un desequilibrio rédox por generación excesiva de ERO, o bien por déficit de defensas antioxidantes, se produce lo que se definió como estrés oxidativo (7). El envejecimiento estaría de esta forma ligado a un proceso de estrés oxidativo crónico. Existe una gran cantidad de evidencia experimental que apoya la teoría de la participación de las ERO en el proceso de envejecimiento y que resumiríamos en lo siguiente: 1) La relación inversa entre la expectativa de vida de los mamíferos y su metabolismo basal (8). 2) El aumento en la vida media de animales transgénicos que expresan grandes cantidades de antioxidantes (9). 3) El daño asociado a ERO que se observa en

células envejecidas (10). 4) El hecho de que la vida media de muchas especies aumenta cuando la dieta se suplementa con antioxidantes (11). 5) Las evidencias sobre el papel de los ERO en enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento (10).

Si bien se han realizado estudios en diferentes poblaciones evidenciando una relación directa entre el grado de estrés oxidativo y la edad, los hábitos nutricionales, el uso y consumo de ciertas sustancias (tabaco, alcohol) o la existencia de ciertos factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes, hipercolesterolemia o arteriosclerosis) no fueron tenidos en cuenta, lo que puede representar un sesgo importante a la hora de la credibilidad de las conclusiones extraídas de los mencionados estudios. De hecho, el nivel de antioxidantes está muy influido por la dieta, y en especial por el consumo de fruta, verduras y aceite de oliva. Por otra parte, el abuso de alcohol o el tabaquismo tienen una marcada incidencia en el nivel de prooxidantes. Mientras que la existencia de los factores de riesgo cardiovascular antes mencionados infiere de forma directa en la fisiología del endotelio vascular, condicionando una disfunción endotelial que puede ser tanto origen como consecuencia de estrés oxidativo provocando un mecanismo de retroalimentación que condiciona un tipo de patología degenerativa ligada al envejecimiento.

### **3. Objetivos del estudio.**

1. Describir y analizar, el estado redox a lo largo del proceso natural de envejecimiento y las variaciones que experimenta en presencia de distintos factores asociados con riesgo cardiovascular.

2. Establecer posibles relaciones en la dieta y el estrés oxidativo y las variables asociadas a éste, en poblaciones agrupadas por edades.
3. Relacionar los hábitos alimenticios con la presencia de patologías o eventos cardiovasculares y el deterioro degenerativo asociado al envejecimiento.

#### **4. Promotor del estudio.**

Fundación SÉNECA (PRSAN/07/FN/03). Centro coordinador de la investigación de la Región de Murcia.

Ayudas para la realización de proyectos de investigación en ciencias de la salud.

#### **5. Diseño del estudio.**

Estudio epidemiológico observacional en el ámbito ambulatorio del área metropolitana de la región de Murcia. El estudio se realizará mediante la inclusión de pacientes que asistan a las consultas de los médicos incluidos en el estudio. Éstos completarán, con los datos del paciente, los cuadernos de recogida de datos (CRD) que se facilitarán a los investigadores junto con el protocolo, así como entregarán al paciente la hoja nº 5 del CRD una vez completada por el médico y el cuestionario de frecuencias alimenticias. En la hoja nº5 del CRD aparecen instrucciones para el personal sanitario encargado de la extracción de sangre. Cuando asista el paciente a su cita para el análisis, entregará al personal sanitario el cuestionario de

frecuencias alimentarias correctamente completado y la hoja nº 5 del CRD.

## **6. Selección de los médicos participantes.**

Los investigadores participantes en el estudio serán médicos de atención primaria que pasen consulta en hospitales o centros de salud de la región de Murcia.

## **7. Población del estudio.**

Cada paciente que se incluye en el estudio se le asignará un código de cuatro dígitos. Los dos primeros corresponden al código del médico asignado una vez firmado el documento de adhesión en el estudio, las otras dos cifras corresponderán, por orden de inclusión en el estudio, al número del paciente que estará comprendido entre uno y veinte. La población del estudio se distribuirá de forma homogénea en 4 grupos de edades que serán los siguientes:

- De 14 a 25 años.
- De 26 a 40 años.
- De 41 a 60 años.
- De 61 a 90 años.

A medida que se vayan incluyendo pacientes en el estudio se irá informando a los médicos los grupos de edades que se hayan completando con el fin de obtener, una vez finalizada la inclusión de los pacientes, unas poblaciones de igual tamaño en los 4 grupos de edades descritos.

Población diana: Pacientes de edades comprendidas entre 14 y 90 años que asistan a una consulta de atención primaria de la región de Murcia.

**Criterios de inclusión:**

Los pacientes deberán cumplir cada uno de los siguientes criterios.

1. Individuos atendidos en el ámbito ambulatorio del área metropolitana de la ciudad de Murcia, sanos o con patología tratada y compensada.
2. Edad comprendida entre 14 y 90 años.
3. Que el médico, por un motivo ajeno a este estudio, tenga la intención de hacerle un estudio analítico que implique una extracción de sangre.

**Criterios de exclusión:**

1. Los pacientes no deberán cumplir cualquiera de los siguientes criterios.
2. Antecedentes de isquemia coronaria, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inmunodeficiencias, tratamiento renal sustitutivo y procesos tumorales.
3. Incapacidad para otorgar el consentimiento informado para poder utilizar sus datos en el estudio o que se niegue a hacerlo.

## **8. Tamaño muestral.**

Este es un estudio piloto de 200 pacientes aproximadamente en el que se pretende extraer resultados para la posterior realización de un estudio de mayor envergadura que permitiría aportar evidencias clínicas.

## **9. Variantes del estudio.**

1- Variables resultado: marcadores plasmáticos del estado redox: isoprostanos, lipoperóxidos, grupos tioles reducidos, capacidad antioxidante total del plasma, LDL colesterol oxidada, y nitritos/nitratos.

2- Variables individuales: edad, sexo, profesión, peso, talla, tensión arterial (criterios Second Task Force).

3- Variables independientes y factores de exposición:

- Marcadores biológicos: glucosa, triglicéridos, colesterol (HDL y LDL), perfil hepático, creatinina, recuento de hematíes y hemoglobina, homocisteína y proteína C reactiva ultrasensible, estos últimos reconocidos marcadores de riesgo cardiovascular.

- Dieta: consumo diario de frutas y verduras, aceite de oliva y grasas animales.

- Hábitos: cuantificación del consumo de tabaco y alcohol (valorando su graduación).

- Fármacos (antidiabéticos orales, insulina, hipotensores, hipolipemiantes, tratamiento hormonal sustitutivo, anticonceptivos) y complementos vitamínicos.

**Determinaciones analíticas:**

- Mieloperoxidasa. La mieloperoxidasa se determinarán en plasma por enzimoimmunoanálisis (ELISA; Bioxytech®. Cat n°: 21019D).
- Lipoperóxidos (Malonildialdehído e hidroxialquenos) en plasma y tejidos. Los lipoperóxidos son marcadores de peroxidación lipídica que expresan la existencia de daño tisular y destrucción de membranas. Su fundamento consiste en que tanto el malonildialdehído como los hidroxialquenos reaccionan con el N-metil-2-fenilindol para formar un cromóforo estable cuyo máximo de absorbancia es a 586 nm. Este incremento de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de lipoperóxidos tanto en plasma como en tejidos. Reactivo: LPO-586. Bioxytech. Cod.: 94385. Janero DR, et al. Free Rad Biol Med 1990; 9: 515-540.
- NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> como productos estables de la degradación de óxido nítrico. Los nitratos presentes en la muestra serán reducidos a nitritos por la acción de la nitrato reductasa en presencia de NADPH. Posteriormente, los nitritos se cuantificarán por la reacción de Griess. Reactivo: Nitric oxide colorimetric assay. Boehringer Mannheim. Cod.: 1756281. Stamler JS, et al. Science 1992; 258: 1898.
- Grupos tioles reducidos de bajo peso molecular en plasma. Previa precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético, el sobrenadante lo emplearemos para la reacción con ácido 2,2-ditionitrobenzoico (reactivo de Ellman) y se cuantificará la absorbancia a 412 nm. Miao-Lin H, et al. Meth Enzymol 1990; 186: 4072.
- Homocisteína. Se determinará median un ELISA de Bio-Rad.
- Proteína C reactiva ultrasensible. Se determinará mediante ELISA (Inmundiagnostik, Alemania).

- LDL-Colesterol oxidada. Se determinará mediante ELISA (Bioxytech).

El resto de determinaciones no especificadas se realizarán con técnicas convencionales

## **10. Plan de Trabajo.**

### **10.1 Responsabilidad de los Médicos participantes en el estudio.**

- Firmar el documento de adhesión y compromiso ético de participación en el estudio.
- Informar al paciente sobre los objetivos del estudio y obtener el consentimiento informado por escrito del mismo.
- Completar el Cuaderno de recogida de datos de sus pacientes y entregarles el cuestionario de frecuencias alimentarias y la hoja número 3 del CRD ( cuaderno de recogida de datos) debidamente cumplimentada y firmada por el médico.

### **10.2 Descripción de las Visitas.**

El número de pacientes a incluir por investigador será de 20 pacientes. La inclusión se realizará en sujetos que acuden al centro de salud. Una vez que el investigador compruebe que el paciente cumple los criterios de inclusión, informará con toda claridad de la posibilidad de participar en el estudio y el objeto del mismo. Si el paciente accede, el médico solicitará la firma del consentimiento informado. Después completará todos los campos presentes en CRD, y

explicará al paciente como completar el cuestionario de frecuencias alimenticias. Una vez finalizada la visita, el médico citará al paciente para la extracción de sangre venosa periférica y le entregará la hoja nº 3 del CRD firmada y rellena por el médico la cual debe ser entregada por el paciente al personal sanitario cuando acuda a la cita para la extracción de sangre. Las muestras serán debidamente etiquetadas por las etiquetas adhesivas incluidas en el CRD y almacenadas a 4° hasta su retirada.

### **10.3 Final del estudio.**

Una vez finalizada la inclusión de pacientes el investigador se pondrá en contacto con el centro coordinador, cuyos teléfonos aparecen a continuación, para concertar la hora de retirada de todos los CRD de los pacientes incluidos. El médico conservará junto con el protocolo y los consentimientos informados el documento donde aparecerá la relación entre los nombres de los pacientes y los códigos asignados en nuestro estudio, con el fin de mantener el anonimato de los datos para el investigador. Esta información será solo conocida por el médico y consultada en caso de justificada necesidad.

Centro coordinador. Departamento Fisiología . Universidad de Murcia.

Investigador Principal : Dr Luis F. Carbonell Meseguer; Teléfono: 968363951

Monitor colaborador: Santiago Cuevas González ; Teléfono: 968364883

Los investigadores incluidos en el estudio, tendrán a su disposición estos teléfonos todos los días de 9:00 a 3:00 para consultar cualquier duda que pudiera surgir.

### **11. Comité Científico.**

Dr. Luis F. Carbonell Meseguer. Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

Dr José A. García Gálvis. Médico de familia del centro de salud Santa Maria de Gracia.

Dra. Elena Román Ortiz. Especialista en Pediatría y Nefrología. Master en Diseños de Ensayos Clínicos.

### **12. Aspectos éticos.**

A pesar de no realizar ningún tipo de intervención, se considera necesario solicitar el consentimiento informado del paciente para la utilización de sus datos.

Cumpliendo con las recomendaciones de la EMEA sobre estudios observacionales se someterá el protocolo a la evaluación de al menos un comité ético.

Los datos personales de los pacientes (nombre, apellidos, dirección, teléfono, número de historia, etc) no serán utilizados en ningún caso.

Todas las personas implicadas en el estudio respetarán las normas de la declaración de la Declaración de Helsinki de 1975,

revisadas en 1983, respecto a las normas de ética en la investigación en seres humanos.

### **13. Análisis de datos.**

La base y proceso de datos se realizará con el paquete estadístico SPSS-13 para Windows en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

Después de la depuración y corrección de los datos identificados como errores de registro e incoherencias se realizará:

#### **13.1- Análisis descriptivo:**

- Distribución de frecuencias de variables categóricas .
- Distribución, rango, medidas de tendencia central y dispersión de variables continuas. Transformación de variables para aproximarlas a distribución normal. Representación de los marcadores biológicos en los distintos grupos de sujetos dependiendo de las principales características individuales en diagramas de caja (Box-Plot).
- Principales características individuales y sociodemográficas de los sujetos estudiados.

#### **13.2- Estudio analítico:**

- Análisis estratificado de los marcadores de estrés oxidativo en función de la variables de exposición para identificar factores de asociación y/o confusión.
- Estudio de la asociación lineal entre marcadores de estrés y marcadores biológicos cuantitativos mediante estudio de correlación lineal.

- Análisis univariante: comparación de medias en los distintos grupos mediante análisis de varianza de una vía y comparaciones dos a dos con el test de comparaciones individuales de Tukey; Estudio de la relación entre variables categóricas y comparación de riesgos mediante test de Chi-cuadrado y Chi de Mantel Haenszel.

**13.3- Modelo de Regresión múltiple** por pasos para relacionar los marcadores de estrés con las distintas variables explicativas, de confusión e interacción tanto cuantitativas (marcadores biológicos, tensión arterial, edad, peso...) como categóricas (dieta, exposición a fármacos, tabaco...) mediante recodificación en variables binarias con los siguientes objetivos:

- Explorar un conjunto de posibles variables explicativas para determinar aquellas que son importantes para predecir el resultado de los marcadores de estrés.
- Obtener la ecuación de regresión que permita construir un índice pronóstico para predecir el resultado de los marcadores de estrés oxidativo a partir del conjunto de variables individuales y predictores considerados.
- Realizar el ajuste estadístico para controlar el efecto de las posibles variables de confusión sobre el resultado de los marcadores de estrés oxidativo.
- Detectar y valorar el efecto de interacción de distintas variables sobre los marcadores de estrés oxidativo.

#### **14. Calendario del estudio.**

El estudio se realizará en un periodo de inclusión de dos meses a partir del día que el médico firme el contrato de inclusión en el estudio y reciba el protocolo.

#### **15. Publicación de resultados.**

Los resultados que obtengamos una vez realizado el presente proyecto, creemos que tendrán una buena aceptación en la comunidad científica. Nuestra previsión para la difusión de los resultados pasa por enviar artículos a revistas del área de fisiología y fisiopatología, y especialmente las de cardiovascular: American Journal of Physiology, Circulation Research, Circulation. No descartamos, si todo se desarrolla según lo previsto, que parcial o totalmente enviemos los resultados del estudio a revistas mas generalistas con una amplia difusión: Journal of Clinical Investigation, Lancet o New England Journal of Medicine.

Por otra parte, intentaremos comunicar nuestros resultados en reuniones científicas nacionales e internacionales cuando entre sus prioridades se encuentren temas relacionados con el envejecimiento, estrés oxidativo, o factores de riesgo cardiovascular.

**Anexo 1.**

**Compromiso del investigador**

Dr/Dra. \_\_\_\_\_.

Hace constar:

Que conoce y acepta participar como investigador en el estudio epidemiológico piloto titulado:

“Análisis del estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento y su relación con factores de riesgo vascular. Estudio Enox”.

El código asignado a este investigador es

Que se compromete a no desvelar la confidencialidad de los datos del estudio y de los documentos que se le aporten sin la autorización previa y por escrito del investigador principal del estudio Dr Luis F. Carbonell Meseguer, así como a custodiarlos debidamente.

Que se compromete a que cada sujeto incluido en el estudio sea tratado y controlado siguiendo los estándares de calidad habituales y según lo establecido en el protocolo autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica.

Que respetará las normas éticas aplicables a este tipo de estudios, fundamentalmente en lo que se refiere a la obtención del consentimiento y a la custodia de la información de los pacientes.

Que se compromete a incluir en el estudio 20 pacientes, pudiendo abandonarlo en el momento que este lo vea oportuno.

En Murcia a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Firmado: investigado.  
(nombre, apellidos, DNI).

## **Anexo 2.**

### **Bibliografía**

- 1.- Harman, D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300. 1956.
- 2.- Golden, TR, Hinerfeld AD, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 1: 117-123. 2002.
- 3.- Biesalski HK. Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 5-10. 2002.
- 4.- Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 33: 37-44. 2002.
- 5.- Melov S. Animals models of oxidative stress, aging and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1395-400. 2002.
- 6.- Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 33: 597-604. 2002.
- 7.- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie* 25: 1058-1071. 1986.
- 8.- Viña J, Sastre J, Pallardo FV, Pla R, Estrela JM, Miquel J. The mitochondrial theory of aging: recent developments. *Bull Mol Biol and Med* 18: 81-87. 1993.
- 9.- Orr WC, RS Sohal. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-1130. 1994.
- 10.- Ames BN, Shigenaga M, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922. 1993.
- 11.- Cutler RG. Antioxidant and aging. *Am J Clin Nutr* 53: S373-S379. 1991.

### Anexo 3. Guía práctica para el médico.

## Guía práctica para el médico. Estudio EnoX.

Pasos que el médico debe seguir para incluir un paciente en el estudio.

1. Comprobar si el paciente cumple los criterios de inclusión y no cumple ningún criterio de exclusión:

#### **Criterios de inclusión:**

Los pacientes deberán cumplir cada uno de los siguientes criterios.

1. Individuos atendidos en el ámbito ambulatorio del área metropolitana de la ciudad de Murcia, sanos o con patología tratada y compensada.
2. Edad comprendida entre 14 y 90 años.
3. Que el médico, por un motivo ajeno a este estudio, tenga la intención de hacerle un estudio analítico que implique una extracción de sangre.

#### **Criterios de exclusión:**

Los pacientes no deberán cumplir cualquiera de los siguientes criterios.

1. Antecedentes de isquemia coronaria, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardiaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inmunodeficiencias, tratamiento renal sustitutivo y procesos tumorales.
2. Incapacidad para otorgar el consentimiento informado para poder utilizar sus datos en el estudio o que se niegue a hacerlo

2. Consultar con el paciente si da permiso para que sus datos formen parte de un estudio de investigación de la Universidad de Murcia, haciendo énfasis que su confidencialidad será totalmente respetada. Si la respuesta es afirmativa firmar el consentimiento informado.
3. Rellenar el Cuaderno de recogida de datos (CRD) en ese momento o en otro con la historia clínica, completar la hoja número 5 del CRD y entregársela al paciente, explicándole que tiene que entregársela

al personal sanitario encargado de la extracción de sangre una vez acuda a la cita concertada.

4. Entregarle el cuestionario de frecuencias alimenticias y explicarle que se lo tiene que entregar a la enfermera/o, junto con la hoja nº 5 del CRD, cuando acuda a extraerse sangre.
5. Una vez que reciba la analítica del paciente, copiar los datos o adjuntar al CRD una copia de la misma tapando la identidad del paciente.

## Cuaderno de recogida de datos.

### **CONSEJOS AL INVESTIGADOR PARA LA CUMPLIMENTACIÓN DEL C.R.D.**

#### **1. CUMPLIMENTACIÓN DE PREGUNTAS O PRUEBAS.**

- Se ruega escribir con la letra más clara posible y en tinta negra de bolígrafo.

- **En las respuestas numéricas el número cero se ha de escribir.**

0 1 / 0 9 / 0 3

- Si el número es decimal, por favor, escribir con coma.

- Si por el tamaño del número no se completan todos los espacios, por favor, rellenar como el ejemplo.

-- / -- / 0 1

- Completar las iniciales del paciente con la inicial del nombre y las iniciales del primer y segundo apellido.

Ejemplo: Ana M<sup>a</sup> Rodríguez Lozano AM R L

Ejemplo: Luisa Pérez-Amable de Torres L P T

#### **2. CORRECCIÓN DE ERRORES.**

Si ocurriera algún error en la cumplimentación del CRD, por favor corrija de la siguiente forma:

- No utilice corrector líquido para corregir errores.

- Tache la respuesta errónea con una línea continua.

- Escriba la cifra correcta encima o al lado.

- **Firme y escriba la fecha de la corrección.**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

Yo \_\_\_\_\_

He leído o me han leído el resumen del estudio Enox. He podido hacer preguntas sobre él.

He sido informado por:

---

Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Y por ello de forma escrita:

Presto libremente mi consentimiento para la participación y la utilización de los datos conforme a las normas éticas aplicables a este tipo de estudios, fundamentalmente en lo que se refiere a la custodia de la información de los pacientes y a la confidencialidad de los datos.

En Murcia, a        de ..... de 2004.

\_\_\_\_\_  
Firma paciente  
(nombre, apellidos, DNI)

\_\_\_\_\_  
Firma investigador

**CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS.**

**NOMBRE Y APELLIDOS DEL MEDICO:** \_\_\_\_\_

CODIGO DEL PACIENTE

--	--	--	--

**DATOS DEL PACIENTE.**

Inicales : \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Profesión: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Sexo: Hombre.  Mujer .

Peso: \_\_\_ Kg

Talla: \_\_\_\_\_ cms

Circunferencia cintura \_\_\_ , \_\_\_ cms

PAS: 1ª toma \_\_\_ mmHg

PAS: 2ª toma \_\_\_ mmHg

PAD: 1ª toma \_\_\_ mmHg

PAD: 2ª toma \_\_\_ mmHg

FC: 1ª toma \_\_\_ lat/min

FC : 2ª toma \_\_\_ lat/min

**ANTECEDENTES FAMILIARES 1º orden(padre y madre).**

1. HTA.
2. Diabetes.
3. Dislipemia.
4. Cardiopatía Isquémica .
5. Arteriopatía Periférica .
6. Ictus o AIT.
7. Insuficiencia Renal aguda . crónica .
8. Cáncer .
9. Arritmias .
10. Asma .

Otras enfermedades CV (especificar):

---

---

**NOMBRE Y APELLIDOS DEL MEDICO:** \_\_\_\_\_

CODIGO DEL PACIENTE

--	--	--	--

**ANTECEDENTES PERSONALES.**

**Enfermedad Cardiovascular:**

( Anotar en \_\_\_\_/\_\_\_\_ mes y año en que se le diagnostico cada patología. )

1. HTA . \_\_\_\_/\_\_\_\_
2. Diabetes.  \_\_\_\_/\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_
3. Dislipemia .  \_\_\_\_/\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_
4. Cardiopatía Isquémica.  \_\_\_\_/\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_
5. Arteriopatía periférica.  \_\_\_\_/\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_
6. Enfermedad cerebro vascular  \_\_\_\_/\_\_\_\_
7. Insuficiencia Renal.  \_\_\_\_/\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_
8. Cáncer.  \_\_\_\_/\_\_\_\_ Tipo \_\_\_\_\_
9. Arritmia . \_\_\_\_/\_\_\_\_. Tipo \_\_\_\_\_
10. Insuficiencia Cardiaca.  \_\_\_\_/\_\_\_\_.
11. Asma.  \_\_\_\_/\_\_\_\_ .

**Factores añadidos de Riesgo Cardiovascular y hábitos:**

1. Intolerancia Hidratos de Carbono.
2. Obesidad .
3. Sedentarismo.
4. Fumador.   
Nº cigarrillos / día \_\_\_\_ . Años fumando: \_\_\_\_ .
5. Exfumador.   
Nº cigarrillos / día \_\_\_\_ . Años fumando: \_\_\_\_ Años que dejó de fumar \_\_\_\_.
6. Alcohol :   
Cerveza \_\_\_\_ vasos /semana. Vino \_\_\_\_ copas /semana. Licor \_\_\_\_ vasos /semana
7. Ejercicio físico:  
Diario  2 ó 3 veces semana  1 vez semana  ocasionalmente

**Otras enfermedades:**

(especificar) \_\_\_\_\_

**NOMBRE Y APELLIDOS DEL MEDICO:** \_\_\_\_\_

CODIGO DEL PACIENTE

--	--	--	--

**TRATAMIENTOS.**

<b>GRUPO</b>	<b>FÁRMACO:NOMBRE COMERCIAL</b>	<b>DOSIS DIARIA</b>
<b>1- Antibióticos.</b>		
<b>2- Antiinflamatorios, Analgésicos</b>		
<b>3- IECA, ARA2, Beta-blo. Calcioantagonistas</b>		
<b>4- Diuréticos</b>		
<b>5- Estatinas y otros Hipolipemiantes</b>		
<b>6- Antiarrítmicos, Digoxina</b>		
<b>7- Insulina / ADO</b>		
<b>8- Heparina / Sintrón</b>		
<b>9-AAs, Tromalyt, Plavix</b>		
<b>10- Hierro</b>		
<b>11- Acido fólico</b>		
<b>12- Anticonceptivos</b>		
<b>13- Tr. Hormonal Sustit.</b>		
<b>14- Corticoides</b>		
<b>15- Broncodilatadores</b>		
<b>16- Quimioterapia</b>		

**NOMBRE Y APELLIDOS DEL MEDICO:** \_\_\_\_\_

CODIGO DEL PACIENTE

--	--	--	--

**ULTIMA ANALÍTICA.**

fecha (día/ mes / año): \_\_ \_\_ / \_\_ \_\_ /200\_\_

**METABOLISMO**

**Valor**

Glucemia.	_____	mg/dl
Creatinina.	_____	mgr/dl
Ácido Úrico.	_____	mg/dl
Colesterol total.	_____	mg/dl
HDL.	_____	mg/dl
Triglicéridos.	_____	mg/dl
LDL.	_____	mg/dl

**ENZIMAS HEPATICAS**

GPT (ALT):	_____	U/L
GOT:(AST):	_____	U/L
Gamma GT:	_____	U/L

**HEMATIMETRIA.**

Hb :	_____	g/dl
Hematocrito:	_____	%
VCM:	_____	fL
Hb A1c I:	_____	%

Otras pruebas de interés  
relevante \_\_\_\_\_

## Entregar al personal sanitario encargado de la extracción de sangre.

Este paciente ha accedido voluntariamente a participar en un estudio de investigación. El personal sanitario deberá extraer una muestra adicional de 5ml de sangre que posteriormente serán retirados para su análisis. Los pasos a seguir son:

1. Extraer en un tubo aparte, 5 ml de sangre.
2. Etiquetar el tubo con una pegatina en la que, con letra clara, este el código de identificación del paciente.
3. Almacenar esta muestra en el frigorífico a 4° hasta su retirada.
4. Recoger el cuestionario de frecuencias alimentarias y guardarlo en lugar acordado hasta su retirada.

La persona encargada de retirar las muestras y de facilitar el trabajo al personal sanitario es Santiago Cuevas cuyo teléfono de contacto aparece a continuación para cualquier consulta o circunstancia que pueda surgir.

