

# La eliminación urinaria de productos de lipoperoxidación depende de un ritmo biológico anual

José R. Ramón<sup>a</sup>, Antonio Hernández Torres<sup>a</sup>, Estrella Cuenca Giralde<sup>b</sup>, Ángela Casado<sup>c</sup>, Encarnación López Fernández<sup>c</sup> y María del Mar Polo de Santos<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

<sup>b</sup>Mutua Laboral ASEPEYO. Madrid. España.

<sup>c</sup>Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid. España.

## RESUMEN

**Introducción:** existen numerosos rasgos biológicos ligados a ritmos diarios, anuales o estacionales. Uno de estos rasgos podría ser la producción y eliminación urinaria de productos de lipoperoxidación (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico [TBARS]) eliminados por orina que son modificados por la crenoterapia con diferentes aguas mineromedicinales.

El objetivo del presente artículo es analizar si la eliminación urinaria de TBARS depende de la época del año en que se determina.

**Material y métodos:** se han obtenido muestras de orina de 230 voluntarios del Programa de Termalismo Social del IMSERSO (edad 52-81 años), 115 varones y 115 mujeres que se adscribieron a 2 balnearios diferentes en 6 épocas distintas del año: 110 al primero y 120 al segundo. A la llegada al balneario se determinó la concentración de TBARS mediante espectrofotometría; paralelamente se realizó a los pacientes historia clínica que incluyó registros de la presión arterial.

**Resultados:** la media de eliminación total de TBARS a la llegada al balneario en la población del primero fue de  $0,418 \pm 0,025$  nmol/mg de creatinina; en la segunda fue de  $0,368 \pm 0,01$  nmol/mg de creatinina. Una de las posibles razones de los diferentes valores de ambas poblaciones, con un máximo de excreción urinaria en julio y un mínimo en noviembre, fue el hecho de que las determinaciones se realizaron en diferentes meses del año en ambas poblaciones.

**Conclusión:** este estudio muestra que las tasas de eliminación de productos de lipoperoxidación siguen un ritmo anual.

## Palabras clave

Peroxidación lipídica. TBARS urinarias. Cambios estacionales.

## Annual rhythm of urinary excretion of lipoperoxidation products

## ABSTRACT

**Introduction:** many biological features are linked to daily, annual, or seasonal rhythms. One of these features could be the production and urinary excretion of lipoperoxidation products (TBARS), which are modified by crenotherapy with different mineromedicinal waters.

The objective of the present article was to analyse whether urinary excretion of TBARS depends on the time of the year in which it is determined.

**Material and methods:** urinary samples were obtained from 230 volunteers from the Social Thermalism Program of the Institute for the Elderly and Social Services (Instituto de Mayores y Servicios Sociales [IMSERSO]). There were 115 men and 115 women (aged 52-81 years) who were assigned to two different spas at six different times of the year: 110 were assigned to the first spa and 120 to the second. TBARS concentration was determined on arrival at the spa by means of spectrophotometry; a clinical history was also taken, including blood pressure measurement.

**Results:** the mean total TBARS excretion on arrival was  $0.418 \pm 0.025$  nmol/mg of creatinine for the population from the first spa and  $0.368 \pm 0.01$  nmol/mg of creatinine for the second. One of the reasons why these values differed between the two populations was that they were determined in different months of the year, showing a maximum excretion in July and a minimum in November.

**Conclusion:** this study shows that excretion rates of lipid peroxidation products follows an annual rhythm.

## Key words

Lipid peroxidation. Urinary TBARS. Seasonal changes.

## INTRODUCCIÓN

En todos los seres vivos las funciones corporales no son estáticas, sino que varían con el tiempo de una manera cíclica, bien sea mediante patrones de 24 h (ritmos circadianos), mensuales, estacionales o anuales. Quizá

Correspondencia: Dr. J.R. Ramón.  
Instituto de Salud Carlos III.  
Sinesio Delgado, 6. 28029 Madrid. España.  
Correo electrónico: jramon@isciii.es

Recibido el 3-3-2006; aceptado el 23-5-2006.

