

50524
47



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

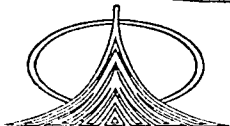
**RELACION DE LOS NIVELES DE
ANTIOXIDANTES TOTALES, SUPERÓXIDO
DISMUTASA Y GLUTATIÓN PEROXIDASA
CON EL ESTADO DE SALUD DE UNA
POBLACION DE ANCIANOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
NELLY GONZÁLEZ FLORES

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**DIRECTORES DE TESIS:
M. EN C. RAQUEL RETANA UGALDE
DR. VICTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**



Autorizo a la Dirección General de Estudios
UNAM a difundir en formato electrónico el
contenido de mi trabajo de tesis.
NOMBRE: Nelly González Flores
FECHA: 11 Ago - 2003
FIRMA: [Firma]

AGOSTO 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Dios y a la Virgen por estar siempre a mi lado,
por darme fortaleza y por la oportunidad de vivir.

A mis papás por sus cuidados,
su confianza en mí, su apoyo y su cariño.
Porque todo lo que soy, es gracias a
ustedes.

A mis hermanitas porque ustedes han sido
mi motor para ser mejor, porque sé que cuento
con ustedes en todo momento, porque es una
bendición tenerlas.

A mi abuelita porque eres mi segunda
mamá, por tus consejos, tus cuidados y
tu tiempo.

A mis tíos Toño, Gela, Socorro, Arnulfo
y a mis primos Huirón y Chucho por estar
siempre cerca de mí y por su apoyo incondicional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A la M. en C. Raquel Retana Ugalde por todo su tiempo ayuda y paciencia, por su amistad y sus consejos.
Mil gracias.

A la maestra Mirna, por esos días de interminable trabajo, por su espíritu de lucha y por esas contagiosas ganas de vivir.

Al Dr. Victor M. Mendoza y la Dra. Martha Sánchez, por sus jalones de orejas, por esperarme, por ser los pilares de esta unidad.

A todos y cada uno de mis amigos: No solo por su amistad sino por todo lo que han significado en mi vida y lo que han aportado a ella.

TESIS COM
UNIVERSIDAD DE ORIZABA

c

I RESUMEN

ANTECEDENTES. De acuerdo con la teoría de radicales libres (RL) propuesta por Denham Harman, el envejecimiento se presenta como la acumulación progresiva de cambios asociados con o responsables del aumento en la susceptibilidad a la enfermedad y muerte que acompaña el avance en la edad. Dentro de los principales padecimientos asociados con el envejecimiento se encuentran la diabetes mellitus e hipertensión arterial, enfermedades de tipo multifactorial, cuya aparición se ha asociado a la presencia de alteraciones entre la producción de RL y el estatus del sistema antioxidante en personas de edad avanzada. La lipoperoxidación (LPO) es un marcador de RL.

OBJETIVOS. Evaluar la concentración de lipoperóxidos de una población de adultos mayores sanos y con enfermedad crónica de la Ciudad de México.

Evaluar la actividad de enzimas antioxidantes, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, y niveles de antioxidantes totales (AT) de una población de adultos mayores sanos y con enfermedad crónica de la Ciudad de México

MATERIAL Y METODOS. Se llevó a cabo un estudio analítico de tipo prolectivo, transversal y comparativo en una muestra de 128 adultos mayores (≥60 años) residentes de la ciudad de México en los últimos 5 años o más, agrupados de la siguiente manera: 61 adultos mayores clínicamente sanos desde el punto de vista gerontológico (sin padecimientos crónicos agudizados y con funcionalidad física y mental adecuada para su edad, sexo y participación social en actividades socioculturales) 16 adultos mayores con diabetes mellitus, 42 con hipertensión arterial y 9 con ambas patologías crónico-degenerativas.

A dichos sujetos se les cuantificaron los niveles séricos de antioxidantes totales y lipoperóxidos, así como actividades de SOD y GPx. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de las pruebas estadísticas: χ^2 , t de Student, análisis de varianza y razón de momios con ayuda de los paquetes estadísticos Epi-info 6.0 y SPSS 10.0.

RESULTADOS. Los resultados más relevantes del estudio mostraron que los niveles séricos de antioxidantes totales fueron más altos en el grupo de sanos con respecto al grupo de enfermos con una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Del mismo modo, al dividir el grupo por tipo de enfermedad se encontró que los sanos poseen los niveles más altos de AT, mientras que los que padecen diabetes mellitus poseen los niveles más bajos, con una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Con respecto a los peróxidos lipídicos, éstos presentaron niveles más altos en el grupo de diabetes mellitus, con diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo de sanos. La enzima SOD, presentó la actividad más alta en el grupo de sanos, mientras que la actividad más baja la presentó el grupo de diabetes mellitus. La enzima GPx presentó sus actividad más baja en el grupo de diabetes mellitus + hipertensión arterial.

CONCLUSIONES. El estrés oxidativo aumenta en ancianos que padecen alguna enfermedad crónica con respecto a ancianos sanos, de la misma manera, los antioxidantes se observaron disminuidos en el grupo de enfermos al estar siendo consumidos por el estrés oxidativo presente.

II. INTRODUCCIÓN

Uno de los cambios más profundos en los recientes años ha sido el envejecimiento de la población a escala mundial, lo cual no ha sido más que el exitoso resultado de las medidas de salud pública tal como las vacunas. Ante tal suceso los científicos se han interesado cada vez más en entender el proceso de envejecimiento así como las enfermedades asociadas a él.

Hoy se sabe que el envejecimiento se presenta como la acumulación progresiva de cambios a través del tiempo, asociados con o responsables en, el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad y a la muerte que acompaña el avance en la edad. Estos cambios asociados con el tiempo son atribuidos al proceso de envejecimiento. De esta manera la teoría de envejecimiento por radicales libres asume que hay una única causa básica de envejecimiento, modificada por factores genéticos y ambientales, y postula que los radicales libres están involucrados en el envejecimiento y en los desórdenes asociados a él, es decir, el envejecimiento puede ser, simplemente, la suma de las reacciones deletéreas por radicales libres que continuamente se presentan en células y tejidos.