Santiago Cuevas: 968 36 48 83/ 627 08 11 95.

### Rellenar por el Médico.

**Los Adhesivos para etiquetar las muestras de sangre de este paciente deberán llevar escritos los siguientes dígitos para su identificación.**

**Este documento deberá ser archivado, y custodiado por el personal sanitario quedando prohibido su acceso a ninguna persona que no sea su médico, con el fin de guardar la privacidad de los datos, ya que en este documento se relacionan los códigos de identificación con los nombres de los pacientes. Una vez finalizado el estudio, serán entregados al médico para su archivo.**

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Año de nacimiento del paciente. 19\_\_\_\_\_.

Numero de identificación:

--	--	--	--

Día \_\_\_\_, \_\_\_\_, \_\_\_\_ Murcia.

Firma del Médico

NOMBRE Y APELLIDOS DEL MEDICO: \_\_\_\_\_

CODIGO DEL PACIENTE

--	--	--	--

CONSUMO DE ALIMENTOS. ESTUDIO ENOX.									
CONSUMO MEDIO									
ALIMENTOS . (pieza o ración).	Nunca	MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1-3	1	2 - 4	5 - 6	1	2 - 3	4 - 6	6+
Frutas (una pieza por ración).	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zumos de frutas naturales.( por vaso).	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Almendras, cacahuetes, avellanas, nueces (50 g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Verduras.( judías verdes, espinacas, acelgas...)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hortalizas. ( Tomates, lechugas, pimiento...)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Legumbres.(Garbanzos, guisantes, alubias...)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arroz, patatas.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasta, pan..	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bollería y pastelería.( por piezas.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aceite de oliva.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros aceites. (girasol, soja...)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lácteos.(Leche, yogur, quesos...)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Huevos.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carnes blancas.( pollo, pavo...)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carnes rojas. (Cordero, ternera, cerdo..)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pescado azul.( sardina, atún, bonito, caballa)									
Pescado blanco.( pescadilla, merluza, besugo, mero, lenguado...por plato o ración).....	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pescados salados ahumados.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Embutidos.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jamón serrano o cocido.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>HÁBITOS :</b>	<b>NUNCA</b>	<b>VARIAS VECES AL MES</b>			<b>VARIAS VECES A LA SEMANA</b>		<b>TODOS LOS DIAS</b>		
¿Con qué frecuencia consume alimentos?									
¿Utiliza aceite de oliva para freír?									
¿Quita la grasa visible de la carne?									
¿Evita el consumo de grasas?									
¿Toma suplementos vitamínicos?.									

Distribuya la alimentación que toma al día (considerando ésta como 100%) entre desayuno-almuerzo, comida-merienda y cena.

Desayuno - almuerzo: %	Comida - merienda: %	Cena: %
------------------------	----------------------	---------

¿Cuántas horas pasan normalmente desde que cena hasta que se acuesta?

### **3. Calculo de diferentes Índices a partir de los valores obtenidos en el Cuaderno de recogida de datos.**

#### **3.1. Índice de masa corporal.**

El índice de masa corporal (ICM) es un indicador del peso de una persona en relación a su altura. A pesar de que no hace distinción entre los componentes grasos y no grasos de la masa corporal total, éste es el método más práctico para evaluar el grado de riesgo asociado con la obesidad.

$$\text{IMC} = \frac{\text{masa}(kg)}{(\text{altura}(m))^2}$$

#### **3.2 Índice Aterogénico.**

El Índice aterogénico se obtiene dividiendo la concentración de colesterol total entre el Colesterol-HDL. Valores altos de este índice se correlacionan con riesgo de cardiopatía.

$$\text{Índice Aterogénico} = \frac{\text{Colesterol total}}{\text{Colesterol HDL}}$$

#### **3.3 Índice de Framingham. Fórmula para el cálculo del riesgo cardiovascular según el modelo del estudio Framingham.**

Los cálculos que se han realizado para obtener este marcador de riesgo cardiovascular han sido extraídos de la siguiente publicación (Wilson *et al.*, 1998).

Las variables que intervienen son el *SEXO*, la *EDAD* en años, el *COLESTEROL* sérico en mg/dl, fracción de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad *HDL*, *PRESION SISTOLICA*, *DIABETES* (No, Sí), *FUMADOR* (No, Sí).

En primer lugar hay que calcular el valor de la siguiente expresión:

$$\text{Para los hombres } L_H = b_{E1} \times \text{Edad} + b_C + b_H + b_T + b_D + b_F$$

$$\text{Para las mujeres } L_M = b_{E1} \times \text{Edad} + b_{E2} \text{ Edad}^2 + b_C + b_H + b_T + b_D + b_F$$

donde los coeficientes  $b$  son diferentes para hombres y mujeres y los obtenemos a partir de la siguiente tabla:

#### Coeficientes para el modelo de Framingham (Colesterol total)

Coeficiente	Hombres	Mujeres
$b_{E1} \times \text{Edad}$	0.04826	0.33766
$b_{E2} \times (\text{Edad})^2$	0	-0.00268
$b_C$ Colesterol mg/dl		
< 160	-0.65945	-0.26138
160-199	0	0
200-239	0.17692	0.20771
240-279	0.50539	0.24385
$\geq 280$	0.65713	0.53513
$b_H$ HDL-Col mg/dl		
< 35	0.49744	0.84312
35 - 44	0.24310	0.37796
45 - 49	0	0.19785
50 - 59	-0.05107	0

$\geq 60$	-0.48660	-0.42951
<b><math>b_T</math> Tensión arterial mmHg</b>		
PAS < 120 PAD < 80	-0.00226	-0.53363
PAS <130 PAD < 85	0	0
PAS <140 PAD < 90	0.28320	-0.06773
PAS < 160 PAD < 100	0.52168	0.26288
PAS $\geq$ 160 PAD $\geq$ 100	0.61859	0.46573
<b><math>b_D</math> Diabetes</b>		
NO	0	0
SI	0.42839	0.59626
<b><math>b_F</math> Fumador</b>		
NO	0	0
SI	0.52337	0.29246

**Tabla 3.** Tabla para obtener los valores de las variables  $b$  que aparecen en la fórmula general para calcular el Índice de Framingham.

Una vez calculado el valor correspondiente de  $L$ , se le resta la cantidad  $G$  (función evaluada para los valores medios de las variables en el estudio) diferente para hombres o mujeres:

$$G_{\text{Hombres}} = 3.0975$$

$$G_{\text{Mujeres}} = 9.92545$$

Exponenciamos ese valor calculado  $B = \exp(L - G)$  y determinamos el valor de la expresión  $1 - S^B$ , donde  $S$  es (función de supervivencia base a 10 años), que es diferente para hombres y mujeres:

$$S_{\text{Hombres}} = 0.90015$$

$$S_{\text{Mujeres}} = 0.96246$$

También existe la posibilidad de calcular el riesgo mediante otro modelo que utiliza el valor de LDL-col en lugar del colesterol total, siendo la mecánica de cálculo similar aunque lógicamente varían los coeficientes. El procedimiento está también descrito en el artículo de la revista *Circulation*. (Wilson *et al.*, 1998)

A efectos de comparación, en la siguiente tabla se proporciona el riesgo **medio** a 10 años de acuerdo al estudio de Framingham:

Edad	Mujeres	Hombres
30 - 34	< 1 %	3 %
35 - 39	< 1 %	5 %
40 - 44	2 %	6 %
45 - 49	5 %	10 %
50 - 54	8 %	14 %
55 - 59	12 %	16 %
60 - 64	13 %	21 %
65 - 69	9 %	30 %
70 - 74	12 %	24 %

**Tabla 4.** Riesgo medio a 10 años de padecer un problema cardiovascular.

## 4. Determinaciones analíticas.

Las muestras de sangre fueron extraídas por el personal sanitario de cada ambulatorio. Las determinaciones analíticas de metabolismo glucídico, metabolismo Intermedio, metabolismo lipídico, enzimas hepáticas y hematimetría básica fueron determinadas en el servicio de análisis Clínicos y hematología del hospital J.M. Morales Meseguer en Murcia. Además de la cantidad habitual de sangre para hacer las determinaciones analíticas citadas, se le extrajeron 2 tubos adicionales de 5 ml, uno para la obtención de plasma y otro para la obtención de suero.

Estas muestras fueron guardadas a 4°C. Se recogieron diariamente de 10 a 15 minutos después de la extracción y se transportaron hasta el laboratorio del Departamento de Fisiología en la Facultad de Medicina de Murcia manteniéndolos de 4°C .

Los tubos para la obtención de plasma se centrifugaron a 5000 rpm/min con una temperatura de 4°C. Una vez centrifugados se extrajeron del sobrenadante 6 alícuotas de plasma. Los tubos para la obtención de suero se dejaron a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y su retracción, del sobrenadante se obtuvieron 5 alícuotas de suero que se conservaron a – 80°C, hasta proceder a su análisis.

## **4.1 Homocisteína.**

La concentración de Homocisteína en plasma ha sido medida con un Kit de Elisa de la casa AXIS (Axis: Homocysteine EIA. REF: FHCY100, Dundee, Reino Unido). Este kit mide la Homocisteína total del plasma.

### **Principios del ensayo:**

La Homocisteína presentes en la muestra, en sus formas de disulfuro mixto y asociado a proteínas, es reducida a Homocisteína libre por el uso de ditionitrotol (DTT).

La conversión enzimática de la muestra convierte, en condiciones de exceso de adenosina( AD) la homocisteína en s-adenosil-L-homocisteina por el uso de la enzima



La siguiente fase sólida del inmunoensayo enzimático se basa en la competencia entre la SAH de la muestra y la SAH inmovilizada en las paredes de la placa por la unión del anticuerpo monoclonal anti-SAH. Después de la eliminación de los anticuerpos anti-SAH no unidos con un lavado, se añade un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón etiquetado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). La actividad de la peroxidasa se mide espectrofotométricamente a 450 nm después de añadir el sustrato. La absorción de la cantidad de color de la preparación es inversamente proporcional a la concentración de homocisteína en la muestra.

#### **Datos del Kit comercial.**

El Rango de referencia del calibrador es de 2 a 50  $\mu\text{mol/L}$ .

La precisión de los análisis Axis Homocisteína EIA fue evaluada de acuerdo con el protocolo NCCLS EP-5 T2. Se analizaron tres niveles de controles durante 20 días con cuatro réplicas por funcionamiento en cada nivel. El límite de cuantificación (CV < 20%) es de 1,0  $\mu\text{mol/L}$ .

## **4.2 Proteína C reactiva ultrasensible.**

La PCR es una molécula medida frecuentemente en clínica para el diagnóstico de algunas infecciones o procesos patológicos, pero el método utilizado en estos casos es mucho menos sensible a pequeñas variaciones que el utilizado en investigación, de ahí que se hable de

PCR ultrasensible. En nuestro estudio a pesar de que el método utilizado es ultrasensible nos referiremos a ella como PCR como venimos haciendo hasta ahora.

Ha sido medida por un Kit de Elisa (nº K 9710 Immundiagnostik AG, Bensheim, Alemania) para la determinación en vivo de la proteína C en suero y plasma.

El Kit contiene una placa de un total de 96 pocillos, con anticuerpos policlonales de conejo específicos de la Proteína C fijados en exceso en la superficie de cada pocillo. En primer lugar añadimos la muestra de plasma e incubamos con movimiento durante una hora. Después lavamos y añadimos la enzima peroxidasa unida a un 2º anticuerpo anti PCR e incubamos durante otra hora. De esta forma, las moléculas de PCR que se han quedado atrapadas por los anticuerpos fijados a los pocillos de la placa, serán reconocidas por este 2º anticuerpo que fijará a su vez una enzima peroxidasa que esta unida al complejo. Esta será la que realice la reacción colorimétrica.

Después de esperar una hora desde que se añadió el 2º anticuerpo, lavamos de nuevo y añadimos el sustrato de la reacción que es tetrametilbenzidina (TMB). Esperamos unos minutos y añadimos la solución stop deteniendo la reacción y coloreándola de amarillo. De esta forma la cantidad de color amarillo será proporcional a la concentración de PCR que se encuentre en el pocillo. Después medimos las muestras y los patrones de concentraciones conocidas a 450nm y a partir de estos datos calculamos la concentración de PCR en plasma.

### **4.3 Malondialdehido (MDA).**

La determinación de la concentración de MDA en plasma la hemos realizado utilizando el sistema de determinación de HPLC descrito por Wong y cols (Wong *et al.*, 1987).

La preparación previa de las muestras ha consistido en que una vez hemos disuelto 160 microlitos de las muestras y patrones en un tampón de TBA con un pH de 6,8, lo calentamos en tubos cerrados a una temperatura de 95° durante 60 minutos. De esta forma, se producen la hidrólisis del lipoperóxido y la liberación de MDA. Después volvemos a añadir un tampón Fosfato de un pH de 6,8. Centrifugamos a 1300 g con el fin de eliminar el precipitado y añadimos a 200 microlitros de sobrenadante de las muestras y patrones, otros 200 ml de tampón pH 3,5. Mezclamos bien y medimos la muestra con el sistema de detección de HPLC.

Para ello utilizamos una bomba con un flujo de 1,2ml/min, un detector uv-vis a 532nm y una columna C-18 con 15 cm de longitud. Para estabilizar la columna y arrastrar la muestra por la columna utilizamos una fase móvil compuesta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 6,8 y acetonitrilo. Después limpiamos la columna con acetonitrilo y agua a un porcentaje de 70/30 % respectivamente. Una vez se ha inyectado 100 microlitros de la muestra en la columna, nuestro pico de MDA aparece a los 3,4 minutos aproximadamente. Calculando el área de este pico y realizando una recta de regresión con las concentraciones de MDA conocidas, utilizando con patrón Malondialdehido Bis de la casa Merk nº de catálogo 8.20756.0005, obtenemos el valor de la concentración de MDA en muestras de suero.

#### **4.4. Mieloperoxidasa.**

La determinación de la concentración de Mieloperoxidasa (MPO) en suero se realizó utilizando el kit comercial de la casa Immundiagnostik AG, Bensheim, Alemania) con el título de MPO Elisa Kit cuyo número de referencia es el K 6631.

El Kit contiene una placa de un total de 96 pocillos, con anticuerpos específicos de MPO fijados en exceso en la superficie de cada pocillo.

En primer lugar añadimos la muestra de suero e incubamos la placa con ligero movimiento durante una hora. Después lavamos y añadimos la enzima peroxidasa unida a un anticuerpo anti MPO e incubamos durante otra hora. De esta forma, las moléculas de MPO que se han quedado atrapadas por los anticuerpos fijados a los pocillos de la placa, serán reconocidos por este 2º anticuerpo que fijará a su vez una enzima peroxidasa al complejo. Está será la que realice la reacción colorimétrica.

Después de esperar una hora desde que se añadió el 2º anticuerpo, lavamos de nuevo y añadimos el sustrato de la reacción que es tetrametilbenzidina (TMB). Esperamos de 10 a 20 minutos y añadimos la solución stop deteniendo la reacción. De esta forma la cantidad de color amarillo resultante será proporcional a la concentración de MPO que contenían las muestras de suero. Después medimos las muestras y los patrones de concentraciones conocidas a (450nm) y calculamos la concentración de MPO en plasma.

El resto de material donde no se ha especificado su procedencia, se adquirió de Sigma España, Barcelona.

## **5. Análisis estadístico.**

La base y proceso de datos se realizará con el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

Cuando en este texto se haga mención de que existe correlación o asociación entre dos datos, se entenderá que ésta es significativa, entendiendo como tal que la P (probabilidad de que la hipótesis se cumpla) tiene un índice de confianza igual o superior al 95 %.

Después de la depuración y corrección de los datos identificados como errores de registro e incoherencias se realizará:

### **5.1- Análisis descriptivo.**

- Distribución de frecuencias de variables categóricas .
- Distribución, rango, medidas de tendencia central y dispersión de variables continuas. Transformación de variables para aproximarlas a distribución normal. Representación de los marcadores biológicos en los distintos grupos de sujetos dependiendo de las principales características individuales en diagramas de caja (Box-Plot).
- Principales características individuales y sociodemográficas de los sujetos estudiados.

### **5.2- Estudio analítico.**

- Análisis estratificado de los marcadores de estrés oxidativo en función de la variables de exposición para identificar factores de asociación y/o confusión.
- Estudio de la asociación lineal entre marcadores de estrés y marcadores biológicos cuantitativos mediante estudio de correlación lineal.
- Análisis univariante: comparación de medias en los distintos grupos mediante análisis de varianza de una vía y comparaciones dos a dos con el test de comparaciones individuales de Tukey; Estudio de la relación entre variables categóricas y comparación de riesgos mediante test de Chi-cuadrado y Chi de Mantel Haenszel.

### **5.3- Modelo de regresión múltiple.**

Por pasos, para relacionar los marcadores de estrés con las distintas variables explicativas, de confusión e interacción tanto cuantitativas (marcadores biológicos, tensión arterial, edad, peso...) como categóricas (dieta, exposición a fármacos, tabaco...) mediante recodificación en variables binarias con los siguientes objetivos:

- Explorar un conjunto de posibles variables explicativas para determinar aquellas que son importantes para predecir el resultado de los marcadores de estrés.
- Obtener la ecuación de regresión que permita construir un índice pronóstico para predecir el resultado de los marcadores de estrés oxidativo a partir del conjunto de variables individuales y predictores considerados.
- Realizar el ajuste estadístico para controlar el efecto de las posibles variables de confusión sobre el resultado de los marcadores de estrés oxidativo.
- Detectar y valorar el efecto de interacción de distintas variables sobre los marcadores de estrés oxidativo.



## RESULTADOS

---

---



# Resultados

## 1. Análisis descriptivo.

Se incluyeron en el estudio 161 sujetos en total: 104 mujeres y 54 hombres. La proporción mujeres/hombres de 1:1,9 es superior a la de la población de referencia (Área 1, 1:1), hecho que atribuimos al sesgo de selección debido al muestreo utilizado para seleccionar la población de estudio. Puesto que no se trató de un muestreo aleatorio sino consecutivo a partir de los sujetos que acudían espontáneamente a su médico de cabecera, la mayor asistencia de mujeres que hombres puede justificar esta diferencia. Los médicos no constataron mayor negativa de los hombres a la inclusión en el estudio. Esta diferencia se considerará en todos los análisis, comparaciones de datos generales, personales y analíticos para descartar que el género se comporte como una variable de confusión. Se mostrarán los resultados para el grupo de mujeres y hombres separadamente en la mayoría de los casos.

### 1.1 Estadísticos descriptivos.

En la siguiente tabla se describen las variables más importantes del estudio.

**Tabla 8. Estadísticos descriptivos**

	N	Unidad	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
<b>Edad</b>	157	Años	68	16	84	47,02	16,817
<b>Peso</b>	147	Kg	92	38	130	72,68	14,792
<b>Talla</b>	147	cm	51	144	195	165,20	9,396
<b>Índice Masa Corporal</b>	146		25,56	16,89	42,45	26,6052	4,649
<b>Circunferencia Cintura</b>	99	cm	87	63	150	90,23	16,613
<b>Presión Sistólica</b>	131	mmHg	134	77	211	127,11	16,931
<b>Presión Diastólica</b>	131	mmHg	65	40	105	76,32	10,306
<b>Presión diferencial</b>	131	mmHg	91	15	106	50,79	13,119

<b>Frecuencia Cardíaca</b>	10 2	Latidos por minuto	46	54	100	76,78	8,198
<b>Glucemia</b>	15 5	mg/dl	227	68	295	103,71	41,99
<b>Creatinina</b>	13 3	mg/dl	6,48	0,52	7,00	0,96	0,62
<b>Ácido Úrico</b>	15 2	mg/dl	8,73	1,47	10,20	4,73	1,45
<b>Colesterol</b>	15 4	mg/dl	248,00	71,00	319,00	191,00	37,24
<b>HDL</b>	14 8	mg/dl	87,00	32,00	119,00	59,19	15,51
<b>Triglicéridos</b>	15 5	mg/dl	255,00	33,00	288,00	106,23	56,99
<b>LDL</b>	14 8	mg/dl	213,00	9,00	222,00	111,08	32,70
<b>Índice aterogénico</b>	14 7		4,39	1,31	5,70	3,381	0,810
<b>Homocisteína</b>	14 3	µmol/L	25,904	3,549	29,453	8,939	4,096
<b>Proteína C Reactiva</b>	14 4	ng/ml	12,300	0,200	12,500	2,836	3,131
<b>Mieloperoxidasa</b>	13 2	ng/ml	63,038	0,111	63,149	19,611	13,975
<b>MDA</b>	14 1	µM	4,071	0,001	4,071	1,243	0,735
<b>Índ de Framingham</b>	13 7		38,36	0,017	38,38	6,35	7,14

### 1.1.1 Prevalencia de factores clásicos de riesgo cardiovascular.

El estudio se realizó en sujetos sanos sin antecedentes personales de hipertensión arterial, diabetes o enfermedad cardiovascular no controlada o clínicamente grave. Se muestra en la tabla 9 la prevalencia de hipertensión arterial controlada, diabetes, intolerancia a hidratos de carbono controlada, dislipemia, obesidad y tabaquismo, todos ellos factores clínicos de riesgo cardiovascular. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de estos factores dependiendo del sexo, excepto en el consumo de alcohol, que es dos veces más prevalente en hombres que en mujeres.

Tabla 9

<b>Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en el grupo de estudio</b>					
	<b>Grupo de estudio</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>	<b>Chi-cuadrado</b>	<b>p</b>
<b>Hipertensión arterial</b>	26,1% n= 42	25% n= 26	28,6% n=16	0,24	0,624
<b>Diabetes</b>	12,4 % n= 20	10,6% n=11	16,1 % n= 9	1,005	0,326
<b>Intolerancia HdC</b>	5 % n= 8	5,8 % n= 5	4% n= 3		ns
<b>Dislipemia</b>	29,2 % n= 47	26,9 % n= 28	33,9 % n= 19	0,86	0,353
<b>Obesidad</b>	18,1% n= 29	15,4 % n= 16	23,2 % n= 13	1,5	0,22
<b>Tabaquismo</b>	27,3% n= 44	23,1 % n= 24	35,7 % n= 20	2,9	0,088
<b>Exfumadores</b>	12,4 % n= 20	n= 12	n= 8		ns
<b>Consumo de alcohol</b>	30 % n= 48	22,1 % n= 23	44,6 % n= 25	8,796	0,03

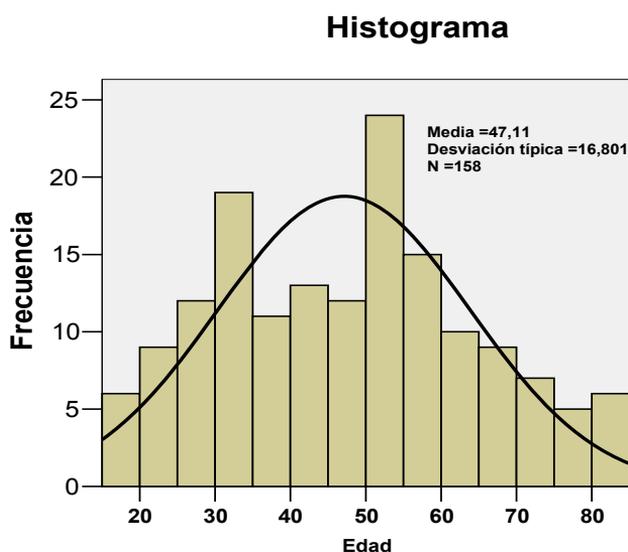
(HdC: Hidratos de Carbono; n: numero de individuos; ns: no significativo; P: probabilidad de que se cumpla la hipótesis)

### 1.1.2 Edad de los sujetos del estudio.

En la figura 3 se observa la distribución de frecuencias de la edad. La mediana es de 47 años (rango 16 a 84 años). La edad de los sujetos del estudio difiere estrictamente de una distribución normal (figura 3) a expensas del grupo de mujeres, no obstante, al no existir asimetría ni apuntamientos significativos, la variable edad puede ser tratada como si se

distribuyera normalmente. Además, era nuestro interés que las edades de los sujetos del estudio se distribuyeran de forma homogénea entre el rango de 16 a 90 años.

En promedio, la edad no difiere entre mujeres y hombres con 46,95 y 47,5 años respectivamente (figura 4).

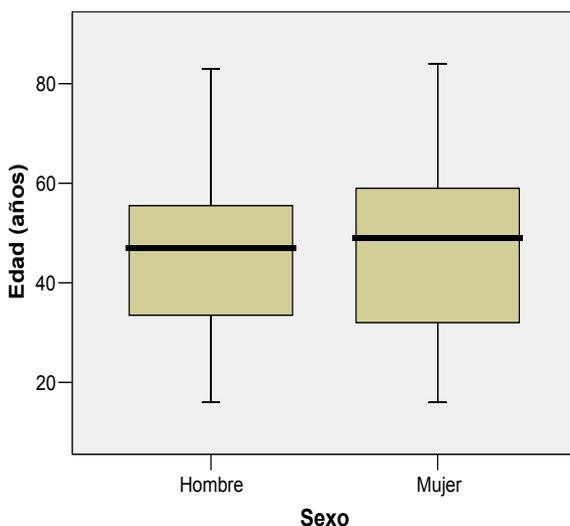


**Figura 3.** Histograma de frecuencias de la edad ajustado a una curva de normalidad. La variable no sigue una distribución normal.(test de Kolmogorov ; 0,75, P= 0,032.)

En la tabla 10 se describen los percentiles de la variable edad por sexos. 18 sujetos son mayores de 70 años (11,3%), 10 mujeres y 8 hombres que cumplen los criterios de inclusión, sin enfermedad inestable o no controlada.

**Tabla 10. Percentiles de la variable edad por sexos.**

Sexo	Percentiles de edad ( años)						
	5	10	25	50	75	90	95
Mujer	19,40	23,40	32,00	49,00	59,00	69,60	75,80
Hombre	23,25	26,00	32,50	47,00	55,25	71,50	80,00
Mujer			32,00	49,00	59,00		
Hombre			33,00	47,00	55,00		



**Figura 4.** Diagramas de cajas de la variable edad diferenciada por sexos. No se observan diferencias significativas entre la distribución de Hombres con la de Mujeres

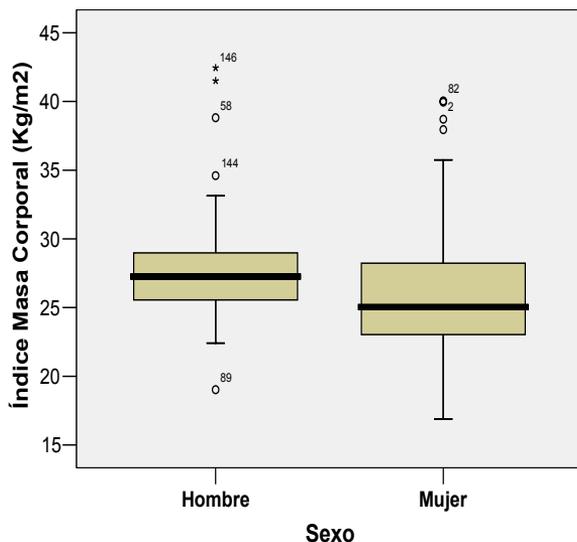
### 1.1.3 Características antropométricas.