los mejores ejemplos de biorritmos los muestran las plantas con su dependencia de las estaciones anuales y de otros factores como la intensidad de luz, la presión atmosférica, la humedad, etc. Este mismo carácter rítmico se presenta en el reino animal y, por supuesto, en el hombre. Variaciones como el patrón día/noche (vigilia-sueño), ritmo mensual (menstruación) son bien conocidas. Estos cambios dependen en gran medida del eje unitario-neuroendocrino<sup>1,2</sup>. Uno de los relojes que controlan los cambios rítmicos está situado en el núcleo supraquiasmático, al menos en la rata<sup>3</sup>. Esta dependencia de los ritmos tiene suma importancia tanto en fisiología como en patología e incluso en terapéutica: p. ej., tanto las muertes por infarto de miocardio<sup>4</sup>, el tamaño del infarto<sup>5</sup> o la incidencia de taquicardia/fibrilación ventricular<sup>6</sup> siguen un ritmo estacional, con un pico máximo en invierno; en terapéutica, muchos tratamientos, como, por ejemplo, los quimioterapéuticos, se ajustan según un ritmo circadiano<sup>7</sup>.

Desde los pioneros trabajos de Gerschman et al<sup>8</sup>, las teorías sobre el envejecimiento se basan en la acción tóxica del oxígeno, particularmente la de los radicales libres de oxígeno (RLO) en las mitocondrias<sup>9-13</sup>, aunque también hay evidencia en modelos de envejecimiento de daño de ADN<sup>14,15</sup>.

Los RLO atacan todos los principios elementales produciendo diferentes metabolitos (p.ej., malondialdehído [MDA] en el caso de la peroxidación lipídica, ácidos grasos, 8-hidroxi-deoxiguanosina de las bases (nucleicas, etc.), la determinación de los cuales sirve como expresión de estrés oxidativo (EO). La determinación urinaria de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), por espectrofotometría, es uno de los métodos frecuentemente utilizados para valorar los valores de MDA y de esta forma establecer el estado oxidativo<sup>16</sup>. La tasa de MDA depende de la producción de RLO y de su dismutación (neutralización) por moléculas antioxidantes, cuya fuente en condiciones habituales está en los alimentos de origen vegetal (vitaminas C y E, carotenos, polifenoles, etc.).

Con el objeto de obtener muestras de MDA en amplias poblaciones, hemos puesto a punto una técnica de determinación de TBARS en orina, que al ser incruenta, facilita la posibilidad de aumentar las cohortes<sup>17</sup>. Los estudios se han realizado en balnearios incluidos en el Programa de Termalismo Social del Instituto para las Migraciones y Servicios Sociales (IMSERSO) del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales de España que, por sus características, permite tener controlados a los voluntarios en hábitos de vida y tratamiento. Hernández-Torres et al<sup>17,18</sup> han mostrado que la estancia en el balneario disminuye significativamente la eliminación urinaria de TBARS, particularmente a partir del noveno día de tratamiento. La magnitud de la disminución depende directamente de la cantidad de TBARS urinarios a la llegada al balneario<sup>19</sup>.

Las causas de la producción de RLO en el organismo son varias, e influyen de un modo notable el ejercicio físico<sup>20-22</sup>, la obesidad<sup>23-25</sup> y la edad<sup>26</sup>, entre otros factores. El objetivo del presente trabajo es analizar si la eliminación urinaria de TBARS depende del mes del año en que se hace la determinación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han obtenido muestras de orina de 230 voluntarios del Programa de Termalismo Social del IMSERSO, 115 varones y 115 mujeres, rango de edad de 52-81 años, que asistieron a 2 balnearios españoles, uno de aguas sulfuradas (110 voluntarios; 55 varones y 55 mujeres) y otro de aguas bicarbonatadas-sulfatadas (120 voluntarios; 60 varones y 60 mujeres), en 3 estaciones distintas del año: otoño (septiembre, octubre y noviembre), primavera (marzo y mayo) y verano (julio), aunque en años diferentes. Se determinó la concentración de TBARS mediante espectrofotometría a la llegada al balneario y a los 14 días de tratamiento con aguas mineromedicinales; paralelamente se les realizó historia clínica que incluía tratamiento médico-cronoterápico a recibir y registro de la presión arterial, entre otras variables. Todos los voluntarios se sometieron a la misma dieta y al mismo régimen de vida y continuaron tomando su medicación. En ningún caso hubo modificaciones del tratamiento farmacológico que realizaban los pacientes hipertensos.