Ante la toxicidad de estos radicales libres, las células han desarrollado la habilidad para sintetizar o utilizar moléculas denominadas antioxidantes que puedan intervenir en las reacciones de producción de radicales libres con el fin de minimizar el daño de éstos en el organismo.

Las investigaciones realizadas al respecto se han enfocado en encontrar la forma de disminuir la producción de radicales libres por diferentes medios, tales como restricción calórica y/o ingesta de antioxidantes, con el fin de aumentar el tiempo y calidad de vida de los seres humanos; teniendo como principal objetivo la disminución en la aparición de enfermedades, que de acuerdo a diferentes

estudios, mantienen relación con la presencia de niveles alterados de radicales libres.

Por tales motivos, este trabajo pretende encontrar una relación entre la presencia de enfermedades como hipertensión arterial y diabetes mellitus con respecto a la actividad de enzimas antioxidantes en adultos mayores y un marcador de daño oxidativo con son los lipoperóxidos séricos, dado que, la presencia de ciertos radicales libres en tales enfermedades, provocaría un desequilibrio en el sistema antioxidante que, si se presenta a nivel enzimático, establecería un nuevo aspecto para comprender y afrontar con mejores armas, la aparición de dichas enfermedades en el anciano.

III. MARCO TEORICO

III. 1 RADICALES LIBRES Y ENVEJECIMIENTO

1. ENVEJECIMIENTO

Actualmente la Gerontología no sólo se encarga de explicar los procesos que causan el deterioro del cuerpo humano con el transcurso del tiempo, sino que se ha planteado el objetivo de modificar el envejecimiento del ser humano. ¹

Se dice que un organismo manifiesta envejecimiento cuando decrece su vitalidad y cuando aumenta proporcionalmente su vulnerabilidad. Pero ¿qué es realmente el envejecimiento?. Es posible decir que "envejecimiento es la acumulación progresiva de cambios asociados con el tiempo, el cual es responsable del incremento en la susceptibilidad a la enfermedad y muerte, que acompaña al avance de la edad." ²

Las causas de que dicho proceso se haga presente en la vida de todo organismo, y principalmente en el ser humano ha provocado la aparición de diversas teorías: ^{1,2,3}

- Interacción con el medio ambiente: la cual indica que las alteraciones que ocurren al envejecer son siempre el resultado del intercambio de materia y energía del organismo con el medio ambiente. ^{1,2,3}
- Envejecimiento de órganos y sistemas: hay una disminución progresiva de la capacidad homeostática en el organismo acompañada de una reducción de la capacidad funcional de la mayoría de los sistemas fisiológicos de aproximadamente 1% por año. ^{1,2,3}
- Codificación del envejecimiento en el ADN: El descubrimiento de que los fibroblastos son incapaces de dividirse de nuevo después de haber experimentado cierto número de mitosis en un medio óptimo apoyó el

concepto de que el envejecimiento de los organismos está programado en su genoma.^{2,3}

- ✓ Teoría genética: la idea central de esta teoría es que una mutación del ADN altera la fidelidad de la síntesis de proteínas, lo cual causa el declinar funcional y la muerte del organismo.^{1,2,3}
- ✓ Teoría de radicales libres: esta teoría asume que las reacciones de radicales libres están involucradas en el envejecimiento y los desórdenes asociados a éste.^{1,2,3}

El envejecimiento es un fenómeno universal y perceptible observado desde tiempos inmemoriales. Sin embargo, los mecanismos de envejecimiento en el ámbito molecular aún permanecen comprendidos de manera incompleta, y en la ausencia de suficientes conocimientos científicos, las teorías sobre el envejecimiento abundan.⁴

Sin embargo, la teoría propuesta por Denham Harman en 1956, denominada Teoría del envejecimiento por radicales libres provee una explicación plausible del fenómeno del envejecimiento, incluyendo la relación del promedio de vida de especies de mamíferos y su metabolismo basal, así como los daños degenerativos en la parte final de la vida.⁴

2. TEORÍA DE RADICALES LIBRES.

De acuerdo con dicha teoría, el envejecimiento se presenta como la acumulación progresiva de cambios a través del tiempo, asociados con o responsables en, el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad y a la muerte que acompaña el avance en la edad. De esta manera la teoría de envejecimiento por radicales libres asume que hay una única causa básica de envejecimiento, modificada por factores genéticos y ambientales, y postula que los radicales libres están involucrados en el envejecimiento y en los desórdenes asociados a él, es

decir, el envejecimiento puede ser, simplemente, la suma de las reacciones deletéreas por radicales libres que continuamente se presentan en células y tejidos. Estas reacciones pueden originarse a partir de la exposición a radiación ionizante, reacciones no enzimáticas y enzimáticas, siendo éstas últimas, las más frecuentes en los seres vivos, tales como las involucradas en la cadena respiratoria, fagocitosis, y reacciones no enzimáticas del oxígeno.^{4,5} (Fig. 1)

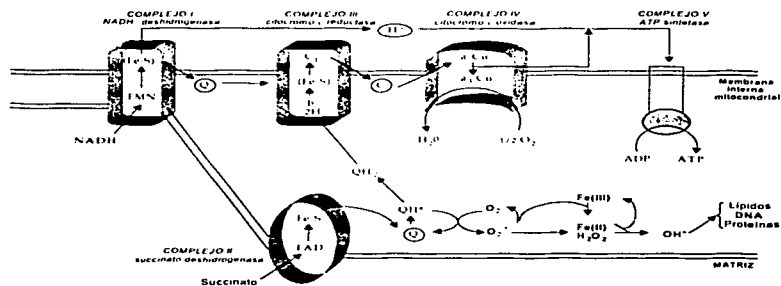


Figura 1. Generación de radicales libres en la mitocondria.