Peso, talla, índice de masa corporal (IMC) y circunferencia de cintura no siguen una distribución normal. Los cuatro parámetros muestran valores significativamente superiores en hombres que en mujeres.

Para valorar la relación entre los parámetros de estrés oxidativo y el peso corporal utilizaremos el IMC (peso/talla<sup>2</sup>).

#### 1.1.3.1 Índice de Masa Corporal.

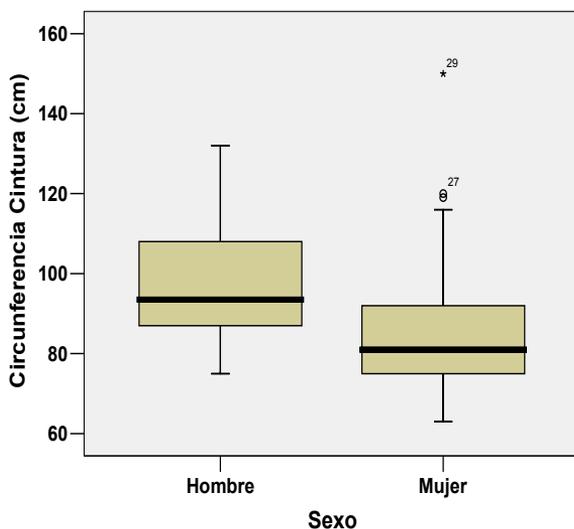
En la figura 5 se observa diferencias significativas entre hombres y en mujeres en los valores de IMC, resultando superior en hombres ( $P=0,003$ ). El rango establecido en el IMC como normal es de 19 a 25. La media de los valores de IMC de los hombres, está casi 3 puntos por encima del valor máximo de IMC considerado como normal, por tanto estamos ante población masculina con sobrepeso. Las mujeres se acercan más al rango de IMC normal, aunque también lo sobrepasan ligeramente.



**Figura 5.** Diagramas de cajas de la variable índice de masa corporal por sexos. Las medianas son Hombres= 27,99 y Mujeres=25,92 . Las diferencias entre las medias son significativas ( $p=0,003$ )

### 1.1.3.2 Circunferencia de cintura.

En la figura 6 se observa que la población masculina presenta valores medios de circunferencia de cintura significativamente superiores ( $p = 0,001$ ) a la media observada en la población femenina (figura 6).



**Figura 6.** Diagramas de cajas de la variable circunferencia de cintura por sexos. Mediana en grupo de Hombres =85,56, y en el de Mujeres =97,71.

### 1.1.4 Presión Arterial.

Las diferencias de presión arterial con respecto al sexo de la población no difieren estadísticamente (Test de U Mann Whitney; ns). La presión sistólica, la presión diastólica y la diferencial no siguen una

distribución normal, a diferencia de la frecuencia cardiaca la cual si se ajusta a la normalidad según el test de Sphapiro-Wik ( $P=0,592$ ).

Se muestran los datos de presión arterial sistólica, diastólica, diferencial y frecuencia cardiaca en percentiles y diferenciados por sexos. Observamos cifras de Presión Arterial (PA) igual o superiores al límite recomendado en el 10 % de la población tanto en hombres como en mujeres ( $P90 = 143$  M /  $146$  H para PAS y  $P90= 89$  M /  $90$  H para PAD).

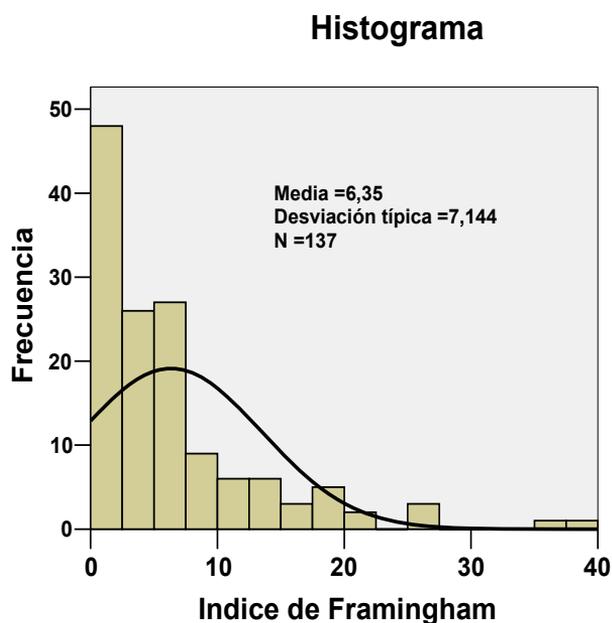
**Tabla 11. Percentiles de Presión Arterial y Frecuencia Cardiaca diferenciados por sexos.**

Sexo	Percentiles de Presión Arterial							
	5	10	25	50	75	90	95	
Presión Sistólica mmHg	Mujer	105	110	115	122	135	143	157,8
	Hombre	105	114	120	125	135	146	160
Presión Diastolita mmHg	Mujer	60	61,8	68	75	81	89,2	90,8
	Hombre	60	60	74	80	83	90	93
Presión diferencial mmHg	Mujer	33	36	40	48	57	65,6	71,6
	Hombre	35	38	43	50	59	61	67
Frecuencia Cardiaca lpm	Mujer	60,2	66,4	70	76	83	85,6	86
	Hombre	64	67	71	78	82	90	92

### 1.1.5 Índice de Framingham.

Utilizamos como marcador principal del riesgo cardiovascular de los sujetos del estudio el índice de Framingham, calculado según se especificó en el apartado métodos. Se obtiene este índice en 137 casos, excluyéndose 23 (14,4 %) por ausencia o error de alguno de los parámetros necesario para el cálculo del mismo.

Se muestran en la figura 7 los valores del grupo de estudio, que presentan una importante asimetría como se observa en el histograma. El 50 % de la población muestra un riesgo de evento cardiovascular a los 10 años inferior al 5 %, como era de esperar, ya que los casos incluidos en el estudio son sujetos sanos o con hipertensión, diabetes o dislipemia controladas y sin manifestaciones clínicas.

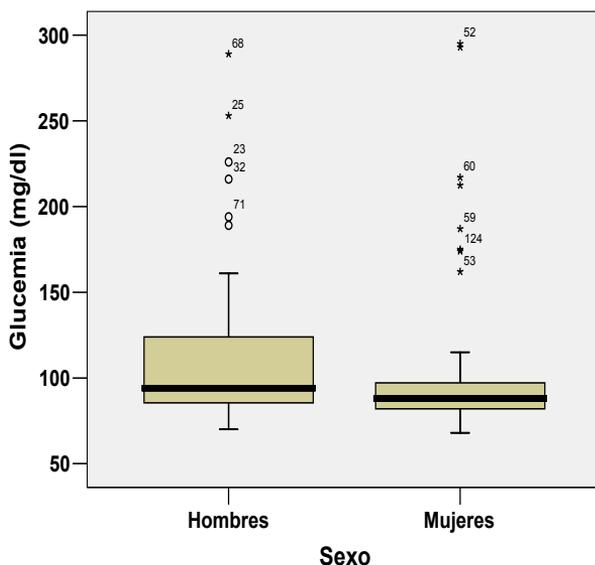


**Figura 7.** Histograma de Distribución de frecuencias de la variable índice de Framingham. Se han calculado la media ,n° de datos y desviación típica. La variable no sigue una distribución normal.

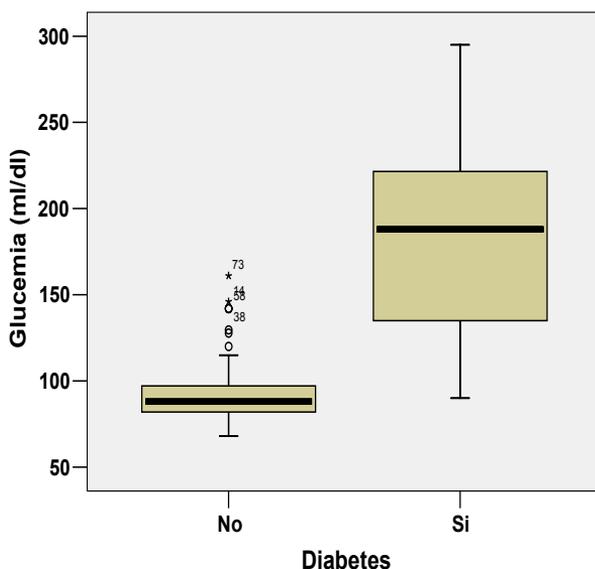
### 1.1.6 Glucemia.

La distribución de la glucemia en la población del estudio es asimétrica por la presencia de 20 sujetos diabéticos (11 mujeres y 9 varones). La distribución es paramétrica en individuos diabéticos y no paramétrica en no diabéticos. En 7 casos catalogados por sus médicos a priori como no diabéticos, se encuentran determinaciones anómalas de glucemia en ayunas, es decir, mayores de 120. Resultando la media masculina significativamente superior a la femenina (figura 8,  $P=0,003$ ). Como era de esperar, los pacientes diabéticos, a pesar de ser

considerados como bien controlados por el médico, tienen una cifra media muy superior a la obtenida en pacientes no diabéticos, como aparece en la figura 9.



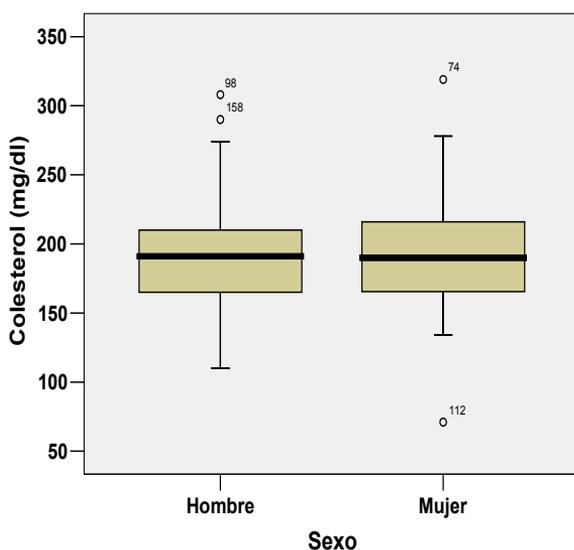
**Figura 8.** Diagramas de cajas de la variable glucemia. En sujetos no diabéticos, la glucemia promedio es significativamente mayor en hombres respecto a mujeres (87 vs 98) (test U Mann Whitney 1365,5,  $p = 0,003$ )



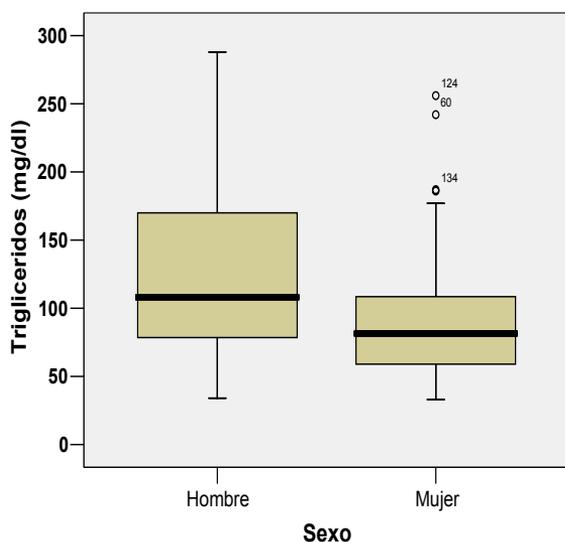
**Figura 9.** Diagramas de cajas de la variable Glucemia clasificados por las categorías de Diabetes SI o No. En diabéticos no observamos diferencias significativas en las glucemias respecto al sexo (181 mujeres vs 192 hombres). Existe diferentes significativas entre los diabéticos y los no diabéticos.

### 1.1.7. Perfil Lipídico.

Las siguientes figuras reflejan la distribución de las variables referidas a los lípidos plasmáticos categorizados por sexos. No se observan diferencias significativas entre sexos con respecto a la variable colesterol representada en la figura 10, pero sí que aparecen diferencias significativas en la variable de triglicéridos ( $P=0,001$ ), los cuales aparecen más elevados en la población masculina que en la femenina (figura 11).



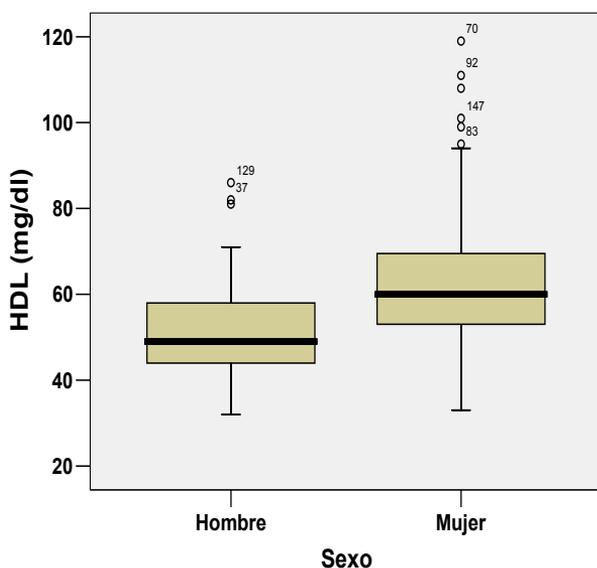
**Figura 10.** Diagramas de cajas de la variable colesterol, clasificada por las categorías de Hombre y Mujer. Distribución normal. No se observan diferencias significativas entre mujeres y hombres (medias respectivamente 192 vs 188,  $t = 0,532$ ,  $p = 0,595$ ).



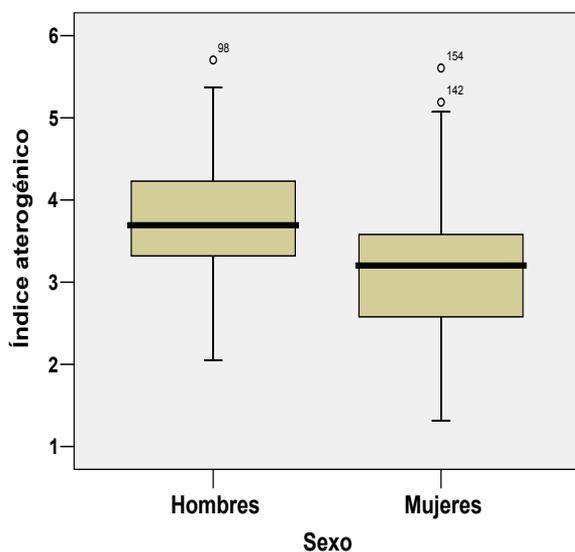
**Figura 11.** Diagramas de cajas de la variable triglicéridos, clasificada por las categorías de Hombre y Mujer. Cifras mayores significativamente en hombres que en mujeres: 92 vs 131 (test U Mann Whitney 1735,  $p=0,001$ ). La distribución no

Los valores medios de HDL en mujeres son significativamente superiores que en hombres, como aparece representado en la figura 12 (P=0,001).

Con respecto al índice aterogénico, los hombres tienen valores significativamente superiores que las mujeres (figura 13, P= 0,001).



**Figura 12.** Diagramas de cajas de la variable HDL. Distribución no normal. Cifras superiores en mujeres 63 vs 52 (test U Man Whitney 1331, p= 0.001)



**Figura 13.** Diagramas de cajas de la variable Índice aterogénico en nuestra población. Distribución normal. Cifras significativamente superiores en hombres 3,75 vs 3,17 en mujeres (T-Test t= -4,381, p = 0.001)

### 1.1.8 Perfil hepático.

En la tabla 12 aparecen representadas las medias de las distintos marcadores de la función hepática GPT, GOT y GGT diferenciadas por sexos. En los tres marcadores los valores son significativamente superiores en hombres que en mujeres.

**Tabla 12. Marcadores de función hepática diferenciada por sexos**

<b>Variables</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>	<b>Test: U Mann</b>
<b>GPT</b>	19	39	p= 0,001
<b>GOT</b>	19	29	p= 0,001
<b>GGT</b>	19	65	p= 0,001

### 1.1.9 Dieta

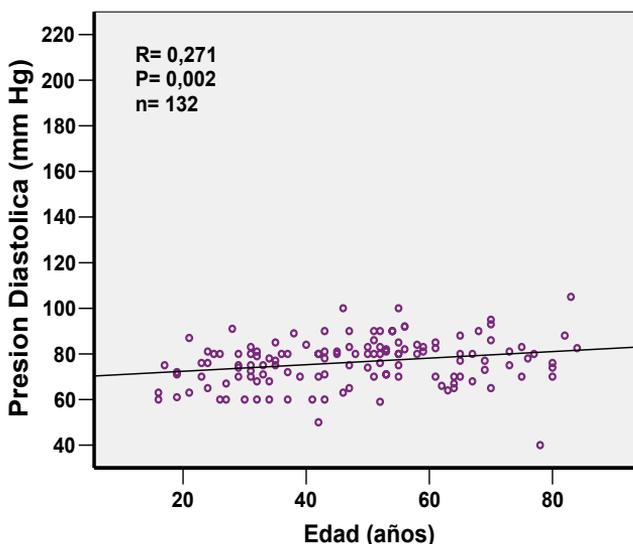
Se muestran los resultados de los cuestionarios realizados sobre dieta habitual por los 161 sujetos del estudio. El cuestionario utilizado es un test de Frecuencias alimenticias (Quatromoni *et al.*, 2002) en donde se estima el consumo de raciones al mes de cada uno de los tipos de alimentos descritos en la dieta. En la tabla 15 se describen la media, mediana, desviación típica, mínimo, máximo y 3 percentiles de cada una de las familias de alimentos de las que se ha estimado el consumo mensual de cada paciente.

**Tabla 13. Descriptivo de los Valores de de los distintos alimentos de la dieta**

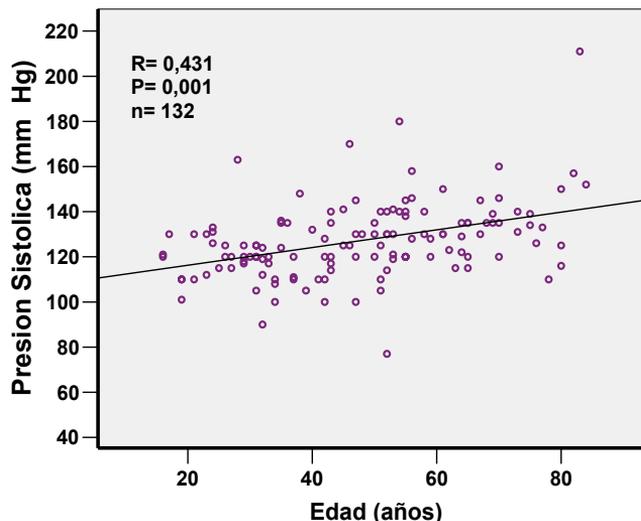
Tipos de alimentos	N		Media	Media na	Desviación típica	Min	Max	Percentiles		
	Vali das	nul as						25	50	75
Frutas (raciones /mes)	144	16	46,69	30,00	38,97	0	150	12	30	75
Zumos (raciones/mes)	141	19	13,32	4,00	22,28	0	180	1	4	17
Frutos secos (raciones/mes)	141	19	10,43	4,00	22,77	0	180	2	4	12
Verduras (raciones/mes)	145	15	18,98	12,00	22,31	0	150	4	12	22
Legumbres (raciones/mes)	147	13	10,20	12,00	8,80	0	75	4	12	12
Arroz, patatas (raciones/mes)	144	16	17,33	12,00	24,89	0	180	12	12	12
Pasta, pan (raciones/mes)	139	21	40,83	30,00	34,58	0	180	22	30	75
Bollería, pastelería (raciones/mes)	134	26	12,95	4,00	22,05	0	180	2	4	22
Aceita de Oliva (raciones/mes)	137	23	60,18	75,00	45,02	0	180	30	75	75
Aceite de Girasol (raciones/mes)	131	29	6,71	,00	14,12	0	75			4
Lácteos (raciones/mes)	143	17	52,52	30,00	42,70	0	180	22	30	75
Huevos (raciones/mes)	149	11	11,40	12,00	11,11	0	75	4	12	12
Carnes blancas (raciones/mes)	144	16	13,14	12,00	16,91	0	150	4	12	12
Carnes Rojas (raciones/mes)	145	15	8,74	4,00	10,28	0	75	4	4	12
pescado Azul (raciones/mes)	142	18	8,44	4,00	10,01	0	75	4	4	12
Pescado Blanco (raciones/mes)	140	20	6,76	4,00	5,947	0	30	2	4	12
Pescado Salado o ahumado (raciones/mes)	134	26	1,73	2,00	2,707	0	22	0	2	2
Embutidos (raciones/mes)	144	16	10,86	4,00	19,79	0	180	2	4	12
Jamon Serrano o cocido (raciones/mes)	147	13	12,90	12,00	12,06	0	75	4	12	12
Total ingesta de Vegetales (raciones/mes)	160	0	46,41	34,00	39,74	0	225	24	34	60

## 1.2 Correlaciones entre la edad y el resto de los parámetros.

En las siguientes gráficas se representan la relación entre los valores de edad, presión diastólica (figura 14) y edad presión sistólica (figura 15). En ambos casos se ha obtenido una correlación positiva significativa, aunque de forma mas contundente en el caso de la presión sistólica, donde el coeficiente de regresión es muy superior.

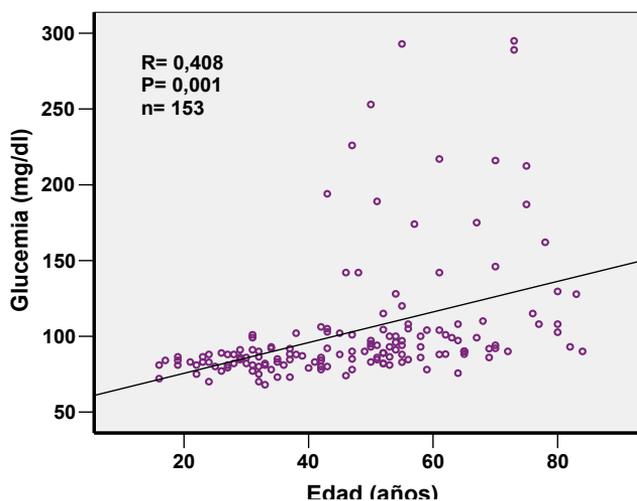


**Figura 14.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Edad y la variable independiente es la Presión Diastólica. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)

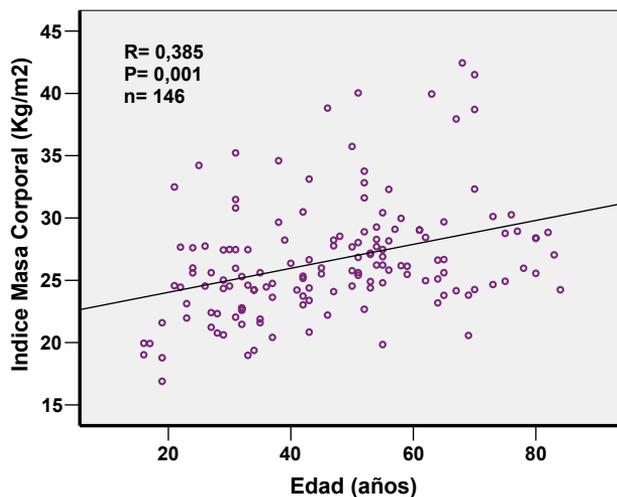


**Figura 15.** . Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Edad y la variable independiente es la Presión Sistólica. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la

En la figura 16 se representa la correlación directa y significativa entre la edad y la glucemia, y en la figura 17 se representan la nube de puntos de la asociación directa entre la edad y el IMC.



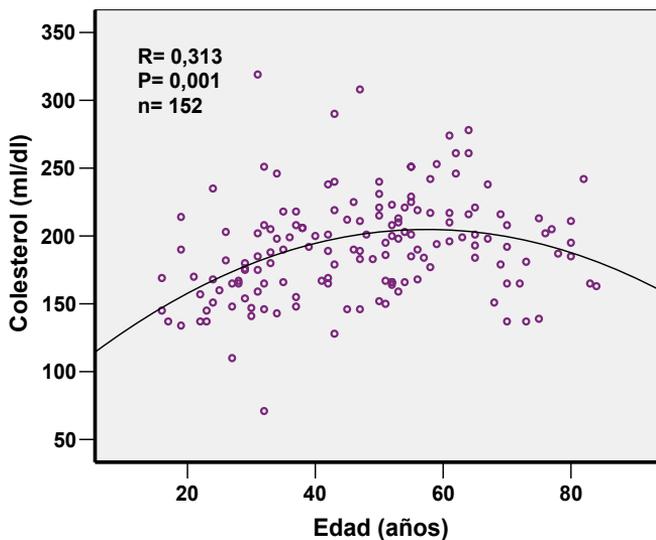
**Figura 16.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Edad y la variable independiente es la glucemia. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Pearson, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)



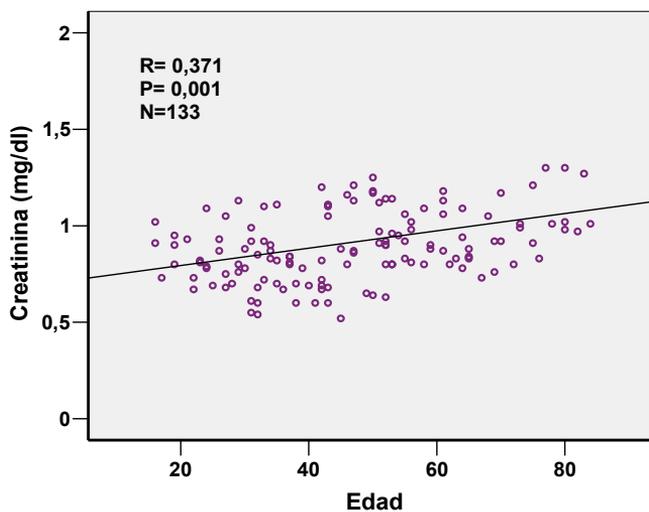
**Figura 17.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Edad y la variable independiente es el Índice de masa Corporal. Este se ha hallado aplicando la siguiente fórmula  $IMC = \text{Peso (Kg)} / (\text{Talla en m})^2$ . La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Spearman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)

Con respecto a los valores de Colesterol representados en la figura 18, también se observa correlación con la edad, pero en este caso, a diferencia de las asociaciones descritas anteriormente, la nube de puntos se ajusta a una representación cuadrática y no lineal.