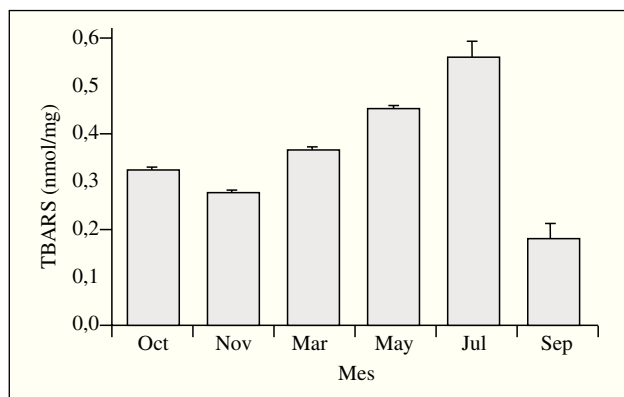
Los voluntarios realizaron un régimen de comidas diarias a base de desayuno, comida y cena, con dietas globales diarias entre 2.000 y 2.500 calorías, rica en verduras y vegetales, hiposódica en origen y con vino tinto (250 ml) durante las comidas, con ejercicio físico moderado superior a 60 min de paseo diario.

### Técnica de detección en orina humana de productos de peroxidación lipídica

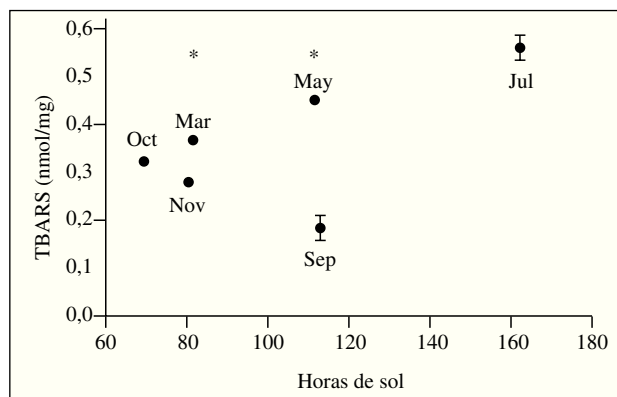
La metodología ha sido descrita previamente por Hernández Torres et al<sup>17,18</sup>: las muestras de orina se recogen en tubos de plástico estériles, que se recubren con papel de estaño, para preservarlas de la luz solar y rápidamente se congelan para evitar oxidaciones, manteniéndolas en el frigorífico congelador a -20 °C durante el traslado al laboratorio, que se realiza en nevera con nieve carbónica, para posteriormente conservarlas en el laboratorio a -78 °C. La determinación se realiza en espectrofotómetro a 535 nm mediante una modificación de la técnica de Uchiyama y Mihara<sup>27</sup>. Los valores obtenidos se expresan en relación con la tasa de creatinina en orina como nmol/mg de creatinina.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media. Las medias se compararon mediante el test de la t de Student, previa prueba de Snedecor y



**Figura 1.** Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) urinarias (nmol/mg de creatinina) a la llegada al balneario en relación con el mes.



**Figura 2.** Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) urinarias (nmol/mg de creatinina) a la llegada al balneario en relación con la radiación solar recibida. \* $p = 0,000$ .

correspondiente corrección de Welch, cuando las varianzas no eran homogéneas. Se utilizó el método de Bonferroni para comparar más de 2 medias. Se consideró significativo  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

La excreción urinaria de TBARS a la llegada al balneario varió dependiendo del mes del año (fig. 1). Se observa un incremento paulatino de la concentración de TBARS desde noviembre (mínimo) a julio (máximo), seguida de un descenso en septiembre. Los resultados no indican que haya una relación directa entre la excreción urinaria de TBARS y las radiaciones solares (expresadas como horas de sol) recibidas, pues a 80 h corresponden 2 niveles distintos ( $p = 0,00$ ); lo mismo sucede con 110 h (fig. 2).

Hay diferencia estadísticamente significativa entre casi todos los valores, salvo entre los medidos en las muestras de octubre y noviembre, pese a que hay 10 h de sol de diferencia; por otro lado, noviembre y marzo, con tan sólo una diferencia de 2 h de sol, presentan valores estadísticamente distintos ( $p < 0,05$ ). (Se desconoce qué pasa en agosto por no haber obtenido muestras en ese mes.) No existió diferencia entre ambos sexos.

## DISCUSIÓN

Los valores de TBARS excretados son la expresión del EO global del organismo, así como de los producidos localmente en el riñón, variable según el estado fisiopatológico renal<sup>28</sup>.