Fuente: Gabbita, 1997.⁶

La palabra radical se origina de radix (raíz) indicando el significado biológico de las reacciones que involucran a los radicales libres, mientras que el adjetivo libre enfatiza la alta reactividad de los mismos.⁷ Un radical libre es una especie química (molécula o átomo) con uno o más electrones desapareados, pudiendo ser aniónico, catiónico o neutro. La presencia de estos electrones, provoca que la especie sea altamente reactiva.^{7,8}

Los radicales libres fueron demostrados por primera vez en 1900 por Gomber, quien describió la descomposición del hexafeniletano en dos radicales trifenílmétilo. En 1929, Paneth y Hofeditz descubrieron que la destrucción del tetrametilo resultaba en la formación de dos radicales. En 1930, Michaelis investigó la actividad de los radicales libres en el campo de la bioquímica, sin embargo, para su tiempo, sus estudios fueron considerados prematuros. Otros estudios de la importancia biológica de los radicales libres, fueron iniciados en los 40's con la introducción de nuevas herramientas experimentales para la detección de radicales libres. Métodos más desarrollados en 1962 permitieron la evaluación de reacciones cinéticas que involucraban radicales de vida corta.⁷

Desde el punto de vista químico se sabe que los electrones en los átomos ocupan regiones en el espacio conocidos como orbitales. Cada orbital puede contener un máximo de dos electrones, con spin en dirección opuesta. De esta manera, un radical libre contiene sólo un electrón en un orbital. Así, diferenciamos a la mayoría de las moléculas biológicas como no-radicales, puesto que sólo contienen electrones apareados.⁹ Tal electrón solitario le confiere al radical libre cierto grado de inestabilidad en términos de energía y cinética. Energéticamente, para adquirir un nivel de estabilidad, los radicales libres eliminan el electrón de su capa electrónica. Este proceso puede llevarse a cabo de dos maneras: perdiendo un electrón, en cuyo caso el radical resultante es una especie reductora, o por el contrario, ganando un electrón, obteniéndose así un radical oxidante.¹⁰ De esta manera, tenemos tres vías de formación de radicales libres:^{11,12}

- 1) Por ruptura o fisión homolítica de un enlace covalente en una molécula normal donde cada fragmento retiene a uno de los electrones



- 2) Por transferencia de un electrón solitario a una molécula normal.



- 3) Por fisión heterolítica en una molécula covalente, en la que uno de los átomos retiene los dos electrones del enlace.



La degradación de moléculas primarias a radicales libres, requiere de energías de activación relativamente altas, pero la subsecuente descomposición utiliza mucho menos energía. Un radical libre requiere de muy poca energía para iniciar reacciones en cadena alternas que son muy peligrosas para los sistemas vivos.⁷

La producción de radicales libres en los organismos puede ser causada tanto por factores exógenos como endógenos, sin embargo, *in vivo* las fuentes más importantes de radicales libres son las reacciones bioquímicas que involucran al oxígeno.⁸

El oxígeno existe en el aire como una molécula diatómica (O₂), la cual, fue aislada y caracterizada entre 1772 y 1774 por Priestley, Lavoisier y Scheele. El oxígeno apareció en cantidades insignificantes sobre la superficie de la Tierra hace más de 2 billones de años, y la evidencia geológica indica que fue creado por la actividad fotosintética de microorganismos como las algas verdeazules. Así, el lento crecimiento de la concentración de oxígeno en la atmósfera estuvo acompañado de la formación de ozono en la capa de la estratosfera. Tanto el ozono como el oxígeno fueron filtros importantes contra la intensa luz ultravioleta proveniente del sol, que alcanzaba la superficie de la Tierra. De esta manera, la Tierra es considerada como el único centro de oxidación en el Universo.¹³

Actualmente, el porcentaje de oxígeno en aire seco es 21%, detrás del nitrógeno (78%), siendo el segundo elemento más abundante en la atmósfera. Sin embargo, la cantidad del oxígeno en el aire es tan insignificante con respecto al oxígeno presente como parte de la molécula de agua en océanos, lagos y ríos y

como parte de reservorios minerales en la corteza terrestre, donde es por mucho, el elemento más abundante. Cuando la atmósfera terrestre cambió de un estado altamente reductor a su actual estado rico en oxígeno, las formas anaerobias cesaron de crecer o se reubicaron en lugares donde el oxígeno fue excluido. Bajo condiciones normales, el oxígeno un gas estable, incoloro, inodoro e insípido, de limitada solubilidad en agua (3 volúmenes del gas se disuelven en 100 volúmenes de agua); esta limitada solubilidad es vital para la vida acuática y esencial para las funciones normales de tipo respiratorio en los humanos. El aire disuelto en el agua contiene un alto porcentaje de oxígeno (34%) que el mismo aire seco(21%). Cuando se compara con los otros elementos, el oxígeno tiene la tercera más alta afinidad electrónica y debe ser considerablemente más reactivo de lo que pudiera pensarse. Su reactividad se enmascara debido a que el oxígeno contiene dos electrones desapareados con el mismo número cuántico en spin (spin paralelo) y sólo cuando esta restricción es superada, la reactividad del oxígeno puede ser expresada. Es decir, da pie a la formación de radicales libres.¹³

Los principales radicales libres provenientes del oxígeno de importancia biológica son: (Fig. 2)

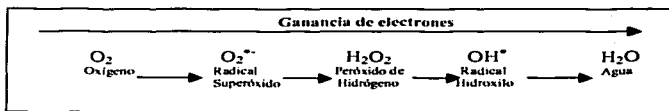


Fig. 2. Generación de radicales libres a partir de oxígeno

Fuente: Pierrefiche, 1995.¹⁰

➤ Radical superóxido. ($O_2^{\bullet-}$) Producido por la reducción monovalente del oxígeno dada por la siguiente reacción:^{8,9}