En la figura 19 se representan los valores de edad y creatinina en la que también se observa una correlación directa y significativa entre ellos.



**Figura 18.** Nube de puntos y ajuste cuadrático de la representación de los datos. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)



**Figura 19.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. ( R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)

### 1.3 Correlaciones entre el índice aterogénico, Circunferencia de cintura y índice de masa corporal con otros parámetros del estudio.

En la tabla 16 se aportan los datos obtenidos en el análisis bilateral de las variables índice aterogénico, circunferencia de cintura e IMC con los parámetros de presión arterial, glucemia, creatinina, Ácido Úrico, HDL, LDL, triglicéridos, índice de Framingham, Homocisteína y PCR.

**Tabla 14. Correlaciones entre el Índice de masa corporal, la circunferencia de cintura y el índice aterogénico con otros parámetros del estudio.**

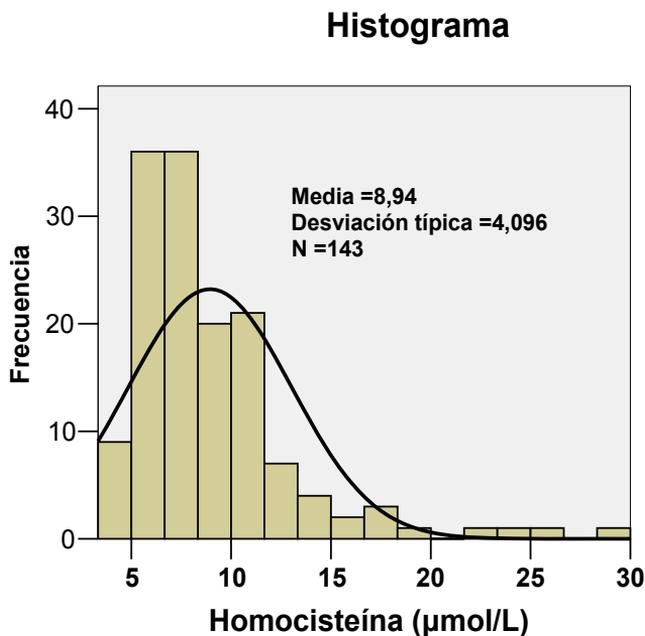
		<b>Índice Masa Corporal.</b>	<b>Circunferencia Cintura</b>	<b>Índice aterogénico</b>
<b>Índice Masa Corporal</b>	Coeff. de correlación Spearman	1,000	,856(**)	,369(**)
	Sig(bilateral)	.	,000	,000
	N	146	98	133
<b>Circunferencia Cintura</b>	Coeff. de correlación Spearman	,856(**)	1,000	,423(**)
	Sig(bilateral)	,000	.	,000
	N	98	99	90
<b>Presión Diastólica</b>	Coeff. de correlación Spearman	,324(**)	,463(**)	,066
	Sig(bilateral)	,000	,000	,472
	N	129	93	121
<b>Presión Sistólica</b>	Coeff. de correlación Spearman	,263(**)	,433(**)	,044
	Sig(bilateral)	,003	,000	,634
	N	129	93	121
<b>Glucemia</b>	Coeff. de correlación Spearman	Spearman ,449(**)	Spearman ,511(**)	Pearson ,328(**)
	Sig(bilateral)	,000	,000	,000
	N	141	96	147

<b>Creatinina</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,234(**) ,010 121	Spearman ,261(*) ,012 92	Pearson ,212(*) ,017 127
<b>Ac Úrico</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,340(**) ,000 138	Spearman ,501(**) ,000 94	Pearson ,352(**) ,000 146
<b>Índice aterogénico</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,369(**) ,000 133	Spearman ,423(**) ,000 90	Pearson 1,000 . 147
<b>HDL</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman -,244(**) ,004 134	Spearman -,304(**) ,004 90	Pearson -,682(**) ,000 147
<b>LDL</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,125 ,150 134	Spearman ,145 ,172 90	Pearson ,533(**) ,000 147
<b>Triglicéridos</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,451(**) ,000 141	Spearman ,485(**) ,000 96	Pearson ,569(**) ,000 147
<b>Colesterol</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,177(*) ,037 140	Spearman ,117 ,258 96	Pearson ,383(**) ,000 147
<b>Índice de Framingham</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,555(**) ,000 135	Spearman ,666(**) ,000 97	Pearson ,430(**) ,000 125
<b>Ln Homocisteína</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,147 ,097 129	Spearman ,253(*) ,019 86	Pearson ,138 ,107 137
<b>Ln PCR</b>	Coeff. de correlación Sig(bilateral) N	Spearman ,319(**) ,000 129	Spearman ,387(**) ,000 86	Pearson ,152 ,076 137

## 2. Estudio Analítico.

### 2.1 Homocisteína.

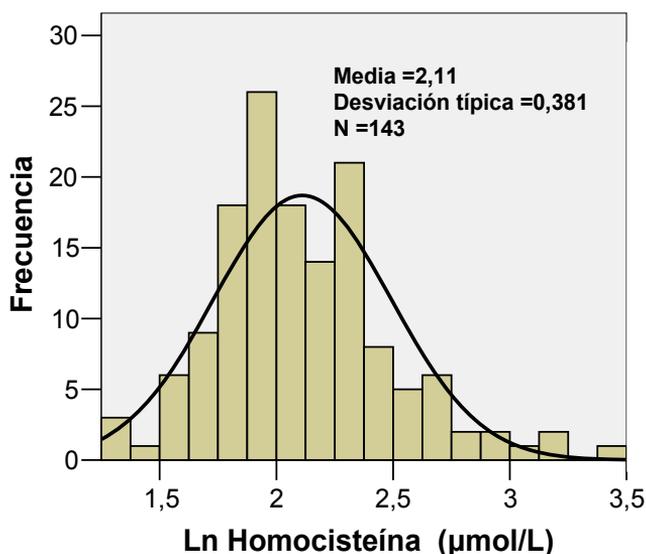
Se obtienen determinaciones fiables de 142 sujetos. Aplicamos el test de normalidad y se observa que la variable no sigue una distribución que se ajuste a una curva de normalidad (figura 20).



**Figura 20.** Histograma de distribución de frecuencias de la variable Homocisteína. Se han calculado la Media, N(número de datos) y desviación típica. Según los test de normalidad la variable no siguen una distribución normal (Test de Kolmogorov 0,147,  $p = 0,000$ ).

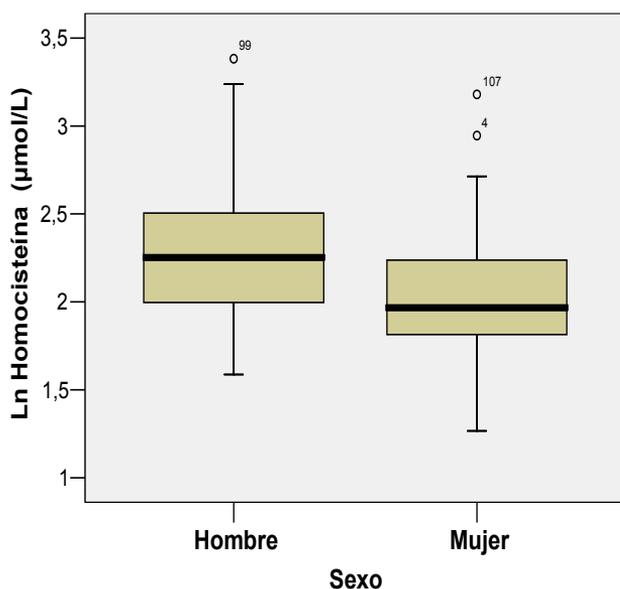
En la figura 21 representamos los valores de la variable Homocisteína transformados al aplicar el logaritmo neperiano. Vemos que en este caso, la distribución de los datos sí se ajusta a la normalidad. Por lo tanto de aquí en adelante, utilizaremos la variable de Ln Homocisteína con el fin de poder utilizar test paramétricos.

### Histograma



**Figura 21.** Histograma de distribución de frecuencias de la variable Homocisteína. Se han calculado la Media, N (número de datos) y desviación típica. Según los tests de normalidad la variable se ajusta a una distribución normal. (Test de Kolmogorov 0,074,  $p = 0,054$ ).

En la figura 22 se representan los datos de Ln Homocisteína diferenciados por sexos. Los valores de la variable son significativamente superiores en hombres respecto a los de las mujeres ( $P = 0,003$ ).



**Figura 22.** Se observa una diferencia significativa entre hombres y mujeres comparando las medias obtenidas con una prueba T para la igualdad de las medias ( $\text{Sig} = 0,003$ ) en la variable resultado Homocisteína.

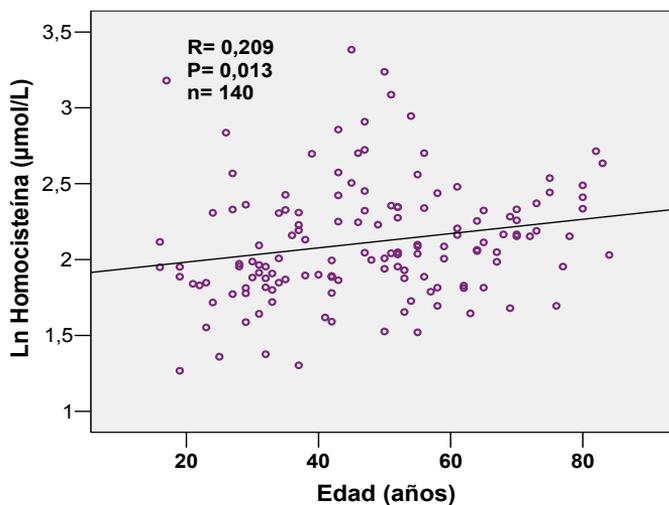
En la tabla 13 se representan los percentiles de la variable Homocisteína diferenciada por sexos. Las cifras son superiores en hombres con respecto a las mujeres en todos los percentiles y en promedio, de forma significativa (10,79 vs 7,95, U Mann W  $p=0,000$ ).

**Tabla 15. Percentiles de la variable Homocisteína diferenciados por sexos.**

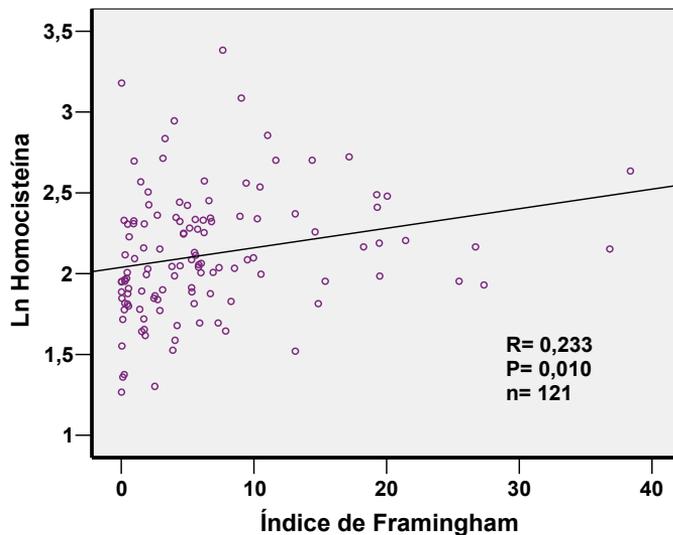
Test		sexo	Percentiles						
			5	10	25	50	75	90	95
Weighted Average( Definition 1)	Homocisteína Mmol/L	Mujer	4,36	5,17	6,14	7,15	9,41	11,26	13,6
		Hombre	5,28	6,30	7,35	9,51	12,44	17,36	23,5
Tukey's Hinges	Homocisteína Mmol/L	Mujer			6,14	7,15	9,37		
		Hombre			7,36	9,51	12,24		

### 2.1.2 Correlaciones de la Homocisteína con los distintos parámetros del estudio.

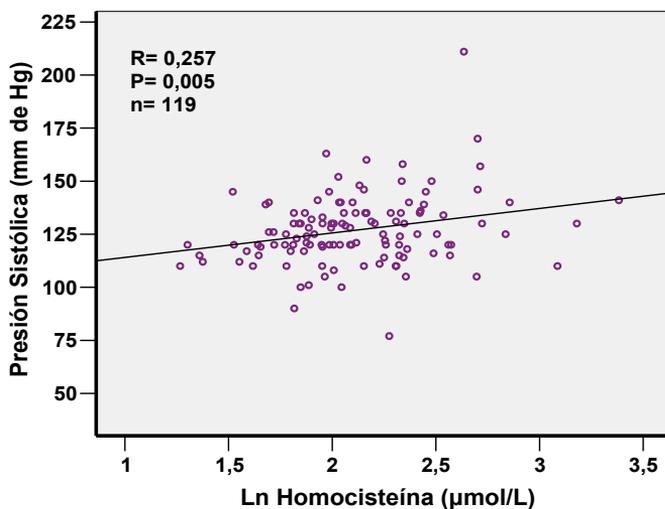
En las siguientes figuras aparecen representadas las distintas correlaciones que se han obtenido de la variable Homocisteína con los diferentes parámetros del estudio. Se observan correlaciones directas y significativas entre la Homocisteína y la edad (figura 22), índice de Framingham (figura 23), presión sistólica (figura 24), presión diastólica (figura 25), glucemia (figura 26) y la circunferencia de cintura (figura 27).



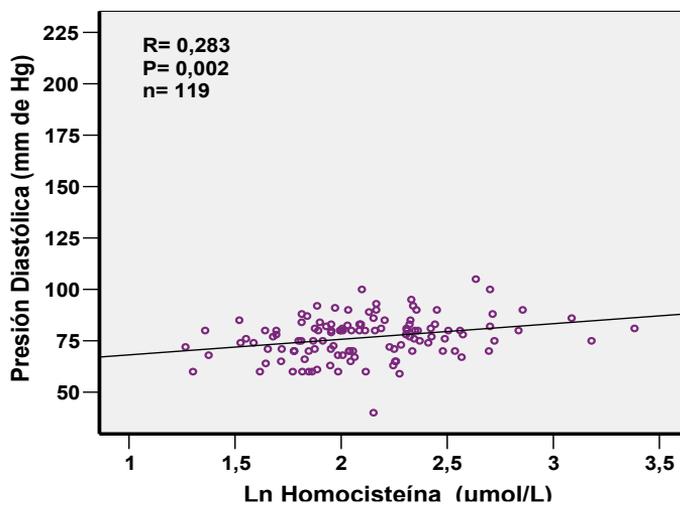
**Figura 22.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. ( R: Coeficiente de correlación de Pearson, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)



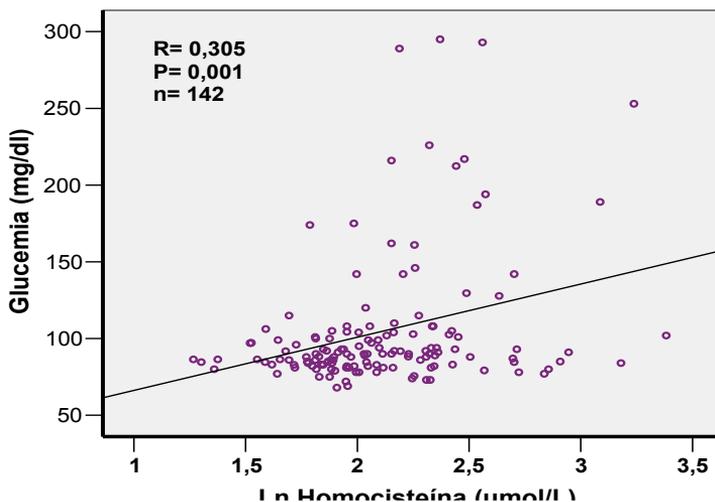
**Figura 23.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es el Índice de Framingham y la variable independiente es la Homocisteína. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)



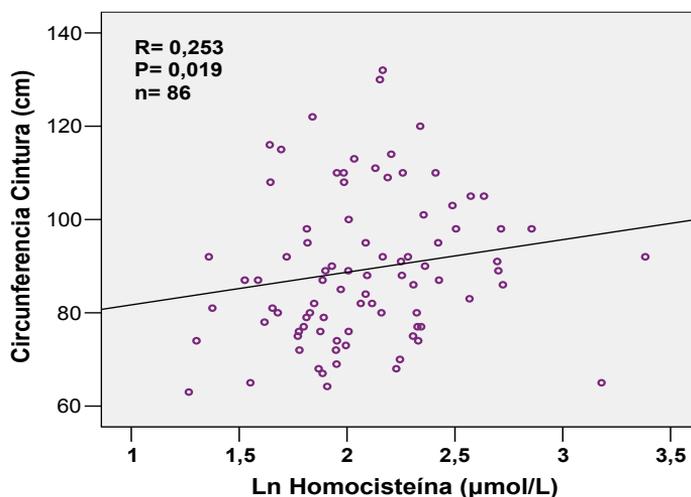
**Figura 24.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Homocisteína y la variable independiente es la Presión Sistólica. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)



**Figura 25.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Homocisteína y la variable independiente la Presión Diastólica. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. ( R: Coeficiente de correlación de



**Figura 26.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Homocisteína y la variable independiente es la glucemia. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Pearson, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos)

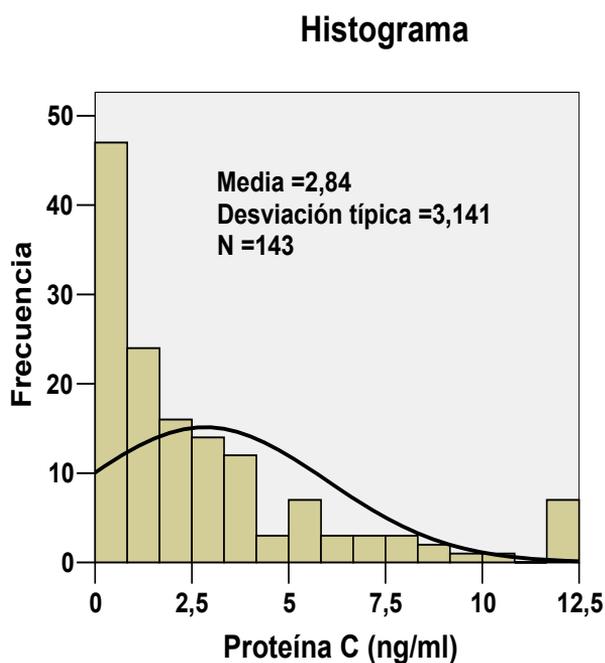


**Figura 27.** Nube de puntos ajustada a una recta en la que la variable dependiente es la Homocisteína y la variable independiente es la circunferencia de cintura. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Spearman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

No hemos encontrado asociación significativa de la Homocisteína con la variables, PCR, MDA, IMC, HDL, LDL, Índice aterogénico y MPO.

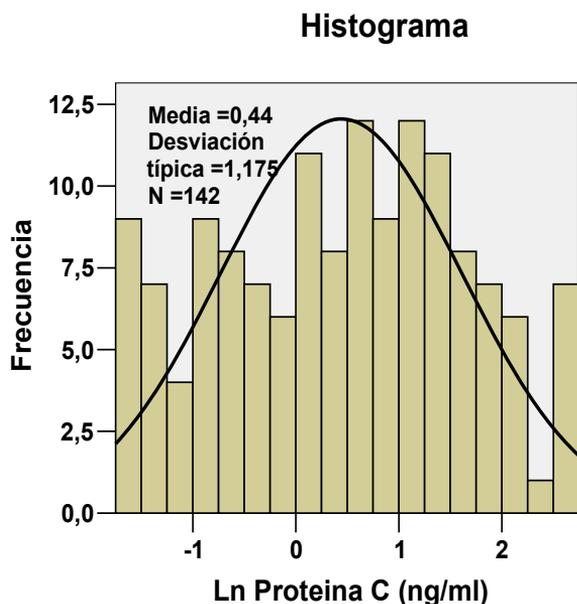
## 2.2 Proteína C reactiva (PCR).

Los valores de PCR de la población se representan en el histograma de la figura 29. Se observa una asimetría y apuntamiento hacia la izquierda, hacia valores inferiores a 2,5 ng/ml, que difiere claramente de una distribución normal. Este resultado era de esperar ya que los sujetos pertenecen la población sana clínicamente estable. La mediana es de 1,7 ng/ml (rango 0,2-12,5), primer cuartil de 0,57 ng/ml y tercero de 3,68 ng/ml .



**Figura 29.** Histograma de distribución frecuencias de la variable PCR. Se han calculado la Media , N(número de datos) y desviación típica. Según los test de normalidad, la variable no se ajusta a una distribución normal. (Test de Kolmogorov 0,001,  $p = 0,200$ ).

La transformación logarítmica de la variable corrige la asimetría representada en la Figura 29. La variable Ln PCR no difiere significativamente de una distribución normal, por lo que será empleada en lugar de la variable cruda en análisis que precisen una distribución normal, tal y como realizamos con la Homocisteína.



**Figura 30.** Histograma de distribución frecuencias de la variable Ln PCR. Se han calculado la Media , N(número de datos) y desviación típica. Según los test de normalidad la variable se ajusta a una distribución normal. (Test de Kolmogorov 0,063,  $p = 0,200$ ).

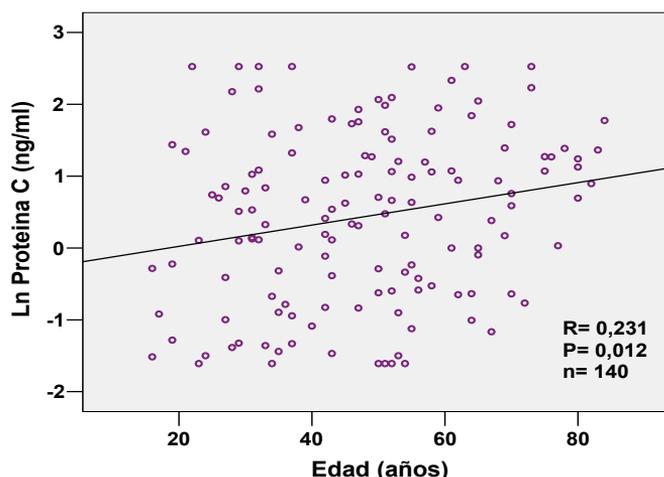
### 2.2.1 Descriptivo de la proteína C reactiva comparando las medias de las siguientes categorías.

- No se observan diferencias en cuanto al **sexo** con media en mujeres ( $2,80 \pm 0,344$  ng/ml) y en hombres ( $2,89 \pm 0,40$  ng/ml), (Test U Mann Whitney 2142,5  $p = 0,391$ ).
- Se han observado diferencias significativas al comparar las medias de diabéticos frente a los no **diabéticos**, siendo superior las del grupo de los diabéticos ( $4,25$  vs  $2,62$  ng/ml).
- No se observan diferencias significativas entre los grupos de **dislipémicos** frente a los no dislipémicos.
- Se encuentran cifras significativamente superiores en **obesos** ( $4,37$  ng/ml) frente a los no obesos ( $2,52$  ng/ml).
- Observamos cifras superiores en sujetos **hipertensos** respecto a los no hipertensos ( $3,37$  vs  $2,63$  ng/ml), diferencias que no alcanzan significación estadística (Test U Mann Whitney 1669,0  $p = 0,089$ ).

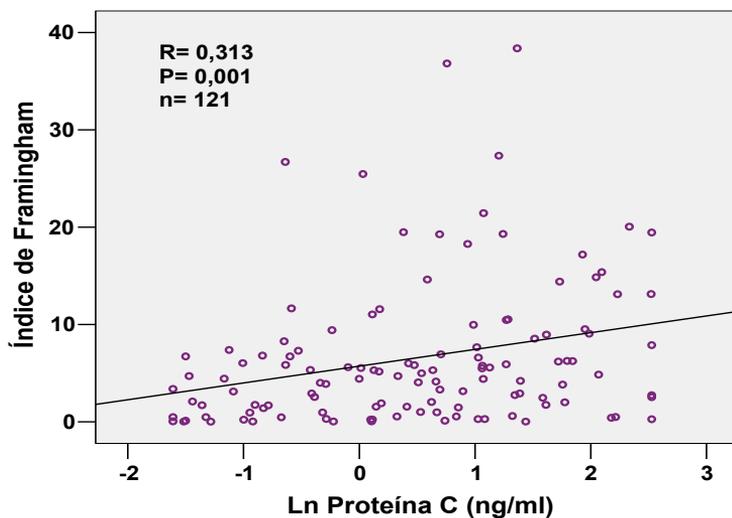
- Las diferencias que se observan entre los 106 no **fumadores** (mediana 1,61, rango de 0,2 a 12,5) y los 38 fumadores (mediana 2,16, rango 0,22 a 12,27) no son significativas (Test U Mann Whitney 1682,  $p = 0,132$ ).
- Los sujetos que beben **alcohol** presentan cifras medias de 3,1 ng/ml frente a los que no beben que presentan cifras medias de 2,7 ng/ml. Esta diferencia no tiene significación estadística.

## 2.2.2 Correlaciones de la proteína C reactiva con los distintos parámetros del estudio.

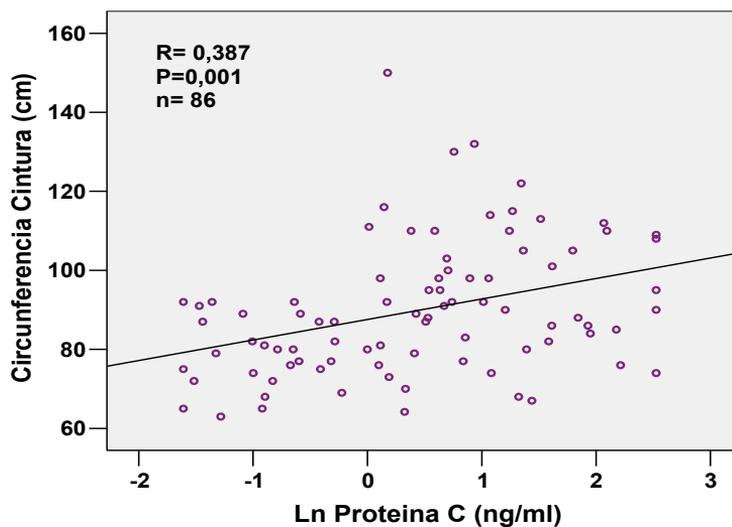
En siguientes figuras aparecen representadas las correlaciones que se han encontrado con la PCR y las variables determinadas en este estudio. Como podemos observar existen correlaciones directas entre la PCR y la edad (figura 31), el índice de Framingham (figura 32), la circunferencia de cintura (figura 33), el IMC (figura 34), la glucemia (figura 35) y los triglicéridos (figura 36).