Entre otros factores, la producción de RLO está influida por la edad, y hay un aumento progresivo de MDA en sangre desde el nacimiento hasta los 90 años<sup>26</sup>. Sin embargo, el análisis por quintiles muestra que entre los 55 y los 75 años no hay cambios apreciables en la eliminación urinaria de TBARS<sup>17,18</sup>, por lo que hay que concluir que, o

bien el incremento con la edad de la producción de MDA es muy paulatino, o bien que el pequeño déficit de función renal debido al envejecimiento enmascara en la orina el aumento de TBARS en sangre. Por otra parte, también podría deberse a la diferente metodología utilizada, MDA en sangre<sup>26</sup> y TBARS en orina<sup>17,18</sup>.

El presente estudio muestra cambios en la cantidad de TBARS urinarios dependiendo de la época del año en que se haga el estudio. Las variaciones estacionales pueden deberse a las radiaciones solares recibidas; sin embargo, en la figura 2 se muestran las radiaciones similares que producen distintos valores urinarios de TBARS, dependiendo de la época del año, lo que hace pensar que hay otros factores condicionantes. Uno de los factores sería la síntesis de la vitamina D que varía con la época del año<sup>29</sup>; esta vitamina es un antioxidante de membrana, ya que la vitamina D<sub>3</sub> (colecalciferol), su metabolito 1,25-dehidroxicolecalciferol y la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) inhiben la lipoperoxidación dependiente de hierro<sup>29</sup>. Éste no es evidentemente el único factor, ya que la síntesis de la vitamina D<sub>3</sub> sí depende de la radiación solar.

Arnaud et al<sup>30</sup>, en un estudio llevado a cabo en la isla de Cuba entre varones sanos, encuentran también variaciones estacionales en los componentes plasmáticos del balance oxidativo, TBARS y antioxidantes; sin embargo, en su estudio encuentran la mayor concentración plasmática de TBARS en el mes de octubre y la menor en los meses de junio-julio. Seguramente los diferentes valores atmosféricos debidos a la diferente situación geográfica de la isla en comparación con España explican la diferencia.

¿Cuáles pueden ser las causas de este carácter rítmico? Como factor único hay que excluir las horas de radiación solar, pues no hay una relación estricta (fig. 2), ya que dependiendo del mes la eliminación urinaria es distinta. Como factores contribuyentes no hay que descartar las diferentes tasas de síntesis de factores antioxidantes (ácido úrico, vitamina D, glutatión, etc.) debidas a cambios

estacionales; además hay que tener en consideración la variación anual del contenido de moléculas antioxidantes que se ingieren con la alimentación, fundamentalmente de frutas y verduras (vitaminas C y E, carotenos, licopenos, quercetoides, isoflavonas, resveratroles, etc.).

Lenton et al<sup>31</sup> han mostrado una correlación entre el contenido de glutatión y vitamina C en linfocitos humanos: éstos son 2 antioxidantes que se complementan en su efecto barrido de RLO, de tal modo que la administración de ascorbato incrementa los valores de glutatión. El análisis estacional de los valores de vitamina C en linfocitos muestra que hay un máximo desde finales de primavera y el verano y un mínimo en otoño-invierno. Como glutatión y ascorbato van paralelos, se puede deducir que ambos antioxidantes tienen su máximo en primavera-verano. Se han descrito resultados similares en las mediciones de vitamina D<sup>32</sup>. Sin embargo, estos resultados no explican el incremento de productos de lipoperoxidación basales, precisamente en los meses en que hay una tasa mayor de glutatión, ascorbato y vitamina D, aunque se puede especular que la producción de RLO exógenos (radiaciones ultravioletadas y otros agentes) está regulada por los mismos factores que los disminuyen mediante un incremento de antioxidantes.