La química de este radical depende del ambiente en el que se encuentre disuelto; en solución acuosa se comporta como un agente oxidante débil capaz

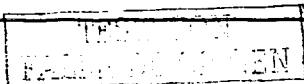
de oxidar moléculas como ácido ascórbico y tioles. Sin embargo, $O_2^{\cdot -}$ es un agente oxidante mucho más poderoso que puede reducir varios complejos de hierro, tal como, citocromo c.¹³

Generado *in vivo* como un producto normal de varios procesos metabólicos (Cuadro 1), su efecto dañino se debe a que es precursor del radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que es una especie más poderosa y dañina que el mismo $O_2^{\cdot -}$.¹⁰ (Fig. 3)



Fig 3. Radicales superóxido e hidroxilo.

Fuente: Weiss, 1997.¹⁴



Como se puede observar en el cuadro 1, la producción de radicales superóxido, es en parte importante, realizada como mecanismo de los neutrófilos al matar bacterias. Cuando la membrana citoplásmica de un neutrófilo es estimulada por una partícula extraña, tal como una bacteria, el sistema membranal NADPH oxidasa es activado. El NADPH producido por la vía de las pentosas fosfato, es tomada del citoplasma y oxidado a NADP^+ , con la reducción resultante del oxígeno a radical superóxido.⁸

Cuadro 1. Principales fuentes del radical Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Fuente	Descripción
Cadena de transporte de electrones en la mitocondria	Escape de electrones en sitios como: el complejo NADH-Coenzima Q reductasa y formas reducidas de la coenzima Q. $\text{O}_2 + e^- \longrightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$
Auto oxidación de oxihemoglobina	$\text{Hem-Fe}^{2+} - \text{O}_2 \longrightarrow \text{Hem-Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-}$
Retículo endoplásmico	$\text{O}_2^{\cdot-}$ es formado durante la oxidación de una variedad de sustratos exógenos y endógenos.
Auto oxidación de pequeñas moléculas	Varias moléculas pequeñas como: adrenalina, tetrahidrobiopterina, nucleótidos.
Acción enzimática (Xantina oxidasa)	Particularmente importante durante la reperfusión después de la isquemia: $\text{Xantina} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Acido úrico} + \text{O}_2^{\cdot-}$
Oxidación respiratoria en la fagocitosis	$2\text{O}_2 + \text{NADPH} \longrightarrow \text{O}_2 + \text{NADP}^+ + \text{O}_2^{\cdot-}$

Fuente: Bunker W. 1992.⁸

Existen algunas evidencias de que la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por lo neutrófilos en los ancianos, podría depender del proceso de activación de la membrana, dadas las concentraciones aumentadas de calcio en las células, que se ha visto mejora las funciones de los neutrófilos en ancianos.⁸

Este radical tiene una forma protonada (HO_2^{\bullet}) llamada radical hidroperóxido, que es más oxidante y reductor que el mismo superóxido, sin embargo, este radical se presenta en una cantidad muy pequeña a pH fisiológico.¹³

Una de las principales reacciones en las que el radical superóxido está involucrado es en la denominada dismutación, la cual se representa como:

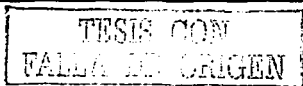


Esta reacción se presenta en todo sistema biológico que genere el radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno, siempre que el superóxido no sea interceptado por otras moléculas.¹¹

Dicha reacción es relativamente lenta, pero es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) *in vivo*.^{8,13}

> Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Esta molécula no es un radical libre, pero es considerada una especie reactiva de oxígeno, por su alta reactividad en presencia de metales de transición para formar el radical hidroxilo (OH^{\bullet}).¹²

Cualquier sistema que produzca el radical superóxido, producirá también (como resultado de la reacción de dismutación) peróxido de hidrógeno; sin embargo, muchas otras enzimas como: urato oxidasa, glucosa oxidasa y oxidasas de aminoácidos producen peróxido de hidrógeno directamente por la transferencia de dos electrones al oxígeno. El peróxido de hidrógeno es un oxidante débil y un agente reductor débil que es relativamente estable en ausencia de metales de transición. La molécula posee una estructura covalente sin carga, se mezcla fácilmente con agua, y es tratada por la célula como una molécula de agua, rápidamente difundida por las membranas citoplasmática. Una vez dentro, el peróxido de hidrógeno podrá reaccionar con Fe^{2+} y posiblemente Cu^+ , para formar el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y éste puede ser el origen de muchos efectos tóxicos.¹¹



Ante tales características de daño, el organismo ha necesitado de la evolución de defensas contra él, de esta manera, dicha molécula es removida de las células por la acción de enzimas como la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), la cual contiene selenio.¹³

➤ Radical hidroxilo. ($\cdot\text{OH}$) Puede ser producido por la reacción entre peróxido de hidrógeno con metales de transición, sin embargo, es el producto principal obtenido por la hidrólisis del agua.¹¹



Es una de las especies más reactivas conocida hasta el momento, pues puede reaccionar con casi cualquier molécula biológica. Las reacciones de este radical pueden ser clasificadas en tres tipos: ¹¹

1. **Sustracción de un hidrógeno:** por ejemplo, se presenta cuando el hidroxilo reacciona con alcoholes, "empujando" al hidrógeno a salir de la molécula del alcohol y se combina con él para formar agua, dejando un átomo desapareado en el átomo de carbono del que extrajo al hidrógeno. Esta reacción se presenta *in vivo* también con un importante fosfolípido de la membrana celular llamado lecitina, en la que los carbonos con electrones desapareado resultantes conllevan a una serie de reacciones en cadena denominada peroxidación lipídica.¹¹
2. **Adición:** Este tipo de reacción se presenta entre el radical hidroxilo y moléculas con anillos aromáticos en su estructura, por ejemplo, las bases púricas y pirimídicas presentes en la estructura de los ácidos nucleicos.¹¹
3. **Transferencia de electrones:** se presentan entre el radical hidroxilo y moléculas de tipo inorgánico.¹¹