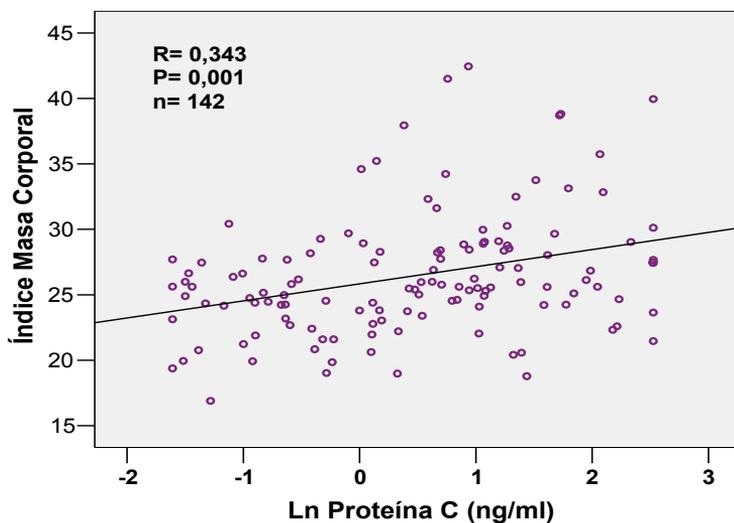
**Figura 31.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. ( R: Coeficiente de correlación de Pearson, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



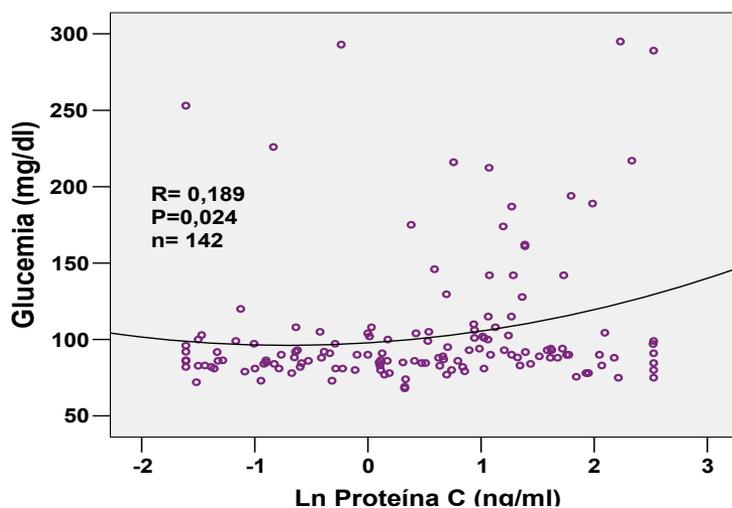
**Figura 32.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



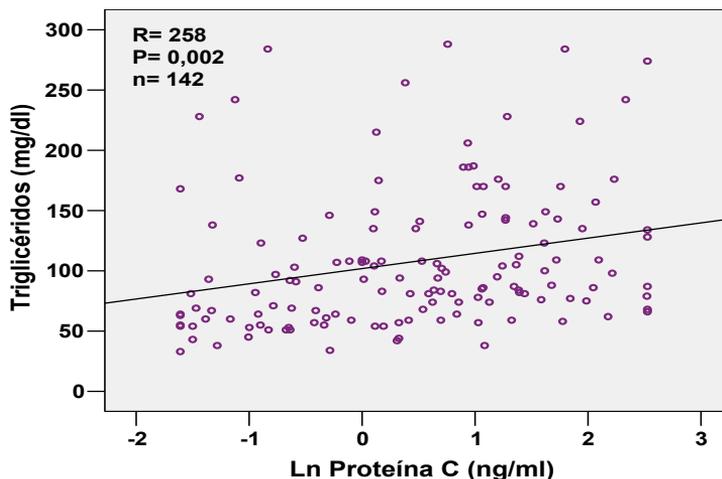
**Figura 33.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



**Figura 34.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



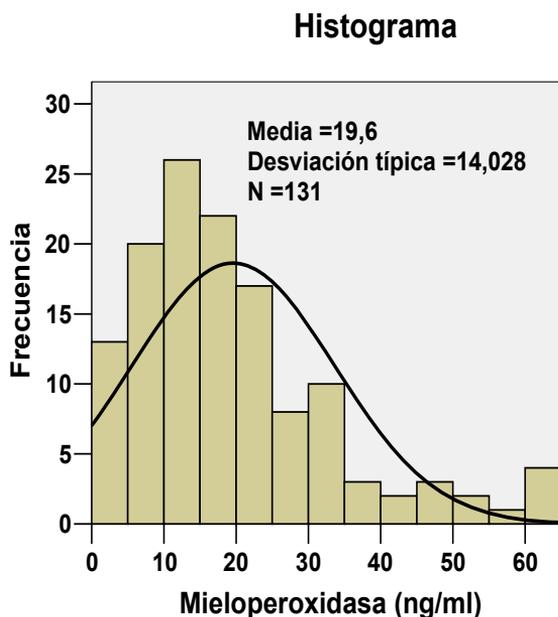
**Figura 35.** Nube de puntos ajustada a una función cuadrática. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Pearson, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



**Figura 36.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. ( R: Coeficiente de correlación de Pearson, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

## 2.3. Mieloperoxidasa (MPO).

Realizamos las pruebas de normalidad de la variable MPO (figura 37). Esta variable no sigue una distribución normal.

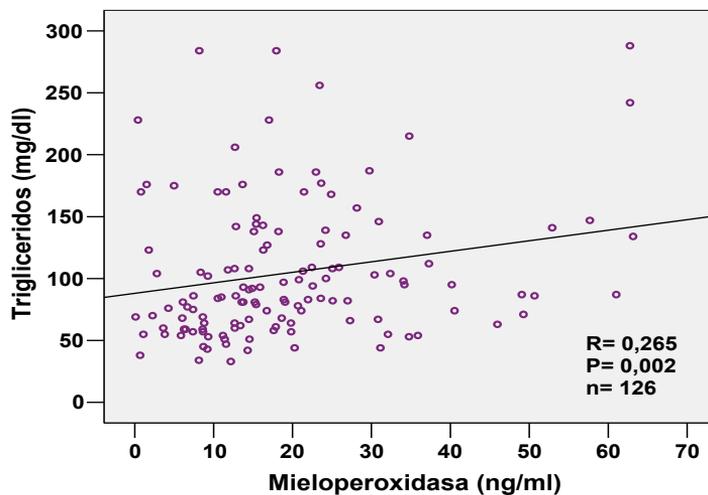


**Figura 37.** Histograma de distribución frecuencias de la variable Mieloperoxidasa. Se han calculado la Media , N(número de datos) y desviación típica. Según los test de normalidad la variable no se ajusta a una distribución normal. (Test de Kolmogorov 0,119, p = 0,001).

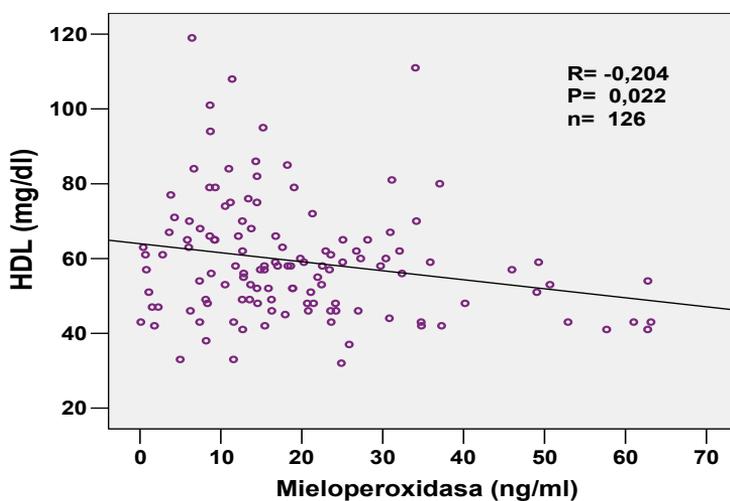
- No observamos diferencias en los niveles de MPO en cuanto al sexo: mediana y rango en mujeres y hombres respectivamente: 16,05 (0,687-63,15) y 16,25 (0,111-62,74).
- No encontramos diferencias dependiendo de la presencia o no de HTA.
- Tampoco encontramos diferencias en los grupos de pacientes con diabetes, dislipemia, hábito de fumar, beber alcohol ni tratamiento hormonal sustitutivo.
- Los pacientes obesos muestran significativamente cifras superiores de MPO ( 26,85 vs 18,00 ng/ml ,  $p = 0,040$ )
- La correlación entre la PCR y la MPO no es significativa (test de Spearman,  $p= 0,077$ )

### **2.3.1 Correlaciones entre la Mieloperoxidasa y los diferentes variables del estudio.**

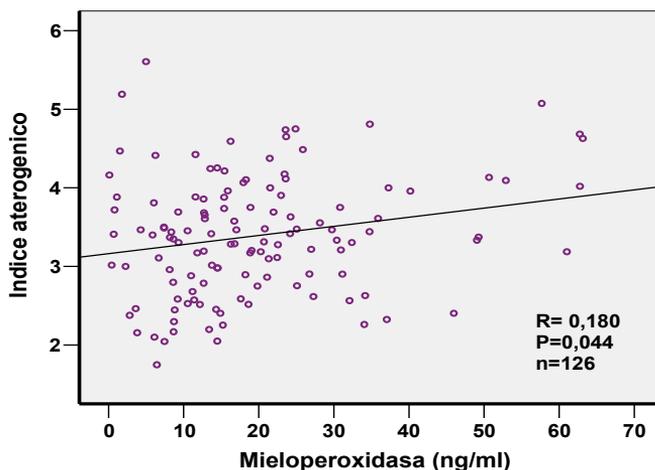
Al igual que hemos hecho con las variables anteriores, en las siguientes figuras describimos las correlaciones mas importantes que hemos encontrado entre la MPO y el resto de los valores de nuestro estudio. Cabe destacar que en este caso no observamos correlación significativa con la edad, el IMC y el índice de Framingham. Pero si se puede observar asociación significativa directa entre la MPO y los triglicéridos (figura 38). También aparece una asociación inversa con los valores HDL (figura 39) y con el índice aterogénico (figura 40).



**Figura 38.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Pearson, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



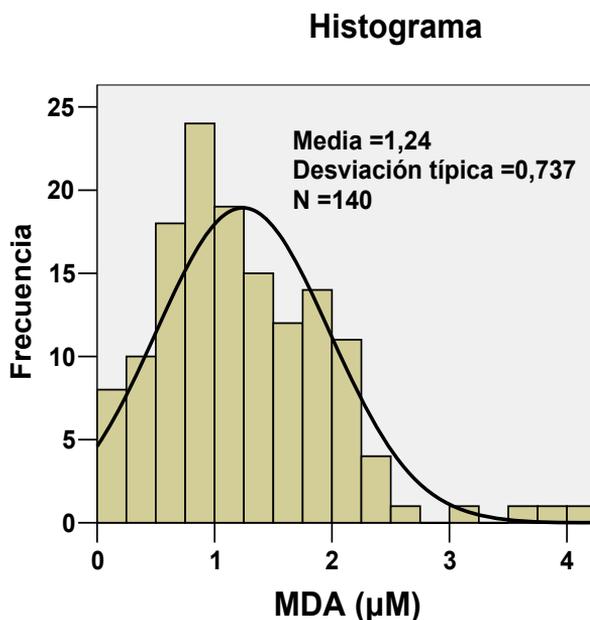
**Figura 39.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Spearman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



**Figura 40.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

## 2.4. Malondialdehido (MDA).

Realizamos las pruebas de normalidad a la variable Malondialdeido (MDA), resultando que esta variable no sigue una distribución normal como aparece representado en la figura 41.



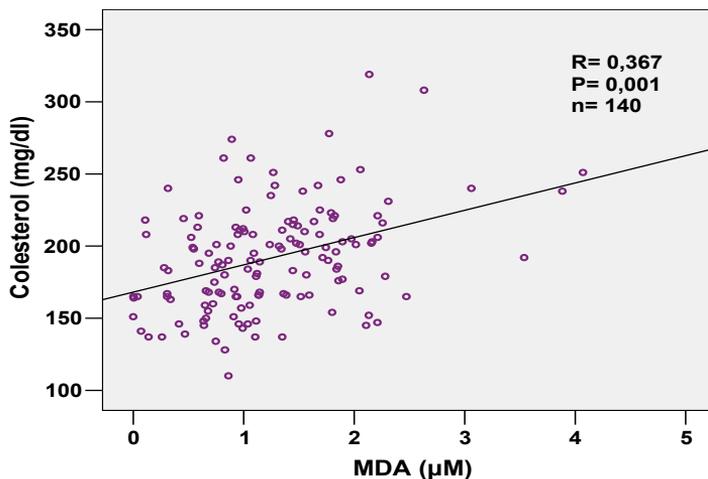
**Figura 41.** Histograma de Distribución frecuencias de la variable Malondialdeido (MDA). Se han calculado la Media, N (número de datos) y desviación típica. Según los test de normalidad la variable no se ajusta a una distribución normal. (Test de Kolmogorov 0,099,  $p = 0,002$ ).

### **2.4.1 Resultados de la variable MDA en las diferentes categorías.**

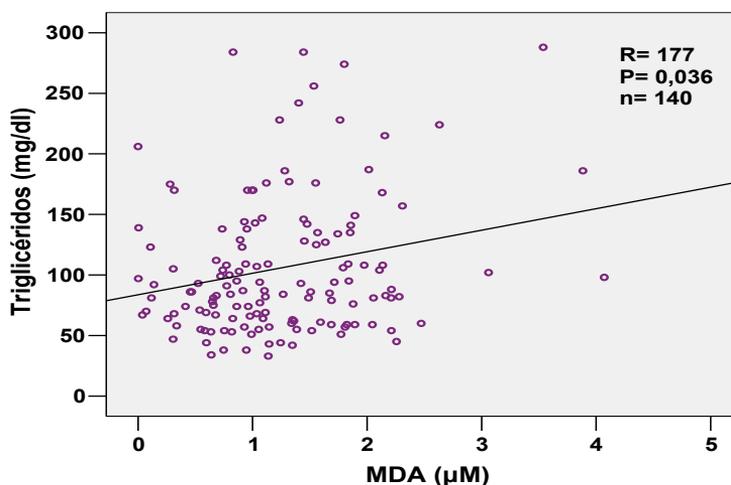
- No se observan diferencias significativas entre hombres ( $1,21 \pm 0,11 \mu\text{M}$ ) y mujeres ( $1,25 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ).
- No observamos diferencias significativas en los valores medios de MDA en sujetos no hipertensos ( $1,27 \mu\text{M}$ ) respecto a los hipertensos ( $1,16 \mu\text{M}$ ).
- Con respecto a los pacientes diabéticos no observamos diferencias significativas con las variables MDA en sujetos diabéticos y no diabéticos respectivamente ( $1,46 \mu\text{M}$  vs  $1,21 \mu\text{M}$ ).
- Los sujetos con dislipemia muestran cifras significativamente mayores de MDA respecto a los no dislipémicos ( $1,10 \mu\text{M}$  vs  $1,55 \mu\text{M}$ ).
- Cifras sin diferencias significativas en obesos ( $1,18 \mu\text{M}$ ) y no obesos ( $1,25 \mu\text{M}$ ).
- Los fumadores con respecto a los no fumadores no presentan diferencias significativas en los valores de MDA.
- MDA y alcohol: no encontramos diferencias significativas en los sujetos que beben ( $1,32 \mu\text{M}$ ) y no beben alcohol ( $1,2 \mu\text{M}$ ).

### **2.4.2 Correlaciones entre el MDA y el resto de las variables**

A continuación comentamos las correlaciones del MDA con las distintas variables del estudio. Como se puede observar en las siguientes figuras se han encontrado asociación del MDA con los valores de colesterol (figura 42) y triglicéridos (figura 43).



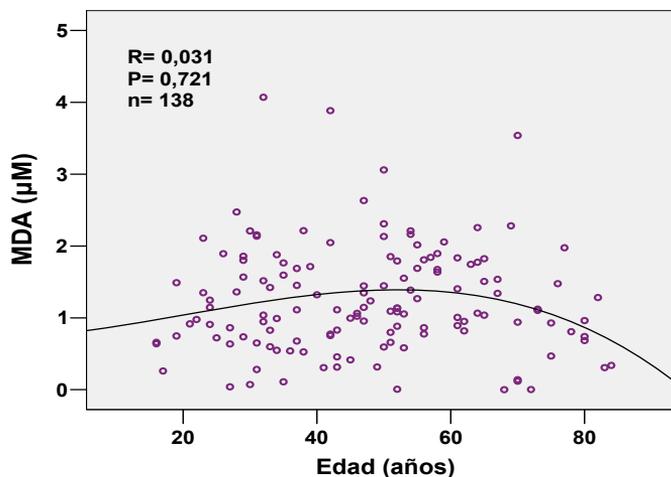
**Figura 42.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



**Figura 43.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

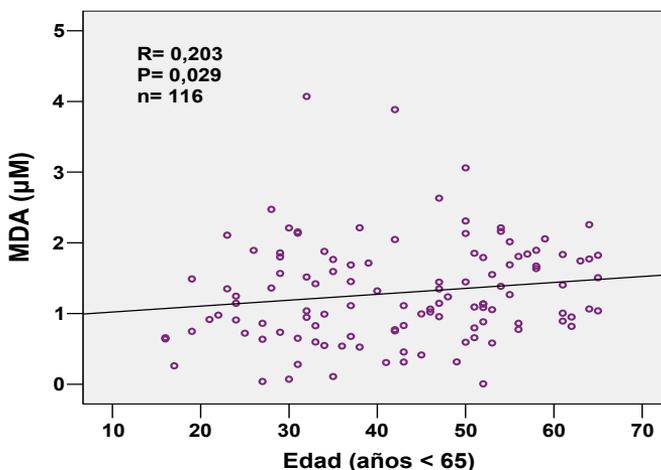
Con respecto a la variable Edad, no encontramos correlación significativa con los valores de MDA. Aunque tanto el ajuste lineal como el cúbico se acercan a la horizontal, el cúbico se ajusta mejor a la distribución,

ya que se observa una tendencia de descenso de los valores en sujetos de mayor edad.



**Figura 44.** Nube de puntos ajustada a una función cuadrática. La correlación no es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

sólo con la población de menores de 65 años. Al suprimir los sujetos de mayor edad sí que observamos correlación significativa entre MDA y la edad (figura 45).

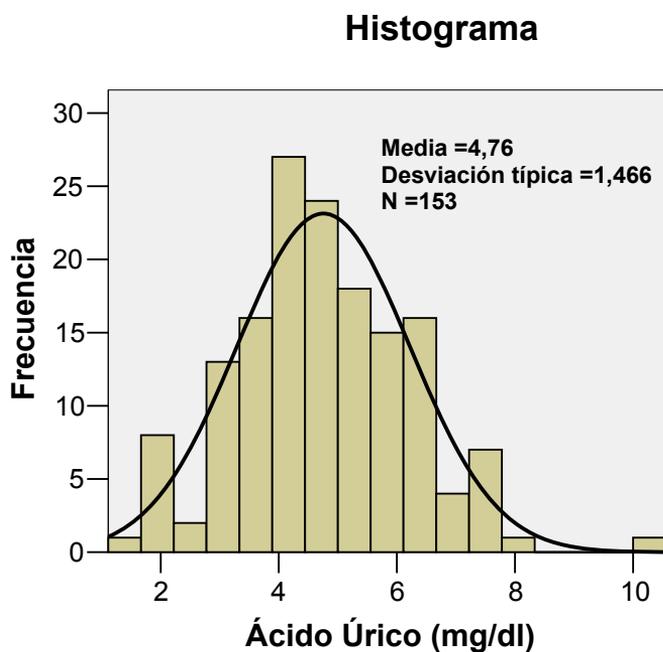


**Figura 45.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).



## 2.5 Ácido Úrico.

El Ácido úrico sigue una distribución normal como aparece representado en la figura 47.



**Figura 47.** Histograma de distribución frecuencias de la variable Ácido Úrico. Se han calculado la Media , N(número de datos) y desviación típica. Según los test de normalidad la variable se ajusta a una distribución normal. (Test de Kolmogorov 0,056,  $p = 0,200$ ).

### 2.5.1 Correlaciones del Ácido Úrico y el resto de las variables del estudio.

En la siguiente tabla representamos todas las correlaciones significativas que hemos encontrado del Ácido Úrico y los diferentes parámetros del estudio.

**Tabla 16. Correlaciones significativas del Ácido Úrico con otras variables del estudio.**

<b>Ácido úrico</b>	<b>Test Utilizado</b>	<b>R. Coeficiente de correlación</b>	<b>P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla.</b>	<b>Número de sujetos</b>
<b>Edad (años)</b>	Pearson	0,189	0,020	152
<b>Índice de Masa Corporal</b>	Spearman	0,340	0,001	138
<b>Circunferencia de cintura (cm)</b>	Spearman	0,501	0,001	94
<b>HDL (mg/dl)</b>	Spearman	-0,237	0,004	147
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	Pearson	0,160	0,048	153
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	Pearson	0,362	0,001	153
<b>LDL (mg/dl)</b>	Pearson	0,195	0,018	147
<b>GTP (UI)</b>	Pearson	0,271	0,001	135
<b>GOT (UI)</b>	Pearson	0,329	0,001	131
<b>Gamma GT (UI)</b>	Pearson	0,285	0,004	103
<b>Ln Homocisteína</b>	Pearson	0,270	0,001	141
<b>Ln PCR</b>	Pearson	0,214	0,011	142
<b>Índice de Framingham</b>	Spearman	0,363	0,001	130
<b>Lácteos</b>	Spearman	-0,223	0,008	139
<b>Aceite de oliva</b>	Spearman	-0,184	0,034	133
<b>Proteínas totales</b>	Spearman	0,178	0,028	153

### **3. Regresiones Múltiples.**

Una vez analizadas las asociaciones existentes entre las variables resultado de nuestro estudio con el resto de los parámetros, se han realizado las siguientes regresiones múltiples entre los diferentes parámetros, con el fin de realizar un análisis más profundo de nuestros resultados.

#### **3.1 Regresión múltiple de la Homocisteína como variable dependiente y la edad, glucemia, circunferencia de cintura y presión arterial.**

Analizamos en un modelo multivariable la asociación que observábamos entre la Homocisteína y los valores que mejor se han asociado a esta variable, con el fin de ver cual de ellos se asocia de forma independiente. Introducimos las siguientes variables: edad, circunferencia de cintura, glucemia y presión diastólica como variables dependientes representadas en la tabla 17. El modelo de regresión muestra que el único factor relacionado de forma independiente con la Homocisteína es la presión diastólica, al considerar en el modelo el resto de las variables citadas. También resultan resultados similares con la presión sistólica, pero al introducir las dos presiones en el estudio de regresión desaparece la significación. La circunferencia de cintura parece estar afectando a la asociación entre la Glucemia con la Homocisteína, ya que al no introducir esta variable en la regresión, la Glucemia se asocia significativamente con la Homocisteína, como aparece en la tabla 18, sin embargo al introducir la circunferencia de cintura esta asociación desaparece (tabla 17).

**Tabla 17. Regresión múltiple en la que se incluyen la variable Homocisteína como variable dependiente.**

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo		Coefficients no estandarizados		Coefficients estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-,518	3,787		-,137	,891
	Edad	,003	,032	,015	,106	,916
	Circunferencia Cintura	-,010	,035	-,039	-,282	,778
	Glucemia	,004	,016	,034	,266	,791
	Presión Sistólica	,076	,030	,306	2,526	,014

a. Variable dependiente: Homocisteína

**Tabla 18. Regresión múltiple en la que se incluyen la variable Homocisteína como variable dependiente y la edad, glucemia y presión sistólica como independientes.**

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo		Coefficients no estandarizados		Coefficients estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	,925	2,722		,340	,735
	Edad	-,013	,024	-,059	-,552	,582
	Glucemia	,020	,009	,219	2,236	,027
	Presión Sistólica	,051	,023	,219	2,244	,027

a. Variable dependiente: Homocisteína

### **3.2 Regresión múltiple de la PCR como variable dependiente y la edad, IMC, ácido Úrico y el Índice Aterogénico.**

Analizamos en un modelo multivariable la asociación que observábamos entre la PCR y los valores que mejor se asocian a esta variable para ver cual de los mismos se asocia de forma independiente.

Introducimos las siguientes variables: edad, IMC, Ácido Úrico, Índice aterogénico. El modelo de regresión muestra que el único factor relacionado de forma independiente con la PCR es el IMC, consideradas las diferencias por edad, ácido úrico e índice aterogénico. La asociación edad-PCR, cuando consideramos el resto de los factores no es significativa y, en todos los modelos, el factor asociado de forma independiente con la PCR es el IMC.

**Tabla 19. Se representan los resultados de la regresión múltiple en la que se incluyen la variable la proteína C reactiva como variable dependiente.**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
4	(Constant)	-1,707	,635			,008	-2,965	-,449
	Edad	,009	,006	,132	2,689	,174	-,004	,021
	Índice Masa Corporal k/m <sup>2</sup>	,058	,026	,241	2,230	,028	,007	,110
	Ac Úrico	,055	,079	,068	,701	,485	-,101	,212
	Índice aterogénico	-,009	,150	-,006	-,063	,950	-,306	,287

### 3.3 Regresión múltiple del Ácido Úrico con variable dependiente y la edad, IMC, HDL, LDL y Homocisteína y PCR.

Analizamos en un modelo multivariable la asociación que observábamos entre el Ácido Úrico y los valores que mejor se le asocian, para ver cual de éstos se correlaciona de forma independiente. Introducimos las siguientes variables: edad, IMC, HDL, LDL, Homocisteína y PCR. El modelo de regresión muestra que los valores relacionados

independientemente con Ácido Úrico son el IMC, los lípidos, siendo la relación inversa con la HDL, y la Homocisteína (n= 119). Por otro lado, al introducir la variable circunferencia de cintura todas estas asociaciones desaparecen, quedando solo la circunferencia de cintura (n= 75) como variable asociada de forma independiente con el Ácido Úrico ( 2º cuadro tabla 20).