En resumen, hay variaciones estacionales en la eliminación urinaria de los productos de peroxidación lipídica. Los factores causales son una conjunción de diferentes agentes oxidantes (horas de radiación solar, etc.) y antioxidantes (dieta, valores plasmáticos de antioxidantes, efecto balneario, etc.). Quizá sería conveniente tener presente esta estacionalidad a la hora de tratar procesos crónicos ligados a cambios en el equilibrio oxidativo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Muñoz FJ, De la Fuente M. The effect of the seasonal cycle on the splenic leukocyte functions in the turtle *Mauremys caspica*. *Physiol Biochem Zool*. 2001;74:660-7.
- Muñoz FJ, Galván A, Lerma M, De la Fuente M. Seasonal changes in peripheral blood leukocyte functions of the turtle *Mauremys caspica* and their relationship with corticosterone, 17-beta-estradiol and testosterone serum levels. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000;77:27-42.
- Sumová A, Trávníčková Z, Peters R, Schwartz WJ, Illnerová H. The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7754-8.
- Crawford VLS, McCann M, Stout RW. Changes in seasonal deaths from myocardial infarction. *Q J Med*. 2003;96:45-52.
- Kloner RA, Das S, Poole WK, Perri R, Muller J, Cannon CP, et al. Seasonal variation of myocardial infarct size. *Am J Cardiol*. 2001;88:1021-4.
- Müller D, Lampe F, Wegscheider K, Shultzeiss HP, Behrens S. Annual distribution of ventricular tachycardias and ventricular fibrillation. *Am Heart J*. 2003;146:1061-5.
- Granda TG, Filipski E, D'Attino RM, Vignaud P, Anjo A, Bissery MC, et al. Experimental chronotherapy of mouse mammary adenocarcinoma MA13/C with docetaxel and doxorubicin as single agents and in combination. *Cancer Res*. 2001;61:1996-2001.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye Sw, Dwyer P, Fenn Wo. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954;67:623-6.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298-300.
- Miquel J, Fleming JE. Theoretical and experimental support for an «oxygen radical/mitochondrial injury» hypothesis of cell aging. En: Johnson JE Jr, Harman D, Walford R, Miquel J, editors. *Free Radical, aging and degenerative disease*. New York: Alan R. Liss; 1986. p. 51-74.
- Barja G. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging (Milano)*. 2000;12:342-55.
- Gredilla R, Barja G, Lopez-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33:279-87.
- Barja G. Free radicals and aging. *TRENDS in neurosciences*. 2004; 27:595-600.
- Hasty P, Vijg J. Genomic priorities in aging. *Science*. 2002;296:1250-1.
- De Boer J, Olle Olle Andressoo J, De Wit J, Huijmans J, Beems RB, Van Steeg H, et al. Premature aging in mice deficient in Dna repair and transcription. *Science*. 2002;296:1276-9.
- Lissi EA, Salim-Hann M, Sir T, Videla LA. Is spontaneous urinary visible chemiluminescence a reflection of in vivo oxidative stress? *Free Radic Biol Med*. 1992;12:317-22.
- Hernández-Torres A, Ramón JR, Cuenca E, Márquez J, Rubio S. Eliminación urinaria de TBARS en una población de la tercera edad. Su modificación por la crenoterapia y la radiación solar. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 1998;33 Supl I:129.
- Hernández-Torres A, Ramón JR, Cuenca E, Márquez J. Acción antioxidante de la crenoterapia con aguas sulfuradas y peloides sobre el organismo humano en relación con la edad. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 1999;34:215-25.
- Cuenca Giralde E. Influencia de la crenoterapia con aguas bicarbonatadas sulfatadas en el estrés oxidativo de una población balnearia [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2003.
- Arslan S, Erdem S, Kilinc K, Sivri A, Tan E, Hascelik HZ. Free radical changes in rat muscle tissue after exercise. *Rheumatol Int*. 2001;20:109-12.
- Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32:1576-81.
- Selamoglu S, Turgay F, Kayatekin BM, Gonenc S, Yslegen C. Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood. *Acta Physiol Hung*. 2000;87:267-73.
- Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:355-62.
- Vincent HK, Powers SK, Dirks AJ, Scarpace PJ. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25:378-88.
- Beltowski J, Wojcicka G, Gorny D, Marciniak A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol*. 2000;51:883-96.
- Gil P, Fariñas F, Casado A, López-Fernández E. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology*. 2002;48:209-14.
- Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analyt Biochem*. 1978;86:271-8.
- Braun N, Frank J, Biesalski HF, Risler T. Antioxidative treatment retards progression of idiopathic membranous nephropathy. *Nephron*. 2000;86:208-9.
- Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett*. 1993;326:285-8.
- Arnaud J, Fleites P, Chassagne M, Verdura T, Barnouin J, Michard MJ, et al. the SECUBA group. Seasonal variations of antioxidant imbalance in Cuban healthy men. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55:29-38.
- Lenton KJ, Theriault H, Cantin AM, Fülöp T, Payette H, Wagner JR. Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1194-200.
- Rapuri PB, Knyamu K, Gallagher CR, Haynatzka V. Seasonal changes in calciotropic hormones, bone markers and bone mineral density in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2024-32.