Estas reacciones ilustran un importante principio en la química de los radicales: *la reacción de un radical con un no radical produce un radical diferente que puede ser más o menos reactivo que el radical original.* Los radicales producidos a partir de reacciones con el radical hidroxilo son usualmente menos reactivos, sin embargo, la importancia se observa en los daños producidos.¹¹

3. DAÑO CELULAR ASOCIADO A RADICALES LIBRES.

En los organismos aerobios, el oxígeno es reducido a agua al término de la cadena respiratoria en la mitocondria. La molécula de oxígeno permanece ligada al complejo IV de la cadena (ferrocitocromo c: oxigenoreductasa) hasta que es totalmente reducido a agua por la transferencia de cuatro protones y cuatro electrones. Sin embargo, otro flujo en la cadena respiratoria de la mitocondria, es la fuga de electrones, principalmente a partir de proteínas que contienen Fe-Sulfuro que lleva a la reducción parcial del O_2 al anión superóxido, éste puede ser entonces reducido por la adición de un segundo electrón a peróxido de hidrógeno; la adición de un tercer electrón lleva a la formación del radical hidróxilo.¹⁵

La fuga de electrones de la cadena respiratoria de la mitocondria para producir el anión superóxido ocurre continuamente durante el metabolismo normal aerobio, y se ha estimado que entre el 1 y 2 % de todos los electrones que viajan a través de la cadena se fugan formando el anión superóxido y su producto de dismutación, peróxido de hidrógeno. Existen otras fuentes endógenas del radical $O_2^{\cdot -}$: enzimas oxidasas solubles como la NADPH, D-aminoácidoxidasas, xantín oxidasa, epinefrina, sustratos de quinoidina como la coenzima Q y la vitamina K y el sistema citocromo P450.¹⁵

Bajo condiciones metabólicas normales, el $O_2^{\cdot -}$ puede ser producido por todas estas fuentes endógenas y se ha estimado que cada célula en el cuerpo

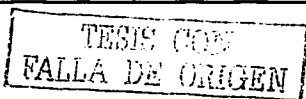
humano es expuesta acerca de 10^{10} moléculas de O_2^{\bullet} por día. Para una persona de 70 Kg esta cantidad es cerca de 0.15 moles de O_2^{\bullet} producido en todo el cuerpo en un día o lo que es igual a 1.75 Kg por año.¹⁵

Una vez formado el O_2^{\bullet} puede reaccionar con el mismo dismutándose a peróxido de hidrógeno y oxígeno, y el peróxido de hidrógeno e incluso el mismo O_2^{\bullet} en presencia de cantidades catalíticas de Fe-Cu pueden formar el radical hidroxilo.¹⁵

Los radicales y especies reactivas formadas pueden causar daño oxidativo a varias macromoléculas biológicas, por ejemplo: $\bullet OH$ puede dañar las membranas celulares por un proceso llamado peroxidación lipídica; las proteínas también pueden ser dañadas observándose cambios estructurales o pérdida de la actividad enzimática y daño oxidativo al ADN. El daño oxidativo al ADN ocurre en gran proporción bajo condiciones metabólicas normales, estimándose que el ADN de cada célula de nuestro cuerpo es expuesto a 10^4 golpes oxidativos por día llevando a la formación de más de 20 lesiones oxidativas, siendo mutagénicas muchas de ellas. Existe un grupo de enzimas reparadoras de ADN como las exonucleasas, endonucleasas y glicosilasas específicas que reparan estas lesiones; sin embargo, el sistema reparador no es perfecto y aunque puede escindir el 99% de las lesiones el 1% restante permanece acumulándose a través del tiempo. Entonces el daño oxidativo al ADN y las mutaciones acumuladas con la edad pueden contribuir a la aparición de procesos degenerativos a nivel celular.¹⁵

4. LIPOPEROXIDACIÓN.

Es un tipo de daño oxidativo caracterizado por la autoxidación de ácidos grasos polinsaturados la cual inicia con el ataque de una especie suficientemente reactiva que puede extraer un átomo de hidrógeno (H^{\bullet}) de un grupo metileno (-



CH₂) que generalmente se encuentra entre dos dobles enlaces. Debido a que el átomo de hidrógeno contiene sólo un electrón, la sustracción de este deja un electrón desapareado en el carbono ($\cdot\text{CH}_2$). La presencia del doble enlace en el ácido graso debilita el enlace C-H del carbono adyacente al doble enlace lo que facilita la remoción del hidrógeno. Por lo que las cadenas de ácidos grasos polinsaturados de las membranas celulares son particularmente sensibles a la peroxidación.^{13, 15}

El radical carbono formado conlleva a un rearrreglo molecular para formar un dieno conjugado el cual se combina con oxígeno para formar el radical peroxilo que a su vez es capaz de extraer un átomo de hidrógeno a partir de otro ácido graso e iniciar una reacción en cadena.¹³ (Fig. 4)

La peroxidación lipídica, como todas las reacciones en cadena, tiene tres etapas:^{13,15}

1. Iniciación: El hidrógeno es extraído.
2. Propagación: El radical peroxilo reacciona con otro ácido graso insaturado para formar otro radical carbono.
3. Terminación.