**Tabla 20. En las presentes tablas se representan los resultados de la regresión múltiple en la que se incluyen la variable Ácido Úrico con variable dependiente.**

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo		Coefficients no estandarizados		Coefficients estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	1,255	1,276		,984	,327
	Edad	,002	,008	,022	,226	,822
	Indice Masa Corporal	,074	,030	,242	2,460	,015
	HDL	-,017	,008	-,186	-2,066	,041
	LDL	,008	,004	,165	1,965	,052
	Ln Homocisteína	,727	,325	,191	2,233	,028
	Ln PCR	,115	,111	,091	1,038	,302

a. Variable dependiente: Ac Úrico

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo		Coefficients no estandarizados		Coefficients estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	,300	1,531		,196	,845
	Edad	-,003	,010	-,033	-,262	,794
	Indice Masa Corporal	-,042	,055	-,154	-,763	,448
	HDL	-,012	,010	-,139	-1,212	,230
	LDL	,004	,004	,101	1,000	,321
	Ln Homocisteína	,650	,383	,181	1,698	,094
	Ln PCR	-,027	,141	-,022	-,195	,846
	Circunferencia Cintura	,051	,020	,578	2,562	,013

a. Variable dependiente: Ac Úrico

### 3.4 Regresiones Múltiples de MDA, Edad, colesterol y otros parámetros del estudio.

Analizamos en un modelo multivariable la asociación que observábamos entre el colesterol como variable dependiente y las variables que se asocian significativamente a los valores de colesterol como son la edad, el MDA, el IMC, la MPO, la PCR y el Ácido Úrico. Una vez realizada la regresión vemos que las únicas variables que se asocian significativamente de forma independiente son el MDA y la edad, siendo el MDA el que esta ejerciendo una mayor influencia sobre la predicción del dato de colesterol.

**Tabla 21. El las presentes tablas se representan los resultados de la regresión múltiple en la que se incluyen la variable Colesterol con variable dependiente**

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	149,742	19,046		7,862	,000
Edad	,515	,188	,253	2,746	,007
Indice Masa Corporal	,025	,760	,003	,033	,974
MDA	19,261	4,082	,403	4,719	,000
Mieloperoxidasa	-,370	,218	-,151	-1,698	,092
Ln PCR	-1,243	2,788	-,041	-,446	,657
Ac Urico	,372	2,337	,015	,159	,874

a. Variable dependiente: Colesterol

### 3.5 Regresiones múltiples del índice aterogénico y los triglicéridos con otras variables del estudio.

Analizamos en un modelo multivariable la asociación que observábamos entre el Índice aterogénico como variable dependiente y las variables que se asocian con él: edad, creatinina, glucemia, IMC, Ácido

Úrico y circunferencia de cintura. Una vez realizada la regresión vemos que las únicas variables que se asocian significativamente de forma independiente con el índice aterogénico son el Ácido Úrico y el IMC, siendo el IMC el que está ejerciendo una mayor influencia sobre la predicción del dato de Índice aterogénico, al tener un coeficiente Beta superior (tabla 22)

**Tabla 22. Regresión múltiple del índice aterogénico y otras variables del estudio.**

Modelo		Coeficientes <sup>a</sup>				
		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	1,169	,432		2,704	,008
	Edad	-,005	,005	-,118	-1,176	,242
	Glucemia	,002	,002	,105	1,098	,275
	Ac Úrico	,125	,055	,216	2,257	,026
	Creatinina	,062	,221	,026	,282	,779
	Índice Masa Corporal	,060	,017	,343	3,550	,001

a. Variable dependiente: Índice aterogénico

Analizamos en un modelo multivariable la asociación que observábamos entre los triglicéridos como variable dependiente y los variables que se asocian significativamente a los valores de triglicéridos como son la edad, IMC, MDA, MPO, PCR, Glucemia, Ácido Úrico y circunferencia de cintura. Una vez realizada la regresión vemos que las únicas variables que se asocian significativamente de forma independiente con los triglicéridos son el IMC, glucemia y Ácido Úrico. Siendo el IMC el valor que está influyendo sobre los valores de triglicéridos con una amplia diferencia con la glucemia y el Ácido Úrico. (tabla 23)

**Tabla 23. Regresión múltiple de triglicéridos y otras variables del estudio.**

		Coeficientes <sup>a</sup>				
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	-90,621	30,067		-3,014	,004
	Edad	-,329	,350	-,104	-,939	,351
	Indice Masa Corporal	6,070	1,661	,580	3,655	,001
	MDA	12,469	6,758	,174	1,845	,070
	Mieloperoxidasa	-,384	,372	-,103	-1,031	,306
	Ln PCR	-1,801	4,736	-,038	-,380	,705
	Glucemia	,435	,183	,268	2,372	,021
	Ac Urico	9,242	4,268	,227	2,165	,034
	Circunferencia Cintura	-,476	,532	-,150	-,894	,374

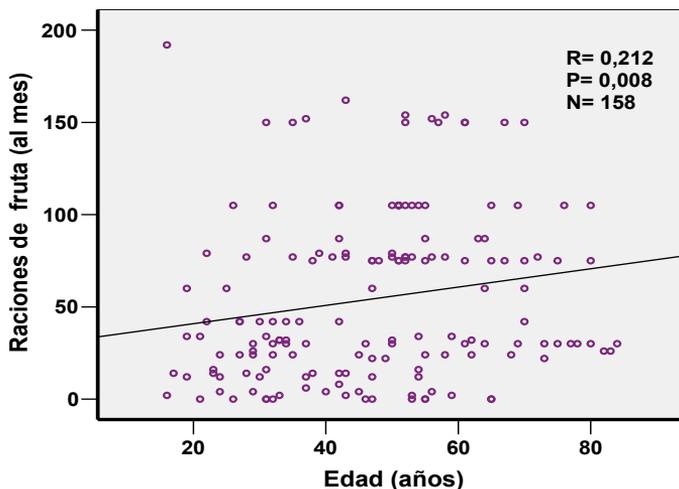
a. Variable dependiente: Triglicéridos

## 4. Dieta

Hemos analizado los valores obtenidos de la dieta con la edad y el resto de los parámetros. A continuación presentamos las correlaciones que hemos encontrado más relevantes para este estudio. Nos hemos centrado en los valores de la dieta referentes a los alimentos de origen vegetal ya que son los más ricos en vitaminas y antioxidantes y quizá la ingesta continuada de este tipo de productos son los que más nos podrían influir en el equilibrio redox y en los factores de riesgo cardiovascular.

### 4.1 Consumo de Frutas.

En primer lugar nos detenemos en los resultados relacionados con el consumo de Frutas. A continuación se representa la asociación entre la edad y el consumo de frutas (figura 48) donde se observa una asociación significativa positiva.



**Figura 48.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Spearman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

#### 4.1.1. Resultados que hemos analizado referentes al consumo de frutas y otras variables de este estudio.

- Se observa una correlación positiva entre el consumo de frutas y la edad.
- No observamos relación entre la frecuencia de consumo de frutas y los valores de colesterol, índice aterogénico, homocisteína, PCR y marcadores de estrés oxidativo.
- Sí observamos una tendencia de índices superiores de Framingham y mayor consumo de frutas, debido probablemente a que los individuos mayores consumen más fruta que los jóvenes y la edad es uno de los valores más relevantes en el índice de Framingham.
- No existen diferencias significativas en el consumo de frutas respecto al sexo, (Chi cuadrado no significativo).

#### **4.1.2 Consumo de frutas, Homocisteína y PCR**

- Para valorar si el consumo de frutas modifica la relación que observábamos entre la edad y la Homocisteína construimos un modelo de regresión considerando el consumo de raciones/mes de frutas y la edad. Al introducir la variable consumo de frutas no se observa asociación significativa con la Homocisteína y tampoco se modifica la relación entre la edad y la Homocisteína (el coeficiente beta cambia de 0,004 a 0,005).
- De igual modo, si ajustamos la asociación que observábamos entre la PCR y la edad por el consumo de frutas obtenemos resultados similares: el consumo de frutas no se asocia significativamente con la PCR ni modifica la asociación entre ésta y la edad (el coeficiente de regresión cambia de 0,015 a 0,014).

#### **4.2 Consumo de aceite de Oliva.**

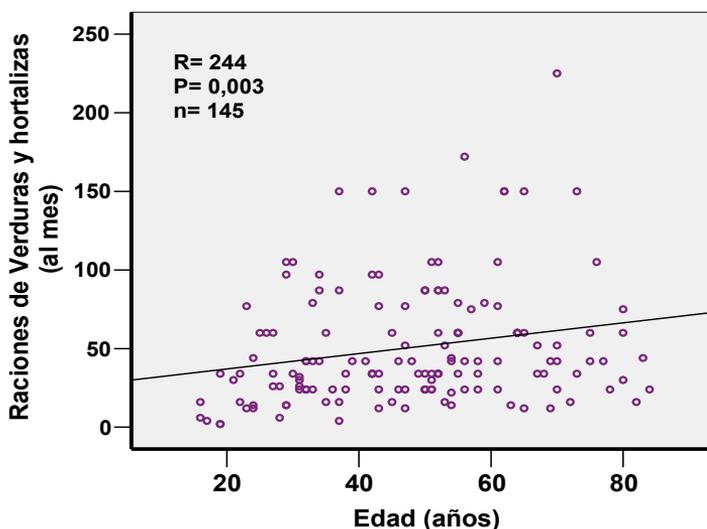
Nos detenemos en el consumo de aceite de oliva ya que éste contiene grandes cantidades de vitaminas antioxidantes como la vitamina E, por lo que pueden estar influyendo en los resultados observados de las diferentes variables del estudio.

- Si consideramos tres grupos según muestren un consumo bajo (inferior a 30 raciones/es), diario y elevado (más de 30 raciones/mes) de aceite de oliva, observamos niveles de homocisteína inferiores en sujetos que consumen más de 30 raciones diarias de aceite de oliva, diferencias significativas.
- Analizando cómo se modifica la relación que observábamos entre la edad y la homocisteína ajustando por el consumo de aceite de oliva mediante un modelo de regresión. Observamos que existe una correlación inversa entre el consumo de aceite de oliva y la homocisteína. Es decir, el

incremento de la homocisteína asociado a la edad se anularía con el consumo creciente de aceite de oliva, donde la asociación negativa entre aceite de oliva y la homocisteína se encuentra en el límite de la significación estadística ( $p= 0,068$ ).

### 4.3 Consumo de verduras y hortalizas asociado a la edad.

Sumamos las variables verduras y hortalizas, según los resultados obtenidos en el test de la dieta, y analizamos la asociación de esta variable con la edad. Existe una correlación positiva entre la edad y el consumo de verduras y hortalizas, la cual aparece representada en la figura 49.

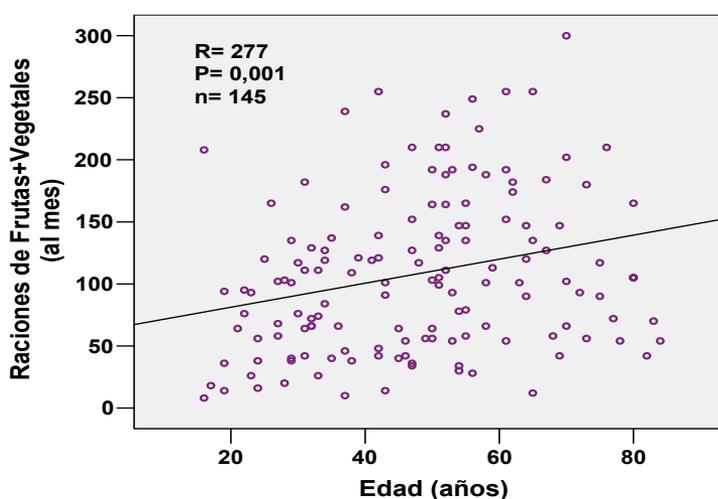


**Figura 49.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Spearman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

## 4.4 Consumo conjunto de frutas, verduras, hortalizas y legumbres.

Puesto que la cantidad de estos alimentos no ha sido medida sino estimada por los propios sujetos en la encuesta, consideramos sumar la ingesta de frutas, verduras, hortalizas y legumbres en una nueva variable a la que denominamos frutas y vegetales. De manera que obtenemos un parámetro que indicaría “dieta saludable” ya que desde el punto de vista nutricional frutas y vegetales tendrían efectos paralelos sobre el estado redox y sistema cardiovascular.

Observamos una asociación lineal ligeramente mayor a las encontradas anteriormente en los valores de la dieta, entre la edad y el consumo de frutas y vegetales (figura 50).



**Figura 50.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. (R: Coeficiente de correlación de Spearman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

### 4.4.1 Consumo de frutas y vegetales, Homocisteína , PCR y edad.

- Puesto que el consumo de frutas y vegetales se asocia con la edad, analizamos en esta regresión si este consumo modifica la relación

que observábamos entre la edad y la Homocisteína. Los resultados obtenidos reflejan que la edad se correlaciona significativamente tanto con la homocisteína como con el consumo de frutas y vegetales, y no observamos correlación entre el consumo de frutas y vegetales y la homocisteína, al igual que ocurría en la asociaciones bilaterales. Por lo tanto, la variable consumo de frutas y vegetales no afecta a la relación entre la edad y la Homocisteína.

- Analizamos si la introducción del consumo de frutas y vegetales modifica la relación que encontrábamos con la PCR y la edad. En las correlaciones simples existe asociación positiva entre edad y PCR y no observamos correlación entre la PCR y el consumo de frutas y vegetales. Al ajustar en el modelo de regresión múltiple incluyendo el consumo de frutas y vegetales, la relación que observábamos entre PCR y edad no es significativa. Es decir al introducir la variable frutas y vegetales la cual se asocia con la edad, desaparece regresión entre PCR y edad.

**Tabla 24. Regresión múltiple del las variables PCR, Edad y consumo de frutas y Vegetales.**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-,148	,300		-,494	,622
	Edad	,013	,006	,191	2,186	<b>,031</b>
2	(Constant)	-,227	,313		-,726	,469
	Edad	,011	,006	,164	1,777	,078
	Frutas y vegetales	,002	,002	,084	,907	,366

Variable dependiente: ln PCR

#### **4.4.2. Edad, MDA y consumo de frutas y vegetales en sujetos entre 41 y 65 años.**

La ingesta de frutas y vegetales es significativamente superior en sujetos entre 41 y 65 años respecto a sujetos menores de 40 años y no se observan diferencias en cuanto al sexo. No observamos diferencias en el consumo elevado o bajo en cuanto al promedio de: IMC, índice aterogénico, homocisteína, PCR y marcadores de estrés oxidativo.

En el modelo de regresión valoramos el grado de asociación entre edad y MDA entre los 41 y 65 años y obtuvimos una asociación lineal en el límite de la significación ( $p= 0,057$ ). Sin embargo, si introducimos la variable frutas y vegetales para que se ajuste a la relación edad MDA por esta variable, observamos que existe una asociación lineal positiva y significativa entre la edad y MDA, y una relación negativa entre MDA y consumo de frutas y vegetales, de forma que la relación entre la edad y MDA queda modificada por el factor consumo de frutas según al siguiente ecuación:

$$\text{MDA} = 0,038 + 0,032 \times \text{edad} - 0,02 \times \text{raciones mes (frutas y vegetales)}.$$

Como se observa en la figura 42 la correlación entre edad y MDA no es significativa, sin embargo la edad sí se asocia significativamente con el consumo de frutas y vegetales.

**Tabla 25. Regresión múltiple del las variables MDA, Edad y consumo de frutas y vegetales.**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-,028	,771		-,037	,971
	Edad	,026	,015	,235	1,760	,084
2	(Constant)	,330	,750		,439	,662
	Edad	,029	,014	,262	2,047	,046
	Frutas y vegetales	-,004	,002	-,317	-2,478	,016

Se representan el coeficiente de regresión, el grado de significación de la regresión múltiple en la que se incluyen la variable MDA como dependiente y Edad y consumo de frutas y vegetales como variables independientes. La siguiente regresión se realizó sólo con individuos de edades comprendidas entre 41 a 65 años.

El modelo muestra una asociación significativa entre edad y MDA y negativa entre MDA y consumo de frutas y vegetales. Como se puede observar en el modelo 2 de la tabla 25, al incluir en la ecuación la variable frutas y vegetales ajusta el peso de la asociación, y modifica los coeficientes de significación reforzando el grado de asociación del MDA con la edad hasta el punto de incluirlos dentro del grado de significación. De forma que la edad aumenta los valores de MDA y la variable frutas y vegetales por el contrario los disminuye.

Se han analizado las variables residuales de MDA frente a la variable edad y se observa que no se vulneran significativamente los supuestos del modelo de regresión.

## DISCUSIÓN

---

---



## Discusión

Los problemas cardiovasculares, y en especial en el envejecimiento, son la principal causa de muerte en los países occidentales. En los últimos años ha surgido un creciente interés por identificar los factores de riesgo más influyentes en el deterioro del sistema cardiovascular.

El aumento de la esperanza de vida y el continuo envejecimiento de la población occidental, están motivando en los últimos años un gran número de estudios no sólo en la investigación básica, sino también en la clínica, sobre el envejecimiento y los procesos moleculares que lo causan. Numerosos resultados avalan la tesis de que el estrés oxidativo parece desempeñar un papel importante tanto en la aparición de enfermedades cardiovasculares, como en los procesos moleculares del envejecimiento. Por ello, nos resultó interesante plantearnos un estudio con una población de un amplio rango de edad, con la que poder estudiar estos procesos oxidativos e identificar que moléculas, hábitos o circunstancias influyen de forma más evidente en el proceso de envejecimiento y en los principales factores de riesgo cardiovascular.

Una de las primeras cuestiones que nos planteamos a la hora de diseñar este estudio fueron las características de nuestra población. De esta forma, el objetivo fue obtener una población sana, sin patologías importantes que pudieran sesgar los resultados, pero a la vez que se tratara de una población real con los cambios fisiológicos normales que se producen con la edad. De esta forma, los criterios de inclusión y de exclusión fueron propuestos con este objetivo y pensamos que han cumplido bien las expectativas.

Debido a que hay un mayor número de mujeres que de hombres que asisten a los centros de atención primaria, nuestra población es mayoritariamente femenina (66 %). Por ello, hemos comparado las variaciones obtenidas de los distintos parámetros entre hombres y mujeres,

ya que el sexo es un factor de riesgo cardiovascular añadido. No encontramos diferencias con respecto al sexo en el número de personas diagnosticadas como hipertensas, diabéticas, obesas o con algún grado de intolerancia a los hidratos de carbono. Tampoco aparecen diferencias con respecto al hábito de fumar, aunque si parece que los varones de nuestra población acostumbran a beber más alcohol que las mujeres. Cuando nos fijamos, no en las respuestas que han dado en el test los sujetos de nuestro estudio, sino en los datos analíticos, y haciendo un análisis de las medias, vemos que existen diferencias significativas entre hombres y mujeres en el IMC, circunferencia de cintura, índice aterogénico y marcadores hepáticos, siendo en todos los casos el grupo de hombres, los que tienen valores más elevados de estas variables lo que se ajusta a estudios previos (Ofotokun & Pomeroy, 2003). No obstante, no hemos encontrado diferencias significativas entre sexos en las variables resultado, excepto en el caso de la homocisteína, que discutiremos posteriormente. Por ello, no tendremos en cuenta el sexo de los sujetos a la hora de realizar las correlaciones de las diferentes variables excepto en el riesgo cardiovascular, ya que el sexo es uno de los factores que se tienen en cuenta para el cálculo el índice de Framingham.

Como se puede apreciar en la tabla 8 de los resultados, en donde aparecen los descriptivos de los datos, no se han obtenido valores atípicos o no esperados, así que partimos de una población sana y representativa de una ciudad del levante español. Aunque conviene destacar que el valor medio de IMC es de 26,6, lo que indica que nuestra población padece cierto sobrepeso, lo que coincide con los datos aportados por la Conserjería de Sanidad y Consumo de la Región de Murcia, dato que es interesante tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Siguiendo los criterios de exclusión, han sido excluidos los pacientes diabéticos, hipertensos o dislipémicos que no estaban bien controlados. Esto se hizo con la finalidad de que quedaran excluidos los casos más agudos, con el fin de eliminar datos extremos que podían

sesgar los resultados. A pesar de esto, los datos de glucemia de los pacientes diagnosticados como diabéticos son muy superiores a los no diabéticos, es decir que los diabéticos siguen teniendo una concentración superior de glucosa en sangre que los no diabéticos, a pesar de sus tratamientos y de estar considerados por el médico como bien controlados. Debido a ésto, nos encontramos datos analíticos muy por encima de los resultados normales de un paciente sano, a pesar de lo especificado en los criterios de exclusión. Esto ocurre también en el caso de los individuos hipertensos y los dislipémicos, ya que algunos de ellos tienen cifras de presión y de colesterol y triglicéridos que superan los límites de normalidad establecidos en clínica. Comparativamente, al analizar las medias, los catalogados como hipertensos y dislipémicos también presentan unos valores anormales de presión arterial y concentración de lípidos en sangre frente al resto de la población. A pesar de estas circunstancias, no encontramos motivos firmes para excluir del estudio a pacientes que presentan datos que están considerados por encima del rango de la normalidad, ya que sus valores nos enseñan parte de la compleja realidad que existe en las poblaciones humanas y que conviene tener en cuenta en los resultados, si nuestra población presentara valores homogéneos e ideales sería difícil encontrar respuestas a los objetivos que nos hemos planteado en este estudio.

Una vez descritas las características generales de nuestra población y recordando que el primero de nuestros objetivos es **“describir y analizar factores asociados al riesgo cardiovascular a lo largo del proceso natural de envejecimiento y su relación con marcadores de estrés oxidativo”** pasamos a describir y analizar las correlaciones que hemos encontrado con la edad y el resto de los factores de riesgo cardiovascular. La edad se asocia de forma significativa con la glucosa (figura 16), la presión sistólica (figura 15), presión diastólica (figura 14) y los lípidos (figuras 18), resultados que coinciden con el conocimiento general establecido en clínica, aunque no sea fácil encontrar estudios

donde tantos valores con alta incidencia en la fisiopatología cardiovascular se correlacionen con la edad (Grundy, 2005). Aunque estos resultados eran esperados, es interesante resaltarlos ya que refuerzan el grado de confianza y la fiabilidad de nuestros datos.

También se observa correlación de la edad con Homocisteína, ácido úrico y PCR.

Hay numerosos estudios que consideran la Homocisteína (Welch & Loscalzo, 1998; Hankey & Eikelboom, 1999; Wierzbicki, 2007; Marcus *et al.*, 2007) y al ácido úrico (Glantzounis *et al.*, 2005; Schachter, 2005; Dawson *et al.*, 2007; Ioachimescu *et al.*, 2008a) como factores de riesgo cardiovascular, y la correlación observada en nuestros resultados entre estas moléculas y la edad refuerzan esta hipótesis. También se han realizado algunos estudios que asocian la PCR y la inflamación como un factor de riesgo cardiovascular, el hecho de que la PCR aumente con la edad puede ser un dato que ayude a reforzar esta hipótesis aunque estos resultados se comentarán con detalle más adelante (Woodward *et al.*, 2003; Cesari *et al.*, 2003; Fortmann *et al.*, 2004).

Además de lo expuesto, no se han encontrado más correlaciones de la edad con el resto de las variables relacionadas con el estrés oxidativo como son con la MPO y el MDA.

## **Estrés oxidativo y riesgo cardiovascular en el envejecimiento.**

Uno de los principales objetivos de este estudio fue el de valorar una posible relación directa entre el estrés oxidativo y el riesgo cardiovascular. Para ello, lo primero que buscamos fue un marcador de riesgo cardiovascular que integrara a varios de los factores de riesgo más importantes. Como hemos comentado en apartados anteriores, se ha calculado el índice de Framingham. Este índice permite calcular la probabilidad de tener un evento cardiovascular en los próximos 10 años.

Sin entrar a valorar si este dato está o no sobrevalorado en la población de nuestro estudio, analizamos la relación con la Homocisteína. Por medio de un test no paramétrico hemos encontrado una correlación significativa entre la Homocisteína y el índice de Framingham (figura 23), lo que indica que la Homocisteína se comporta como un marcador de riesgo cardiovascular lo cual esta de acuerdo con estudios previos (Welch & Loscalzo, 1998; Hankey & Eikelboom, 1999; Wierzbicki, 2007; Marcus *et al.*, 2007), esta correlación no deja de resultar novedosa ya que hay poca documentación que relacionen estos dos parámetros. También estudiamos los resultado obtenidos de la homocisteína con otras variables del estudio y encontramos correlaciones con la HTA ( figura 24 y 25), glucemia (figura 27) y circunferencia de cintura (figura 28). Todos ellos están considerados como factores de riesgo cardiovascular, aunque de estos resultados quizá las correlaciones más inesperadas serían las de la circunferencia de cintura, ya que el resto de los datos se han tenido en cuenta para el cálculo del índice de Framingham, cuya asociación con la Homocisteína ya ha sido comentada. Pensamos que resulta importante destacar el hecho que los pacientes de nuestro estudio presentan unos valores de Homocisteína dentro del rango de normalidad, y sólo 8 individuos de los 140 en los que se ha determinado esta variable presentan cifras de Homocisteína por encima de 15  $\mu\text{mol/L}$ , estando estos 8 individuos en un rango de edad inferior a 60 años. Se ha documentado la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo cardiovascular (Welch & Loscalzo, 1998; Hankey & Eikelboom, 1999; Wierzbicki, 2007; Marcus *et al.*, 2007) pero en nuestro estudio los valores están en su mayoría dentro del límite de normalidad ( $<15 \mu\text{mol/L}$ ) y aún así resulta interesante comprobar como se correlaciona con la edad y el índice de Framingham. De manera que la Homocisteína resulta un eficaz marcador de riesgo cardiovascular para los sujetos de nuestro estudio. También como se ha documentado en otros estudios (Nehler *et al.*, 1997; Hankey & Eikelboom, 1999; De *et al.*, 2002) los

valores medios de Homocisteína en la población masculina son significativamente superiores a los de la población femenina.