Dentro de las especies que pueden extraer el primer hidrógeno se encuentra el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), pero nunca el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

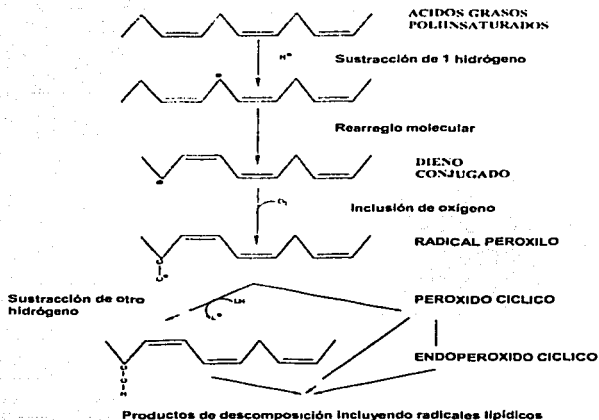


Figura 4. Lipoperoxidación

Fuente: Bunker, 1992.⁸

Los productos finales de la reacción en cadena son una gran variedad de hidroperóxidos y peróxidos cíclicos. Los lipoperóxidos son moléculas altamente estables a temperatura fisiológica, pero su descomposición es catalizada por metales de transición y complejos metálicos. Por ejemplo, todos los complejos del hierro que participan en la reacción de Fenton pueden promover la descomposición de los peróxidos lipídicos; moléculas tales como la hemoglobina y los citocromos, pueden facilitar la descomposición, aunque no de manera directa en la reacción de Fenton, sin embargo, pueden liberar el hierro que participa en la reacción.¹³

Los complejos de metales reducidos (Hierro I o Cobre I) reaccionan con los peróxidos lipídicos (LOOH) para dar radicales alcoxilo (LO*)¹³



Por otro lado, los complejos de metales oxidados (Hierro III o Cobre II) reaccionan más lentamente para producir radicales peroxilo y alcoxilo. Estos últimos estimulan la reacción en cadena sustrayendo átomos de hidrógeno.¹³

5. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA LIPOPEROXIDACIÓN.

Una extensa peroxidación de lípidos tiene su mayor implicación sobre las membranas celulares causando pérdida de la fluidez, caída del potencial de membrana, incremento en la permeabilidad de H⁺ y otros iones y la eventual ruptura de la membrana que lleva a la liberación de contenido celular, y por consecuencia a la muerte de la célula.¹³

6. DAÑO A PROTEÍNAS.

Los productos de oxidación de proteínas y derivados carbonílicos de las mismas, resultan de la modificación oxidativa de los aminoácidos de las cadenas laterales de las misma, a partir del desdoblamiento del péptido mediado por radicales libres y las subsecuentes reacciones con productos de oxidación de lípidos y carbohidratos. Actualmente se sabe que la presencia de grupos carbonilo en las proteínas puede indicar que las proteínas han sido sujetas de daño oxidativo por radicales libres.¹⁶

El contenido de grupos carbonilo incrementa con el envejecimiento y en enfermedades asociadas a envejecimiento y envejecimiento prematuro (Alzheimer). Estos derivados proteínicos son generados por el desdoblamiento

oxidativo de la cadena principal del péptido o por oxidación de los siguientes aminoácidos presentes en cadenas laterales: arginina, lisina, prolina y treonina.¹⁷

7. DAÑO A ADN.

Las especies reactivas de oxígeno pueden atacar casi cualquier estructura o molécula celular, en el caso del ADN, éstas pueden causar entrecruzamiento de cadenas, modificaciones químicas sobre las bases purínicas y pirimídicas, lo cual puede resultar en mutaciones, mientras que la oxidación de la desoxirribosa puede inducir la liberación de las bases o el desdoblamiento de la hélice del ADN.^{16,17}

8. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON RADICALES LIBRES.

El notorio aumento de la población anciana y sus necesidades de atención médica han llevado a un incremento en las actividades de investigación sobre el envejecimiento y las enfermedades relacionadas a él. Sin embargo, la mayor parte de la investigación se ha enfocado en estudiar las pérdidas relacionadas con la edad, mientras que aspectos importantes sobre la heterogeneidad de la población anciana han sido ignorados.¹⁸

Los 10 principales padecimientos presentes en adultos mayores de 65 años se presentan en el cuadro 2. Como se puede observar, la mayoría de las enfermedades presentes en esta población son de tipo multifactorial y en grado significativo se encuentran relacionados con el estilo de vida. Es posible observar que enfermedades como Diabetes mellitus e hipertensión arterial se encuentran entre las enfermedades más comunes en la población anciana.

**Cuadro 2 Diez principales causas de enfermedad en mayores de 65 años.
(Estados Unidos Mexicanos, 1996)**

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

Fuente: SSA, 1997.

La diabetes mellitus es un desorden muy complejo que involucra la disfunción insulínica con anomalías en la homeostasis de la glucosa y metabolismo lipídico. Hay dos tipos de diabetes mellitus de alta frecuencia: la diabetes mellitus insulínica independiente (DMID), también llamada juvenil o tipo I y la diabetes mellitus no insulínica dependiente (DMNID), también llamada de la edad adulta o tipo II. La incidencia de la diabetes mellitus tipo I es de 1.3 por cada 35 casos de diabetes mellitus tipo II. En la DMID existe una pérdida casi total de la secreción de insulina por los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que resulta en altos niveles de glucosa en sangre y gran pérdida de masa muscular y grasa. Ambos tipos de diabetes son padecimientos muy serios y representan un alto riesgo para desarrollar ceguera, enfermedades renales, amputación debida a gangrena y problemas cardíacos y cerebrales.¹⁸

Existe evidencia considerable de la importancia del estrés oxidativo en la etiología de la diabetes. Parte importante de la evidencia se basó en el hecho de que dos fármacos, aloxan y estreptozotocina, pueden producir diabetes tipo I en animales de laboratorio por la destrucción de los islotes de Langerhans vía estrés

oxidativo. El aloxan es fácilmente reducido a ácido dialúrico, la forma tóxica del compuesto, que entonces se autooxida para producir peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido e hidroxilo. Dados tales hechos, se ha sugerido que la citotoxicidad del aloxan está en función de la producción de especies oxidantes por reacción del fármaco con agentes reductores intracelulares (tioles y ácido ascórbico) y los bajos niveles de GPx en los islotes. Otras evidencias aseguran que el daño oxidativo del aloxan es que su toxicidad puede ser inhibida por antioxidantes primarios, compuestos quelantes y antioxidantes liposolubles.¹⁸

Por su parte la estreptozotocina, que es un compuesto con propiedades antibacterianas, también posee propiedades diabetogénicas y cancerogénicas, evidenciando la diabetogénesis vía procesos que involucran estrés oxidativo, así como el óxido nítrico.¹⁸

Por otro lado, los radicales derivados del oxígeno son importantes mediadores de daño y muerte celular, siendo, no sólo, especies químicas altamente reactivas importantes en el proceso de envejecimiento, sino que, de manera directa o indirecta, están involucrados en varios desórdenes clínicos, tales como aterosclerosis, cáncer, diabetes mellitus, hipertensión arterial, etc. Aunado a lo anterior, también juegan un papel importante en el daño celular inducido por procesos inflamatorios crónicos y varios desórdenes del sistema nervioso central. (Cuadro 3)¹⁶

La aparición de desórdenes neurológicos indican que el sistema nervioso, por un número de razones bioquímicas, fisiológicas y anatómicas, es especialmente vulnerable al daño oxidativo. Algunas de éstas son la alta actividad metabólica del mismo, así como la alta concentración de sustratos fácilmente oxidables, en particular, ácidos grasos poliinsaturados, debido a la alta proporción del área superficial de la membrana con respecto al volumen citoplasmático y a los bajos niveles de enzimas antioxidantes protectoras.¹⁶

En este aspecto, la Enfermedad de Parkinson es caracterizada por una destrucción selectiva y progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigrostriatales. En esta enfermedad la alta susceptibilidad al daño por estrés oxidativo se presenta debido a la alta concentración de hierro y baja concentración de glutatión (GSH) y GSH-Px en la sustancia *nigra*. Además, se ha encontrado un aumento en la actividad de la enzima monoaminoxidasa (MAO), la cual no se presenta en el envejecimiento normal, catalizando la desaminación enzimática de la dopamina resultando en la formación de peróxido de hidrógeno.¹⁶

La enfermedad de Alzheimer es clínicamente caracterizada por un deterioro cognoscitivo progresivo y patológico debido por la formación de marañas neurofibrilares, placas seniles o por la pérdida de sinapsis y neuronas. Evidencias indirectas sugieren que un aumento en el estrés oxidativo incluye: un incremento en los niveles cerebrales de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa así como en GSH-Px en glóbulos rojos, alta susceptibilidad en la peroxidación lipídica de las membranas y reducidos niveles plasmáticos de antioxidantes como vitaminas A y E, así como carotenoides. Las placas seniles contienen agregados de proteína β -amiloides, que se piensa juega un papel importante en la generación de radicales libres.¹⁶ Es de particular interés, el hecho de que personas con Síndrome de Down típicamente desarrollan demencia de tipo Alzheimer en su cuarta década.¹⁶

Aparte de desórdenes de tipo neurológico, otros desórdenes clínicos han sido relacionados con daño a partir de radicales libres. Los radicales libres de oxígeno y la peroxidación lipídica son los principales factores en la etiología de la aterogénesis y sus desórdenes clínicos asociados, los cuales incluyen: enfermedad arterial coronaria, demencia isquémica.¹⁶

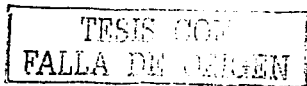
La reperusión de un tejido previamente isquémico ha sido asociado con la exacerbación de daño celular a juzgar por criterios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Los radicales libres juegan un papel muy importante en la

reperfusión, pues se ha demostrado que varios antioxidantes reducen el daño por reperfusión.¹⁶

La artritis reumatoide, es una respuesta inflamatoria inducida por complejos inmunes, los cuales con estimulados por la activación de los neutrófilos y la subsiguiente producción de radicales superóxido, el cual es convertido a peróxido de hidrógeno por acción de la SOD; aunque la mayoría del peróxido de hidrógeno es inactivado por la GSH-Px.¹⁶

La hipertensión se caracteriza por el incremento en la resistencia vascular periférica. Varios estudios han demostrado el aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno en pacientes con hipertensión. Así se ha encontrado que el estrés oxidativo puede contribuir a la generación y mantenimiento de hipertensión vía la inactivación de NO (óxido nítrico) el cual es también llamado "factor relajante derivado del endotelio", dicho compuesto se ha encontrado regula el tono normal de los vasos sanguíneos, causa vasodilatación renal con la consecuente diuresis; tales hechos llevan a una disminución en la presión sanguínea. La administración de antioxidantes mejora el metabolismo de NO y disminuye la hipertensión en ratas cuya tensión arterial elevada fue inducida por plomo, con fallo renal crónico e hipertensión espontánea.¹⁹

Recientemente se ha estudiado el papel del anión superóxido con relación a la presencia de hipertensión. NO puede ser atrapado por $O_2^{\bullet -}$ para formar el radical peroxinitrilo (ONOO[•]) y reducir de manera efectiva la biodisponibilidad de NO. De ahí que, las circunstancias resultantes del incremento en $O_2^{\bullet -}$ pueden ser peligrosas de varias maneras: en primer lugar, por la eliminación de los efectos benéficos del NO; y en segundo lugar, por los efectos dañinos del radical ONOO[•] el cual puede ser protonado para entonces forma ácido peroxinitroso, el cual se encuentra entre las especies más reactivas en los sistemas biológicos. Aunado a eso, otros estudios han presentado al $O_2^{\bullet -}$ como agente vasoconstrictor.²⁰



Cuadro 2. Enfermedades asociadas a radicales libres.