Una vez descritas las correlaciones más relevantes de esta molécula con el resto de los parámetros, realizamos una regresión múltiple con los valores que mejor se asociaban a la Homocisteína, considerando a ésta como la variable dependiente. Estos análisis multivariados nos pueden aportar información adicional sobre los datos obtenidos, ya que al existir muchas asociaciones cruzadas entre los parámetros del estudio como por ejemplo la edad, no sabemos si estas asociaciones pueden estar actuando como factores de confusión en alguna de las correlaciones significativas descritas. De forma que al realizar la regresión múltiple con los valores de Homocisteína y considerar la relación de ésta con la edad, circunferencia de cintura, glucemia y la presión arterial solo la presión arterial se asocia de forma independiente con la Homocisteína (tabla 17 de los resultados). Este resultado podría interpretarse como que la asociación que existe entre la presión arterial y el resto de las variables que participan en esta regresión como son la glucemia, la edad y la circunferencia de cintura podrían estar interviniendo en la correlación de la Homocisteína con estas variables, siendo la presión arterial el factor que está ejerciendo la confusión en estas asociaciones. De forma que la única variable que se asocia de forma independiente y la que más está influyendo sobre la Homocisteína sería la presión arterial.

El hecho de que la Homocisteína parece actuar alterando la función endotelial a través de estrés oxidativo (Topal *et al.*, 2004), podría ser una posible explicación por la cual su presencia en plasma participe favoreciendo el aumento de la presión arterial (Welch & Loscalzo, 1998; Hankey & Eikelboom, 1999). Estos datos nos sugieren la posibilidad de plantear estudios que nos ayuden a comprender los mecanismos que subyacen en la relación entre Homocisteína y presión arterial.

En los últimos años la PCR está siendo considerada como un marcador de riesgo cardiovascular (Cesari *et al.*, 2003; Bisio *et al.*,

2005; Bisoendial *et al.*, 2007), sin embargo, en nuestro estudio la PCR no presenta asociación con la Homocisteína, aunque ambas se asocian bien con la edad y al índice de Framingham. Esto indica que tanto la PCR como la Homocisteína actúan de forma independiente como marcadores de riesgo cardiovascular. Sin embargo un estudio realizado en 712 hombres con antecedentes de infarto no mortal describe una asociación débil entre estas dos variables (Evans *et al.*, 1997). El hecho de que nuestro estudio se realizara en una población sana y con una alta participación de mujeres podría justificar la diferencia en las asociaciones entre estas dos variables. Además, la asociación que encuentra Evans en su estudio podría ser consecuencia de algún factor de confusión que no se haya valorado. Por todo esto, y según los resultados de nuestro estudio la PCR y la Homocisteína actúan de forma independiente como marcadores de riesgo cardiovascular. Aunque parece que las dos moléculas desencadenan mecanismos que afectan la función endotelial por medio de procesos de estrés oxidativo, puede que los mecanismos de acción no coincidan, a pesar de que las consecuencias que encontramos cuando los valores de estas moléculas son elevadas sean similares.

Una molécula que se asocia a la PCR y a la Homocisteína es el Ácido Úrico. Existe cierta controversia con respecto al papel de esta molécula como marcador de riesgo Cardiovascular (Glantzounis *et al.*, 2005; Schachter, 2005; Dawson *et al.*, 2007). Según nuestros datos, el Ácido Úrico se correlaciona con los principales factores de riesgo cardiovascular como son el IMC, la circunferencia de cintura, la edad, el colesterol, la LDL, los triglicéridos, y como era de esperar con los valores de HDL encontramos una correlación negativa (tabla 14). La correlación mas potente que encontramos del Ácido Úrico es con el Índice de Framingham, con un coeficiente de regresión de 0,363. Estos datos parecen indicar que el Ácido Úrico está ejerciendo un papel de marcador de riesgo cardiovascular. Este resultado estaría en consonancia con un estudio publicado recientemente (Ioachimescu *et al.*, 2008a) donde la

mortalidad de individuos con alto riesgo cardiovascular se relaciona con valores elevados de Ácido Úrico. De nuevo, las asociaciones que encontramos del Ácido Úrico con los diferentes factores de riesgo cardiovascular en nuestro estudio lo son con valores de Ácido Úrico que están dentro del rango de normalidad. Algunos autores, relacionan el Ácido Úrico con el estrés oxidativo (Glantzounis *et al.*, 2005) aunque el mecanismo por el cual el Ácido Úrico podría afectar al sistema cardiovascular no está claro. Como hemos comentado en el apartado Introducción, la concentración de Ácido Úrico podría ser proporcional a la formación de anión superóxido, dado que es uno de los productos junto con el anión superóxido de la reacción catalizada por la enzima xantina oxidasa. De esta forma, el Ácido Úrico estaría ejerciendo un papel de indicador de producción de anión superóxido ya que su concentración sería proporcional a la formación del mismo (Lippi *et al.*, 2008). Por otro lado, se conoce desde hace años la potente capacidad antioxidante del Ácido Úrico, la cual no parece estar ejerciendo un papel protector frente al estrés oxidativo. Esta circunstancia se podría explicar con varios argumentos:

- Al ser un producto que se forma en un entorno pro-oxidante, reacciones cruzadas con el anión superóxido puede mermar esta capacidad antioxidante.
- Quizá la capacidad antioxidante del Ácido Úrico se vuelva pro-oxidante, al igual que ocurre con otros antioxidantes, dependiendo de su concentración o de las características del entorno, como apuntan algunos autores (Lippi *et al.*, 2008)
- Otra posible explicación podría ser que la concentración de Ácido Úrico en plasma sea aún muy inferior a la necesaria para ejercer un papel antioxidante eficaz en un marco biológico como es el sistema cardiovascular.

Visto esto, comprobamos si existen asociaciones con otros marcadores oxidativos que nos ayuden a entender mejor estos procesos y exceptuando la correlación significativa encontrada entre el Ácido Úrico con la PCR, no hemos encontrado asociaciones entre esta molécula y el resto de nuestros marcadores de estrés oxidativo.

Para finalizar el análisis del Ácido Úrico, realizamos una regresión múltiple en la cual introducimos los valores que mejor se correlacionan con el Ácido Úrico en nuestro estudio (Tabla 20 del apartado Resultados) que son la edad, IMC, HDL, LDL, Homocisteína, PCR y la circunferencia de cintura. Resulta interesante que la circunferencia de cintura se convierte en la única variable en comportarse como factor independiente en su relación con Ácido Úrico (tabla 20, Resultados). Recientes estudios describen resultados similares (Ioachimescu *et al.*, 2008b), incluso en poblaciones de niños se han encontrado asociación entre la circunferencia de cintura y el Ácido Úrico, (Lee *et al.*, 2007).

Si excluimos esta variable de la regresión múltiple vemos como el IMC, los lípidos y la Homocisteína se asocian de forma independiente al Ácido Úrico, siendo la Homocisteína la variable que más pesa en esta asociación. Hay artículos que exponen que la Homocisteína provoca disfunción endotelial favoreciendo la producción de anión superóxido al activar la NADPH-oxidasa e induciendo estrés oxidativo en el entorno vascular (Topal *et al.*, 2004). Si estas dos sustancias se asocian, es posible que lo hagan a través de mecanismos ligados al estrés oxidativo, como apuntan algunos autores (Blundell *et al.*, 1996; Mullick *et al.*, 2006) de ahí que sería interesante indagar en esta idea en futuros estudios.

Por consiguiente, concluimos que el Ácido Úrico está ejerciendo en nuestra población un papel de marcador independiente de riesgo cardiovascular, al relacionarse significativamente no sólo con los principales marcadores de riesgo cardiovascular conocidos, sino también con el índice de Framingham.

Con respecto a la dieta, se han encontrado correlaciones negativas entre el consumo de lácteos y de aceite de oliva con el Ácido Úrico, dato al que no hemos encontrado una explicación que lo justifique. También hemos encontrado correlación de esta variable con el consumo de proteínas, ya que el consumo de alimentos ricos en purinas puede aumentar la concentración Ácido Úrico en sangre (Yamamoto, 2008).

**La proteína C reactiva (PCR)** es una proteína segregada por el hígado, se relaciona al complemento y participa en los procesos de coagulación sanguínea. La concentración plasmática de esta molécula se asocia a procesos de Inflamación agudos. También, existen recientes estudios que reconocen a la PCR como marcador de riesgo cardiovascular y arteriosclerosis, así como su estrecha relación con el estrés oxidativo (Woodward *et al.*, 2003; Cesari *et al.*, 2003; Fortmann *et al.*, 2004). Esta asociación podría ser debido, a que en los procesos de inflamación se genera gran cantidad de ERO por acción de los leucocitos. Estas células activadas producen una importante cantidad de ERO, debido al incremento de la transcripción de proteínas pro-inflamatorias, presentes en las células del sistema inmunitario. (Singh *et al.*, 2005; Geronikaki & Gavalas, 2006), El aumento de la presencia de ERO por acción de los procesos inflamatorios se producen como mecanismo de defensa frente a posibles agentes infecciosos. De esta forma favorecen la aparición de estrés oxidativo que podría dañar las células endoteliales viéndose afectado el sistema de Oxido Nítrico, y mermada la respuesta endotelial de los vasos. Estos mecanismos a largo plazo podrían favorecer procesos de disfunción endotelial y ser origen de situaciones fisiopatológicas crónicas como la arteriosclerosis o el envejecimiento vascular (McGeer & McGeer, 2004).

Cuando analizamos los datos de PCR obtenidos en nuestro estudio encontramos una asociación con el **índice de Framingham** (figura 32, Resultados) con un coeficiente de regresión incluso superior al de la Homocisteína. El hecho de que la PCR se correlacione con la edad y con el índice de Framingham, favorece la hipótesis de que el envejecimiento

podría verse favorecido por procesos inflamatorios crónicos a nivel sistémico, e intervenir de forma significativa en el deterioro del sistema cardiovascular ligado al envejecimiento (McGeer & McGeer, 2004; Yamada, 2005; Dinarello, 2006; Jylha *et al.*, 2007).

También contrastamos los resultados de PCR con el resto de las variables del estudio y vemos que la PCR se correlaciona con la circunferencia de cintura (Figura 34), el IMC (Figura 35), la glucemia (figura 36) y los triglicéridos (figura 37).

Con el fin de profundizar un poco más en estos resultados, realizamos una regresión múltiple, siendo la variable dependiente la PCR y como variables independientes introducimos algunos de los valores que se asocian significativamente con ésta como son la edad, el IMC, el Ácido Úrico y el índice aterogénico. Como vemos en la tabla nº 8 de Resultados, el IMC parece ser la variable que está influyendo más sobre la PCR y resulta la única que se asocia significativamente de forma independiente en la regresión múltiple. Hay artículos que describen la vinculación entre valores de PCR y el IMC (Jellema *et al.*, 2004), aunque resulta interesante comprobar que el IMC parece ser el valor que más está influyendo en la PCR por encima de la edad o el índice aterogénico. Existe un estudio realizado en poblaciones Europeas y Asiáticas en el que relaciona la PCR con factores antropométricos, describiendo la gran influencia de éstos sobre el grado de inflamación crónica, relacionando tanto el IMC como la circunferencia de cintura con los valores de PCR (Lear *et al.*, 2003). Por lo tanto, estos datos nos ayudan a confirmar los resultados encontrados en este estudio que apuntan a que el factor que más está influyendo en los valores de PCR en nuestra población sería el IMC. También es importante recordar que una de las características de la población de este estudio es que tienen cierto sobre peso, ya que el IMC medio es superior a 26. Quizá este dato esté influenciando los resultados, y en una población de IMC por debajo de 25 este dato no tenga tanta influencia sobre los valores de PCR.

Por otra parte y para finalizar el análisis de esta variable, observamos la tabla número 24 de Resultados. En esta ocasión, realizamos una regresión múltiple en la que analizamos la relación de la PCR como variable dependiente y como variables independientes introducimos la edad y el consumo de frutas y vegetales. Al ajustar el modelo de regresión por el consumo de frutas y vegetales, la relación que observábamos entre PCR y edad no es significativa, es decir incluyendo el consumo de frutas y vegetales en la regresión, desaparece la asociación entre la PCR y la edad. Esto nos indica que el consumo de frutas, hortalizas, verduras y legumbres que son los alimentos incluidos en esta variable, estarían afectando la asociación que hemos encontrado entre la edad y la PCR.

La **mieloperoxidasa** (MPO) es una variable que se considera al igual que la PCR un importante marcador de inflamación y de estrés oxidativo (Tsimikas, 2006). Además, la MPO se ha utilizado en algunos estudios como marcador de arteriosclerosis y como indicador de riesgo de padecer enfermedad cardíaca (Baldus *et al.*, 2003; Lau & Baldus, 2006) así como indicador de daño oxidativo generalizado en pacientes en estado crítico (Alfonso de Vega *et al.*, 2000; Alfonso de Vega *et al.*, 2002). Utilizando un test estadístico no paramétrico, no se han encontrado asociaciones significativas entre la MPO y la PCR, quizá por no disponer de un número de sujetos suficiente, ya que la probabilidad que se cumpla la hipótesis que encontramos es de 0,077, dato cercano a la significación de 0,05 establecida. A pesar de que no se ha encontrado asociación entre la MPO y la PCR, sí se observa asociación entre la MPO, los triglicéridos (figura 36) y el índice aterogénico (figura 38) y una correlación negativa al relacionar la MPO y el HDL (figura 37). Estos datos son importantes, ya que también se han encontrado correlaciones entre la PCR y los triglicéridos. Es decir, que estos resultados parece que nos dan a entender que el aumento de lípidos en sangre, se asocian al incremento de la

presencia de MPO y de PCR que a su vez son marcadores de procesos inflamatorios.

Estos datos irían en la dirección en que hoy día se explica el proceso de arteriosclerosis, es decir como un proceso inflamatorio crónico degenerativo, ya que se asocian las concentraciones de lípidos en plasma con los valores de PCR y MPO. Esta teoría fue discutida por numerosos autores sobre todo en la década de los 90, y describe un proceso en cual las moléculas de LDL en plasma al oxidarse se adhieren al endotelio, y se acumulan en el espacio subendotelial, favoreciendo los procesos de inflamación y la formación de la placa de ateroma (Navab *et al.*, 1996; Diaz *et al.*, 1997; Henriksen *et al.*, 1981). De forma que el aumento de los lípidos en los vasos favorecerían los procesos de arteriosclerosis, que para algunos autores es sinónimo de inflamación sistémica y estrés oxidativo (Grybauskas, 2003; Virani *et al.*, 2008 ; Polidori *et al.*, 2007).

Todo esto podría explicar la asociación encontrada en nuestros datos entre los lípidos y los valores de PCR y MPO que a su vez se ve reforzada por los valores de MDA, los cuales también se asocia de forma evidente con los triglicéridos (figura 41) y el colesterol (figura 40). Este resultado coincide con el encontrado en otro estudio similar realizado en California, con 298 personas con edades comprendidas entre 18-78 años, en el cual el MDA se asocia con los valores de Colesterol (Block *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de lo expuesto y de las evidentes asociaciones encontradas entre los valores lipídicos y nuestros marcadores de inflamación y el estrés oxidativo, hay que decir que no existe asociación entre las moléculas de LDL y nuestras variables resultado, a pesar de que las moléculas de LDL se forman de colesterol y triglicéridos. No tenemos resultados con los que poder explicar esta circunstancia, aunque quizá pueda ser debido a que las moléculas de LDL al oxidarse y modificar su estructura externa no sean detectados como

moléculas de LDL en los sistemas de determinación, aunque sólo es una hipótesis.

En cualquier caso, uno de los objetivos de este estudio fue observar qué valores, hábitos o circunstancias se asocian mejor al estrés oxidativo en una población sana, y es evidente que en nuestra población los valores lipídicos en plasma se asocian más al estrés oxidativo que otros hábitos o variables determinadas, resaltando la circunstancia de que se trata de una población sana y que sólo una pequeña parte de los individuos presentan valores de colesterol y triglicéridos por encima de los valores establecidos en clínica como saludables.

Si prestamos atención a la figura 18 en la que se representa la asociación del colesterol con la edad, la nube de puntos se ajusta a una función cuadrática es decir, que los valores de colesterol disminuyen en los individuos de mayor edad, al igual que ocurre al relacionar MDA y edad, en la que el MDA se comporta de forma similar (figura 42). Por lo tanto, se puede apreciar que los valores de colesterol y de MDA están estrechamente asociados teniendo un comportamiento muy parecido al relacionarlos con la edad.

Con el fin de analizar estas asociaciones de forma más profunda, realizamos una regresión múltiple tomando el colesterol como variable dependiente, e introducimos todas las variables que se asocian bilateralmente de forma significativa con el colesterol que son la edad, el IMC, la MDA, la MPO, la PCR y el Ácido úrico, que intervienen como variables independientes en la regresión (tabla 21 de Resultados). Vemos que las únicas variables que mantienen su relación significativa con el colesterol son la edad y el MDA. Cuando observamos los coeficientes de regresión Beta, el MDA esta prediciendo los valores de colesterol en un 40,3%, frente un 25,3% de la edad.

Estos resultados podrían interpretarse como que la edad y el MDA en el entorno vascular, se asocian de forma independiente al colesterol.

Que ambos intervienen en la asociación que se observa con el resto de las variables, y que el MDA es el valor más influyente a la hora de predecir los valores de colesterol. Otra conclusión que se puede extraer de estos datos, es que la edad no está actuando como factor de confusión en la relación de MDA y colesterol, ni viceversa, ya que ambos, tanto la edad como el MDA, siguen manteniendo su asociación significativa con el colesterol.

De esta forma, resulta interesante comprobar como los valores de Colesterol, triglicéridos y HDL, según nuestros resultados, se convierten en algunos de los indicadores indirectos más importantes de estrés oxidativo e inflamación. El colesterol total y los triglicéridos son las variables que hemos determinado más influyentes en los marcadores de estrés oxidativo, asociándose a éste más que cualquier otro hábito, variable o circunstancia observada en nuestro estudio.

A continuación, quisimos analizar cuales son las variables que más se asocian a los parámetros lipídicos, dada la importancia que estas variables han adquirido en el análisis de nuestros resultados. Para esto, utilizamos el Índice Aterogénico y los triglicéridos como variables de referencia del perfil Lipídico del individuo. Realizamos una regresión múltiple en la que introducimos la edad, glucemia, creatinina, Ácido úrico e IMC como variables independientes (figura 22, Resultados), ya que son las variables que mejor se asocian al índice aterogénico. Los valores que mantienen la asociación significativa con el índice aterogénico son el Ácido úrico y el IMC, resultando el IMC el más influyente a la hora de predecir los datos del índice aterogénico.

De igual modo, hacemos otra regresión múltiple tomando en esta ocasión como variable dependiente los triglicéridos e incluyendo como independientes la edad, IMC, MDA, MPO, PCR, glucemia, Ácido Úrico y circunferencia de cintura. En esta ocasión vuelve a ser el IMC, el valor más influyente con un coeficiente beta de 0,58, manteniendo asociación significativa con los triglicéridos. La glucemia y el Ácido úrico, también

siguen asociándose a los triglicéridos aunque con un coeficiente beta muy inferior.

Una vez expuestos los resultados de las regresiones múltiples, observamos el protagonismo que ha adoptado el IMC, ya que no sólo presenta un alto grado de asociación con casi todas las variables resultado y con los factores de riesgo cardiovascular, sino que ahora parece ser el factor más influyente en varias variables importantes. Por ello exponemos a continuación algunos de los resultados obtenidos con respecto al IMC y la circunferencia de cintura con el resto de las variables de nuestro estudio:

- El IMC se la variable que bilateralmente mejor se asocia con la mayoría de los marcadores de riesgo cardiovascular (la circunferencia de cintura:  $r = 0,856$ , presión arterial, glucemia, ácido úrico, Índice aterogénico, HDL, triglicéridos, colesterol, índice de Framingham, Homocisteína y PCR; tabla 14 de Resultados).
- En los análisis de regresiones múltiples, el IMC es el factor más influyente en la PCR, índice aterogénico y los triglicéridos con un coeficiente beta muy superior al resto de los parámetros, como hemos comentado anteriormente.
- Por otra parte, en la regresión múltiple representada en la tabla nº 20 de Resultados, en la que interviene como variable dependiente el Ácido úrico y siete de las variables con las que se correlaciona bilateralmente, la circunferencia de cintura es el factor que más influye en las variaciones de los valores de Ácido Úrico por encima del resto de las variables.

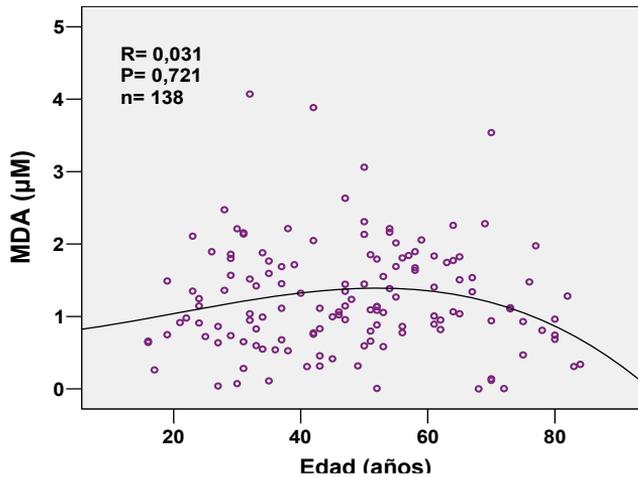
Por todo esto y según los resultados obtenidos, se puede decir que el IMC junto con la circunferencia de cintura son las variables que más afectan tanto a los factores de riesgo cardiovascular como a los de estrés

oxidativo. El hecho de que el IMC se asocie a un desajuste metabólico de lípidos y glucosa es algo conocido en clínica y muy documentado por multitud de estudios (Wu *et al.*, 2008; Bossola *et al.*, 2008), aunque en este estudio ha obtenido un protagonismo inesperado, quizá debido al hecho comentado anteriormente de la tendencia al sobrepeso de nuestra población de estudio.

Según nuestros resultados, mantener el IMC y la circunferencia de cintura en valores que estén dentro de los considerados como saludables, es la estrategia más eficaz para evitar la hiperlipemia y el estrés oxidativo, así como todas las repercusiones sobre los factores de riesgo cardiovascular que se han analizado en este estudio.

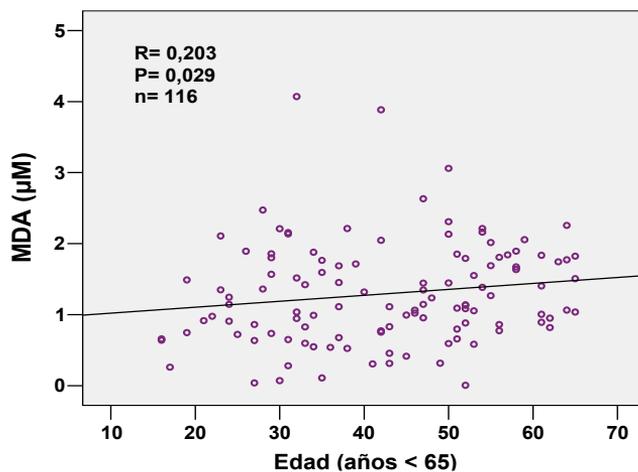
## **Estres oxidativo y envejecimiento.**

Según la teoría de Harman, el proceso de envejecimiento podría ser consecuencia de la oxidación de las células y los tejidos por acción de las ERO. Existen algunos estudios en los que se han encontrado, en poblaciones con un amplio rango de edad, correlaciones entre los marcadores de estrés oxidativo y la edad (Gil *et al.*, 2006). Sin embargo, en un estudio realizado en California con un total de 298 personas, con edades comprendidas entre los 18-78 años, no se encuentran correlaciones significativas entre el MDA y la edad, así como tampoco con otros marcadores de estrés oxidativo (Block *et al.*, 2002). En nuestro estudio al analizar la relación entre los marcadores más reconocidos de estrés oxidativo como son la MPO y el MDA (fig 44) y la edad, no encontramos, en ninguno de los casos, asociaciones significativas.



**Figura 44.** Nube de puntos ajustada a una función cuadrática. La correlación no es significativa utilizando un test no paramétrico. ( R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

Si observamos la nube de puntos del MDA y la edad, se aprecia que a partir de aproximadamente los 65 años existe una tendencia descendente de las concentraciones de MDA en los pacientes más mayores. Con el fin de estudiar más a fondo esta curiosa tendencia, volvimos a realizar la correlación pero en esta ocasión, sólo con los pacientes menores de 65 años, representada en la figura nº 45.



**Figura 45.** Nube de puntos ajustada a una recta. La correlación es significativa utilizando un test no paramétrico. ( R: Coeficiente de correlación de Speaman, P: Probabilidad de que la hipótesis se cumpla, n: Número de casos).

Tal y como parecía indicar la nube de puntos, se observa que efectivamente existe una correlación significativa entre el MDA y la edad en los sujetos menores de 65 años. El hecho es que según nuestros datos, a partir de los 65 años el MDA sufre un descenso y cesa su correlación con la edad que se mantiene desde los 16 a los 65 años. Esto que en un principio podría resultar paradójico, quizá no lo sea tanto, ya que estamos estudiando una población en la que existe una gran variabilidad tanto genotípica como fenotípica y podríamos considerar que los individuos mayores de 65 años han sobrevivido influenciados por causas probablemente tanto genéticas, como por los hábitos y quizá también por los bajos niveles de estrés oxidativo. Y cabe considerar que quizá estos niveles bajos de oxidación sean una de las causas o consecuencias de la longevidad de estos individuos. Con estos resultados, y con el fin de profundizar más en esta cuestión, se realizó un estudio de los hábitos de nuestra población. En primer lugar nos detenemos en la dieta, ya que el alto consumo de antioxidantes en la dieta sería uno de los hábitos que más podrían ayudarnos a mantener un equilibrio en el estado redox. Así que estudiamos el consumo de frutas y vegetales en nuestra población, ya que son los grupos de alimentos más ricos en sustancias antioxidantes (Guggenbuhl, 2006). Cuando realizamos una correlación de la ingesta de frutas con la edad, vemos que existe una correlación positiva entre ellas (figura 46, Resultados), y también entre el consumo de verduras y la edad (figura 47, Resultados). Si sumamos estas dos variables y volvemos a realizar la correlación, vemos que el coeficiente de regresión aumenta quedando más reforzada. Quizá a partir de los 65 o 70 años los individuos modifican parte de sus hábitos llevando mas cuidado con las comidas y los excesos, de tal manera que ralentizarían los procesos oxidativos propios del envejecimiento. Los individuos de mayor edad, en nuestra población, comen más verduras y frutas que los jóvenes. De hecho, si observamos la nube de puntos del consumo de frutas (figura 46, Resultados), se observa que a partir de aproximadamente los 65 años, no hay individuos que no

consuman frutas, como aparecen en otras edades. Estos datos podrían explicar la controversia existente en estudios similares como hemos comentado anteriormente, (Block *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2006) ya que no se han tenido en cuenta los hábitos del individuo y en especial los dietéticos para valorar la relación entre los parámetros de estrés oxidativo y la edad.

Analizando otros hábitos de nuestra población de mayores de 65 años, encontramos los siguientes resultados:

- Ninguno de los individuos mayores de 65 años de nuestro estudio fuma.
- El 82% no ha fumado nunca.
- El 55,5% declara haber ejercido físico al menos 3 veces por semana.
- El 22% bebe alcohol. Pero de este porcentaje, ninguno declara beber de forma habitual alcohol de alta graduación. Sólo beben cerveza o vino.

Aunque de estos resultados no hay análisis estadístico ya que se trata de variables categóricas, en las que difícilmente se pueden sacar resultados significativos satisfactorios, son cuestiones en las que sería interesante indagar en futuros estudios.

Una vez vistos estos resultados, intentamos buscar en qué rango de edad encontramos mayor correlación entre la edad y el MDA en nuestra población menor de 65 años, con el fin de estudiar cuando empiezan la edad a influir más fuertemente en el estado redox del individuo y que según nuestra hipótesis sería cuando empiezan los procesos de envejecimiento a hacerse más patentes.

Esta correlación la encontramos en los individuos de 40 a 65 años como aparece en la figura 44 (Resultados). Aquí se puede observar que a pesar de que los individuos menores de 40 años comen menos frutas y verduras que los mayores de 40 años, existe una correlación significativa

entre los individuos de 40 a 65 años entre el MDA y la edad, y mas potente que la encontrada en el caso anterior entre individuos de 18 a 65 años. Cuando analizamos sólo la población de individuos menores de 40 años, vemos que no aparece correlación entre MDA y edad.

De esta forma, vemos que dependiendo de los grupos de edades de los sujetos de este estudio, la correlación entre MDA y edad sufre variaciones significativas, obteniendo un mayor coeficiente de correlación en el rango de edad comprendido entre los 40 a 65 años. Para indagar mas profundamente en esta relación realizamos una regresión múltiple en la población de individuos entre los 40 a 65 años, tomando como variable dependiente el MDA y como variables independientes la edad y el consumo de frutas y vegetales. La edad se correlaciona con el MDA positivamente en esta regresión, y el consumo de frutas y vegetales también, pero negativamente con la concentración de MDA, recordando que se trata de una regresión múltiple por lo que las tres variables están influyendo en estas asociaciones (tabla 24, Resultados). Es decir, que cuanto mayor es la edad encontraremos más MDA y cuanto mayor es la ingesta de frutas y verduras encontraremos menos MDA.

Esto podría interpretarse como que a partir de los 40 años aproximadamente, los procesos de estrés oxidativo comienzan a tener relevancia, adquiriendo los hábitos del individuo una mayor importancia con respecto a su estado de oxidación. De esta forma, el aporte de antioxidantes en la dieta en individuos de mediana edad, según nuestros datos, están influyendo en el estado redox de los individuos de nuestro estudio y en la evolución de los procesos. Existe un estudio realizado en la Republica Eslovaca publicado recientemente en el que se comparan los marcadores de estrés oxidativo entre grupos de individuos que toman dieta vegetariana frente otro grupo de individuos que no la toman. El estudio se realizó en jóvenes de 20 a 30 años y en adultos de 60 a 70 años. Se observó que en el caso de los jóvenes la dieta no afecta a los marcadores de estrés oxidativo, mientras que sí se encuentran diferencias

significativas en los marcadores de estrés oxidativo entre los grupos de adultos vegetarianos frente al grupo de adultos no vegetarianos (Krajcovicova-Kudlackova *et al.*, 2007), datos que irían en el mismo sentido que los nuestros.

Los resultados y conclusiones presentadas en esta tesis doctoral son sólo parte, la más general, de lo que se puede extraer del estudio *ENOX*. Somos conscientes que existen aspectos muy interesantes en el citado estudio que valoraremos a posteriori, tales como posibles diferencias en marcadores de riesgo cardiovascular y de estrés oxidativo entre mujeres pre y post menopáusicas, y otros en donde el descenso del número de pacientes por subgrupo no implique un sesgo estadístico insalvable.

## **Limitaciones del estudio.**

- Sin duda, nos hubiera aportado una información muy interesante realizar una valoración de la función endotelial, pero debido a limitaciones tanto técnicas como económicas nos ha sido imposible. Además, determinaciones de otros marcadores de estrés oxidativo, y en especial oxidación de ADN y proteínas nos hubieran proporcionado una información muy valiosa.
- Los resultados expuestos referentes a la dieta o hábitos son resultados que han sido cumplimentados con las respuestas que el paciente ha dado o que este mismo ha completado. Así que, aunque los resultados resultan bastante coherentes, existe un posible sesgo debido a la diferente interpretación y comprensión de un paciente a otro.
- Debido al amplio rango de edad de los sujetos del estudio, no podemos valorar la acción real que desempeña la dieta en el envejecimiento. Las conclusiones extraídas son a partir de regresiones múltiples ya que no disponemos de un grupo de individuos suficiente de edad avanzada que consuman frutas y vegetales en bajas proporciones con el que poder comparar con nuestro grupo de mayores.

## **Perspectivas del estudio.**

- Según nuestros resultados los valores de Homocisteína de asocian a los de presión arterial, a pesar de tratarse de una población sana, es decir, en una población con valores de presión arterial y de concentración plasmática de Homocisteína dentro de rangos normales. Este resultado sumado a los de recientes estudios en los que asocian a la Homocisteína con disfunción endotelial y estrés oxidativo (Topal *et al.*, 2004) nos sugiere que sería interesante abordar esta relación en un estudio específicamente dirigido a ello.

- También se han encontrado curiosas correlaciones de la Homocisteína con el consumo de aceite de oliva, en las que al parecer el consumo de aceite de oliva podría ayudar a disminuir la concentración de Homocisteína. Aunque las asociaciones encontradas son leves, quizá en otros estudios se podrían profundizar más sobre este resultado.
- Debido a la alta asociación encontrada en nuestros resultados entre el perfil lipídico del individuo y el estrés oxidativo, sería interesante considerar la posibilidad en futuros estudios de, en individuos en los cuales la dieta no sea suficiente para reducir los valores de de lípidos plasmáticos, administrar tratamientos antioxidantes que puede ayudar a proteger el sistema cardiovascular, o valorar si los tratamientos hipolipemiantes provocan descensos del estrés oxidativo a través de una disminución de la concentración de lípidos, o por acción directa de su estructura molecular (Hausenloy & Yellon, 2008).
- En relación con la teoría del envejecimiento de Harman, sería interesante realizar un estudio para valorar el papel real de la dieta en el envejecimiento y el estrés oxidativo, ya que este puede ser un factor de confusión a la hora de intentar establecer relaciones entre estas variables.
- Exponemos a continuación otros puntos que consideramos interesantes de afrontar en futuros estudios clínicos sobre este tema:
  1. Seleccionar un marcador o marcadores de estrés oxidativo para humanos que se conviertan en referentes a nivel internacional y establecer la técnica con la que deben medirse.
  2. Establecer los rangos de oxidación, o los valores en los que el individuo sufre un estrés oxidativo.

3. Tener claras evidencias de cuales son los hábitos que nos permitan paliar la oxidación.
4. Valorar cuál, cuándo y en qué condiciones es recomendable un tratamiento antioxidante aparte de la dieta, así como la duración del mismo.

Y para ello quizá un rango de edad adecuado para realizar un estudio transversal en el que se pueda valorar estos puntos sea de 50 a 65 años en los que parece que la homeostasis redox es más sensible a decantarse hacia procesos oxidativos.



## CONCLUSIONES

---

---



## CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en los individuos de nuestro estudio podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La Homocisteína, la PCR y el Ácido Úrico actúan como marcadores de riesgo cardiovascular.
2. El IMC podría estar influyendo sobre el sistema cardiovascular estimulando los procesos de inflamación crónica y estrés oxidativo.
3. La concentración elevada de colesterol y triglicéridos en plasma, puede favorecer los procesos de inflamación crónica y estrés oxidativo, en el sistema cardiovascular.
4. Los índices antropométricos de masa corporal y de circunferencia de cintura son los factores más influyentes sobre el perfil Lipídico.
5. El consumo de frutas y vegetales a partir de 40 años parece prevenir el aumento del estrés oxidativo que se produce con la edad.



## BIBLIOGRAFIA

---

---



---

## BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E & Carbonell LF (2000) Plasma redox status relates to severity in critically ill patients. *Crit Care Med* **28**, 1812-1814.
- Alfonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E & Carbonell LF (2002) Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* **30**, 1782-1786.
- Ames BN (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* **7**, 121-128.
- Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, Simoons ML & Hamm CW (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **108**, 1440-1445.
- Beal MF (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* **38**, 357-366.
- Benzi G & Moretti A (1995a) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* **19**, 77-101.
- Benzi G & Moretti A (1995b) Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* **16**, 661-674.
- Benzi G, Pastoris O, Marzatico F & Dagani F (1990) Influence of aging and drug treatment on the bioenergetics of hypoxic brain. *Neurochem Res* **15**, 659-665.
- Bhopal R, Fischbacher C, Vartiainen E, Unwin N, White M & Alberti G (2005) Predicted and observed cardiovascular disease in South Asians: application of FINRISK, Framingham and SCORE models to Newcastle Heart Project data. *J Public Health (Oxf)* **27**, 93-100.
- Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Levels JH, Zwaginga JJ, van den BB, Reitsma PH, Meijers JC, Hartman D, Levi M & Stoes ES (2005) Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. *Circ Res* **96**, 714-716.

- Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Peters SL, Levels JH, Birjmohun R, Rotmans JI, Hartman D, Meijers JC, Levi M & Stroes ES (2007) Effects of CRP infusion on endothelial function and coagulation in normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects. *J Lipid Res* **48**, 952-960.
- Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B & Packer L (2002) Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* **156**, 274-285.
- Blundell G, Jones BG, Rose FA & Tudball N (1996) Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis* **122**, 163-172.
- Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R & Rezzani R (2008) Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* **23**, 381-390.
- Bossola M, Giungi S, Panocchia N, Vulpio C, Luciani G & Tazza L (2008) Body mass index and cardiovascular risk factors and biomarkers in hemodialysis patients. *J Nephrol* **21**, 197-204.
- Carbonell LF, Diaz J, Hernandez I, Cuevas S, Valero F, Quesada T, Fenoy F & Salom MG (2007) N-acetylcysteine exerts protective effects and prevents lung redox imbalance and peroxynitrite generation in endotoxemic rats. *Med Chem* **3**, 29-34.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, *et al.* (2003) Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* **108**, 2317-2322.
- Chance B, Sies H & Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- Chehab O, Ouertani M, Souiden Y, Chaieb K & Mahdouani K (2008) Plasma Antioxidants and Human Aging: A Study on Healthy Elderly Tunisian Population. *Mol Biotechnol*.
- Cooper JM, Mann VM & Schapira AH (1992) Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J Neurol Sci* **113**, 91-98.
- Dalton TP, Shertzer HG & Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 67-101.

- Dawber TR, Meadors GF & Moore FE, Jr. (1951) Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health* **41**, 279-281.
- Dawson J, Quinn T & Walters M (2007) Uric acid reduction: a new paradigm in the management of cardiovascular risk? *Curr Med Chem* **14**, 1879-1886.
- De Haan JB, Newman JD & Kola I (1992) Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Brain Res Mol Brain Res* **13**, 179-187.
- De BA, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA & Blom HJ (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* **54**, 599-618.
- Diaz J, Serrano E, Acosta F & Carbonell LF (1998) Lipoperoxides kit evaluated for measuring lipoperoxides in biological samples: reference intervals for human plasma. *Clin Biochem* **31**, 277-279.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA & Keaney JF, Jr. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **337**, 408-416.
- Dinarello CA (2006) Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* **83**, 447S-455S.
- Dohi Y, Takase H, Sato K & Ueda R (2007) Association among C-reactive protein, oxidative stress, and traditional risk factors in healthy Japanese subjects. *Int J Cardiol* **115**, 63-66.
- Duthie GG (1993) Lipid peroxidation. *Eur J Clin Nutr* **47**, 759-764.
- Esposito K, Ciotola M & Giugliano D (2007) Mediterranean diet and the metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res*.
- Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA & Kuller LH (1997) Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1947-1953.

- Everson-Rose SA & Lewis TT (2005) Psychosocial factors and cardiovascular diseases. *Annu Rev Public Health* **26**, 469-500.
- Farmer KJ & Sohal RS (1989) Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Free Radic Biol Med* **7**, 23-29.
- Finkel T (2003) Ageing: a toast to long life. *Nature* **425**, 132-133.
- Forstermann U (2008) Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*.
- Fortmann SP, Ford E, Criqui MH, Folsom AR, Harris TB, Hong Y, Pearson TA, Siscovick D, Vinicor F & Wilson PF (2004) CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the population science discussion group. *Circulation* **110**, e554-e559.
- Franzoni F, Ghiadoni L, Galetta F, *et al.* (2005) Physical activity, plasma antioxidant capacity, and endothelium-dependent vasodilation in young and older men. *Am J Hypertens* **18**, 510-516.
- Garcia PM, Gimenez J, Bonacasa B, Carbonell LF, Miguel SG, Quesada T & Hernandez I (2005) 17beta-estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Menopause* **12**, 453-459.
- Geronikaki AA & Gavalas AM (2006) Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb Chem High Throughput Screen* **9**, 425-442.
- Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P & Grune T (2006) Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res* **40**, 495-505.
- Gimenez J, Garcia PM, Bonacasa B, Carbonell LF, Quesada T & Hernandez I (2006) Effects of oestrogen treatment and angiotensin-converting enzyme inhibition on the microvasculature of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol* **91**, 261-268.

- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM & Galaris DA (2005) Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* **11**, 4145-4151.
- Grundy SM (2005) Metabolic syndrome: therapeutic considerations. *Handb Exp Pharmacol*, 107-133.
- Grybauskas P (2003) [Role of tissue factor in atherothrombosis]. *Medicina (Kaunas)* **39**, 1165-1170.
- Guggenbuhl N (2006) [The source of antioxidants]. *Bull Soc Belge Ophthalmol*, 41-45.
- Gurven M, Kaplan H, Winking J, Finch C & Crimmins EM (2008) Aging and inflammation in two epidemiological worlds. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 196-199.
- Hankey GJ & Eikelboom JW (1999) Homocysteine and vascular disease. *Lancet* **354**, 407-413.
- Harman D (1956b) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Hausenloy DJ & Yellon DM (2008) Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart* **94**, 706-714
- Hayflick L (1985) Theories of biological aging. *Exp Gerontol* **20**, 145-159.
- Henriksen T, Mahoney EM & Steinberg D (1981) Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6499-6503.
- Howes RM (2006) The free radical fantasy: a panoply of paradoxes. *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 22-26.
- Iciek M, Chwatko G, Lorenc-Koci E, Bald E & Wlodek L (2004) Plasma levels of total, free and protein bound thiols as well as sulfane sulfur in different age groups of rats. *Acta Biochim Pol* **51**, 815-824.
- Ioachimescu AG, Brennan DM, Hoar BM, Hazen SL & Hoogwerf BJ (2008a) Serum uric acid is an independent predictor of all-cause mortality in patients at high risk of cardiovascular disease: A preventive

- cardiology information system (PreCIS) database cohort study. *Arthritis Rheum* **58**, 623-630.
- Ioachimescu AG, Brennan DM, Hoar BM, Hazen SL & Hoogwerf BJ (2008b) Serum uric acid is an independent predictor of all-cause mortality in patients at high risk of cardiovascular disease: a preventive cardiology information system (PreCIS) database cohort study. *Arthritis Rheum* **58**, 623-630.
- Jellema A, Plat J & Mensink RP (2004) Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* **34**, 766-773.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N & Vina J (2004) Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J* **18**, 1499-1506.
- Jialal I & Devaraj S (2000) Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* **342**, 1917-1918.
- Jylha M, Paavilainen P, Lehtimäki T, Goebeler S, Karhunen PJ, Hervonen A & Hurme M (2007) Interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, and C-reactive protein as predictors of mortality in nonagenarians: the vitality 90+ study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**, 1016-1021.
- Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J & Strokosch G (1988) Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* **43**, 414-421.
- Kannel WB, Castelli WP & Gordon T (1979) Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med* **90**, 85-91.
- Kannel WB & McGee DL (1979) Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* **241**, 2035-2038.
- Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenkamp JF, Inoue M, Guth PH & Kaplowitz N (1992) Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals. *Am J Physiol* **262**, G669-G676.

- Krajcovicova-Kudlackova M, Valachovicova M, Paukova V & Dusinska M (2007) Effects of diet and age on oxidative damage products in healthy subjects. *Physiol Res*.
- Kunitomo M (2007) [Oxidative stress and atherosclerosis]. *Yakugaku Zasshi* **127**, 1997-2014.
- Lannerstad O (1980) Morbidity related to smoking and other risk factors. A population study of disability pension, hospital care and sickness benefit days among middle-aged men in Malmo, Sweden. *Scand J Soc Med* **8**, 25-31.
- Lau D & Baldus S (2006) Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* **111**, 16-26.
- Lear SA, Chen MM, Birmingham CL & Frohlich JJ (2003) The relationship between simple anthropometric indices and C-reactive protein: ethnic and gender differences. *Metabolism* **52**, 1542-1546.
- Lee MS, Wahlqvist ML, Yu HL & Pan WH (2007) Hyperuricemia and metabolic syndrome in Taiwanese children. *Asia Pac J Clin Nutr* **16 Suppl 2**, 594-600.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T & Tanaka M (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* **1**, 642-645.
- Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Favaloro EJ & Targher G (2008) The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*.
- Loh KP, Huang SH, De SR, Tan BK & Zhu YZ (2006) Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res* **3**, 327-337.
- Madamanchi NR & Runge MS (2007) Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* **100**, 460-473.
- Marcus J, Sarnak MJ & Menon V (2007) Homocysteine lowering and cardiovascular disease risk: lost in translation. *Can J Cardiol* **23**, 707-710.
- Marquez LA, Dunford HB & Van WH (1990) Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of

- ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* **265**, 5666-5670.
- McGeer PL & McGeer EG (2004) Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* **1035**, 104-116.
- Mecocci P, Fano G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vecchiet J, Senin U & Beal MF (1999) Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* **26**, 303-308.
- Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* **65**, 375-398.
- Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC, Malfroy B, Doctrow SR & Lithgow GJ (2000) Extension of lifespan with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289**, 1567-1569.
- Messerli FH, Williams B & Ritz E (2007) Essential hypertension. *Lancet* **370**, 591-603.
- Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, *et al.* (2007) Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* **50**, 159-165.
- Mighty HE & Fahey AJ (2007) Obesity and pregnancy complications. *Curr Diab Rep* **7**, 289-294.
- Mo JQ, Hom DG & Andersen JK (1995) Decreases in protective enzymes correlates with increased oxidative damage in the aging mouse brain. *Mech Ageing Dev* **81**, 73-82.
- Mullick AE, Zaid UB, Athanassious CN, Lentz SR, Rutledge JC & Symons JD (2006) Hyperhomocysteinemia increases arterial permeability and stiffness in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R1349-R1354.
- Nakano M, Oenzil F, Mizuno T & Gotoh S (1995) Age-related changes in the lipofuscin accumulation of brain and heart. *Gerontology* **41 Suppl 2**, 69-79.

- Navab M, Berliner JA, Watson AD, *et al.* (1996) The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 831-842.
- Neaton JD & Wentworth D (1992) Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med* **152**, 56-64.
- Nehler MR, Taylor LM, Jr. & Porter JM (1997) Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovasc Surg* **5**, 559-567.
- Neuhauser HK, Ellert U & Kurth BM (2005) A comparison of Framingham and SCORE-based cardiovascular risk estimates in participants of the German National Health Interview and Examination Survey 1998. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **12**, 442-450.
- Oenzil F, Kishikawa M, Mizuno T & Nakano M (1994) Age-related accumulation of lipofuscin in three different regions of rat brain. *Mech Ageing Dev* **76**, 157-163.
- Oforokun I & Pomeroy C (2003) Sex differences in adverse reactions to antiretroviral drugs. *Top HIV Med* **11**, 55-59.
- Ortega RM (2006) Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutr* **9**, 1136-1140.
- Patterson C, Madamanchi NR & Runge MS (2000) The oxidative paradox: another piece in the puzzle. *Circ Res* **87**, 1074-1076.
- Perna AF, Ingrosso D & De Santo NG (2003) Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* **25**, 409-417.
- Polidori MC, Pratico D, Parente B, Mariani E, Cecchetti R, Yao Y, Sies H, Cao P, Mecocci P & Stahl W (2007) Elevated lipid peroxidation biomarkers and low antioxidant status in atherosclerotic patients with increased carotid or iliofemoral intima media thickness. *J Investig Med* **55**, 163-167.
- Quatromoni PA, Copenhafer DL, Demissie S, D'Agostino RB, O'Horo CE, Nam BH & Millen BE (2002) The internal validity of a dietary pattern

- analysis. The Framingham Nutrition Studies. *J Epidemiol Community Health* **56**, 381-388.
- Reynolds A, Laurie C, Lee MR & Gendelman HE (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* **82**, 297-325.
- Richter C, Park JW & Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6465-6467.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V & Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* **36**, 1-9.
- Ruel G & Couillard C (2007) Evidences of the cardioprotective potential of fruits: the case of cranberries. *Mol Nutr Food Res* **51**, 692-701.
- Savenkova ML, Mueller DM & Heinecke JW (1994) Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem* **269**, 20394-20400.
- Schachter M (2005) Uric acid and hypertension. *Curr Pharm Des* **11**, 4139-4143.
- Shi L, Sawada M, Sester U & Carlson JC (1994) Alterations in free radical activity in aging *Drosophila*. *Exp Gerontol* **29**, 575-584.
- Shigenaga MK, Hagen TM & Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10771-10778.
- Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP & Mossman BT (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* **266**, 24398-24403.
- Simonini G, Pignone A, Generini S, Falcini F & Cerinic MM (2000) Emerging potentials for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology* **155**, 1-15.
- Singh U, Devaraj S & Jialal I (2005) Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* **25**, 151-174.

- Slentz CA, Houmard JA & Kraus WE (2007) Modest exercise prevents the progressive disease associated with physical inactivity. *Exerc Sport Sci Rev* **35**, 18-23.
- Smith TW & MacKenzie J (2006) Personality and risk of physical illness. *Annu Rev Clin Psychol* **2**, 435-467.
- Sohal RS (1991) Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. *Mech Ageing Dev* **60**, 189-198.
- Sohal RS (1993) The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Ageing (Milano)* **5**, 3-17.
- Sohal RS, Agarwal S & Sohal BH (1995) Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mech Ageing Dev* **81**, 15-25.
- Sohal RS & Allen RG (1990) Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol* **25**, 499-522.
- Sohal RS, Arnold LA & Sohal BH (1990) Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radic Biol Med* **9**, 495-500.
- Sohal RS, Donato H & Biehl ER (1981) Effect of age and metabolic rate on lipid peroxidation in the housefly, *Musca domestica* L. *Mech Ageing Dev* **16**, 159-167.
- Stamler J, Wentworth D & Neaton JD (1986) Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* **256**, 2823-2828.
- Topal G, Brunet A, Millanvoye E, Boucher JL, Rendu F, Devynck MA & vid-Duflho M (2004) Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. *Free Radic Biol Med* **36**, 1532-1541.
- Tsimikas S (2006) Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* **98**, 9P-17P.

- Van den AA, Pourtois M & Courtois P (1992) Fluoride inhibition of SCN- and Cl-peroxidase activities in whole saliva and of recombinant myeloperoxidase. Influence of pH and hydrogen peroxide concentration. *J Biol Buccale* **20**, 219-224.
- Villa RF, Ingrao F, Magri G, Gorini A, Reale S, Costa A, Ragusa N, Avola R & Giuffrida-Stella AM (1993) Effect of CDP-choline treatment on mitochondrial and synaptosomal protein composition in different brain regions during aging. *Int J Dev Neurosci* **11**, 83-93.
- Vina J, Borras C, Gambini J, Sastre J & Pallardo FV (2005) Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *Sci Aging Knowledge Environ* **2005**, e17.
- Virani SS, Polsani VR & Nambi V (2008) Novel markers of inflammation in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* **10**, 164-170.
- Warner HR (1994) Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic Biol Med* **17**, 249-258.
- Welch GN & Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* **338**, 1042-1050.
- Wierzbicki AS (2007) Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res* **4**, 143-150.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H & Kannel WB (1998) Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837-1847.
- Wilson PW, Nam BH, Pencina M, D'Agostino RB, Sr., Benjamin EJ & O'Donnell CJ (2005) C-reactive protein and risk of cardiovascular disease in men and women from the Framingham Heart Study. *Arch Intern Med* **165**, 2473-2478.
- Windler E, Schoffauer M & Zyriax BC (2007) The significance of low HDL-cholesterol levels in an ageing society at increased risk for cardiovascular disease. *Diab Vasc Dis Res* **4**, 136-142.
- Wolff H, Panhans A, Zebhauser M & Meurer M (1992) Comparison of three methods to detect white blood cells in semen: leukocyte esterase dipstick test, granulocyte elastase enzymeimmunoassay, and peroxidase cytochemistry. *Fertil Steril* **58**, 1260-1262.

- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Jr. & Sunderman FW, Jr. (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* **33**, 214-220.
- Woodward M, Rumley A, Lowe GD & Tunstall-Pedoe H (2003) C-reactive protein: associations with haematological variables, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol* **122**, 135-141.
- Wu J, Mo J, Huang CW, Peng LW, Xu L, Yang XC & Yu X (2008) [Obesity and its influencing factors in primary school students from Kaifu District of Changsha City.]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* **10**, 231-235.
- Yamada T (2005) [Inflammatory markers; C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA)]. *Rinsho Byori* **53**, 558-561.
- Yamamoto T (2008) [Definition and classification of hyperuricemia]. *Nippon Rinsho* **66**, 636-640.
- Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**, 139-162.
- Zalba G, Fortuno A, San JG, Moreno MU, Beloqui O & Diez J (2007) Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis* **24 Suppl 1**, 24-29.