Enfermedad o Desorden	Papel de radicales libres
Aterosclerosis	Falla o consumo excesivo de defensas protectoras
Diabetes Mellitus	Oxidación anormal de sustratos o cambios en la concentración de oxígeno
Desórdenes cerebrales Anoxia	Oxidación anormal de sustratos o cambios en la concentración de oxígeno. Perturbación estructural de las células.
Lipofuscina en neuronas Enfermedad de Parkinson	Uso de fármacos
Enfermedad de Alzheimer	Producción excesiva de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 por células fagocíticas activadas.
Síndrome de Down	Falla o consumo excesivo de defensas protectoras.
Esclerosis múltiple	Perturbación estructural de la célula.
Granulomatosis crónica	Defecto genético en el sistema antioxidante
Desórdenes de tipo inflamatorio	
Asma	Producción excesiva de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 por células fagocíticas activadas.
Artritis reumatoide	Producción excesiva de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 por células fagocíticas activadas.
Enfermedades de pulmón. Asbestosis	Producción excesiva de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 por células fagocíticas activadas.
Síndrome respiratorio en el adulto	Producción excesiva de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 por células fagocíticas activadas.

Fuente: Loeckie, 1999¹⁶**III. 2 ANTIOXIDANTES Y ENVEJECIMIENTO**

La formación de radicales libres derivados del oxígeno, sustancias potencialmente tóxicas, es inherente en el funcionamiento de los organismos y representa la paradoja del oxígeno, ¹⁰ por lo que la continua exposición de los organismos aerobios a éstos y otros factores de tipo oxidante los ha dotado con eficientes y sofisticados sistemas antioxidantes.¹⁶ El sistema de defensa

antioxidante en el cuerpo humano consiste de varias etapas que protegen a diferentes niveles contra diversos tipos de especies reactivas de oxígeno.¹⁵

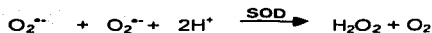
Un antioxidante es definido como cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones, retarda o previene la oxidación de un sustrato.⁷

Debido a que el sistema antioxidante constituye uno de los moduladores homeostáticos fundamentales del organismo se han clasificado en:¹²

- Antioxidantes primarios: neutralizan radicales libres o limitan la actividad de los mismos originando moléculas menos perjudiciales, llamadas también de tipo enzimático:¹²

- ◆ Superóxido dismutasa (SOD)

Su función principal es dismutar dos moléculas de ión superóxido y convertirlas en peróxido de hidrógeno y oxígeno.^{8,12}



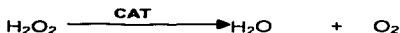
- ◆ Glutatión Peroxidasa (GSH-Px)

Se encarga de eliminar al peróxido de hidrógeno así como peróxidos de tipo lipídico, manteniendo una estrecha relación con la SOD.^{8,12}



- ◆ Catalasa (CAT)

Es una enzima formada por 4 subunidades protéicas unidas a un grupo hemo, se encuentra principalmente en los peroxisomas y actúa sobre el peróxido de hidrógeno liberado por la SOD.^{8,12}



- ◆ Proteínas de unión a metales.

- Transferrina.

Es una proteína intracelular que previene la acumulación de iones hierro libres en plasma, evitando la estimulación de la lipoperoxidación. Del mismo modo, se ha observado que la transferrina es una proteína negativa de fase aguda, es decir, que cuando existe una infección o inflamación los niveles de ésta se reducen, asimismo en las enfermedades crónicas en los ancianos tiende a mantener niveles más bajos que en los ancianos sanos.^{8,12}

- Ceruloplasmina

Esta proteína tiene varias acciones antioxidantes: es capaz de reaccionar con el radical superóxido y convertirlo en oxígeno molecular; tiene actividad de ferroxidasa catalizando la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} que es menos reactivo y, por último, es la responsable de captar el 90% del ión cobre presente en el plasma, lo que impide la estimulación de la lipoperoxidación por este metal de transición.^{8,12}

- Antioxidantes secundarios.

Captan radicales libres evitando las reacciones en cadena.¹²

- ◆ Vitamina A (carotenos)

El β -caroteno es un exitoso agente terapéutico en condiciones tales como porfiria, ya que actúa eliminando el singulete de oxígeno y otros radicales generados por reacciones fotoquímicas. Este carotenoide junto con el licopeno y α -caroteno son potentes erradicadores de singuletes de oxígeno y peróxidos lipídicos, lo cual

podría explicar el posible papel de los carotenoides en la prevención del cáncer. En algunos estudios se ha observado que los carotenoides, no sólo la vitamina A, podrían ser factores determinantes en la longevidad de un individuo.^{8, 12}

- Vitamina E.

Vitamina E incluye compuestos estrechamente relacionados, tales como α -tocoferol así como β , δ , ϵ , y γ tocoferoles, aunque el α -tocoferol es el más abundante en los sistemas biológicos. La vitamina E funciona rompiendo reacciones de radicales libres en cadena; al ser liposoluble, su función es particularmente importante en las membranas celulares donde interfiere en la propagación de la peroxidación lipídica. La vitamina E también es capaz de atrapar al singulete de oxígeno.^{8, 12}

- Vitamina C

Este compuesto es capaz de reaccionar con $O_2^{\cdot-}$, hidropéroxido (HO_2^{\cdot}) y formar semihidroascorbato, el cual, no es un radical muy reactivo.⁸

- Acido úrico

Este compuesto es capaz de eliminar el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), aunque también se cree tiene un papel importante en la quelación de metales, actuando entonces en la prevención de reacciones en cadena por radicales libres. Este compuesto tiende a incrementar su concentración plasmática a medida que avanza la edad.⁸

- **Albumina**

Proteína plasmática que es responsable del 10-15% de la erradicación del radical peroxilo en el plasma humano, en la que se involucran los grupos sulfhidrilo presentes en la proteína. Por otro lado, al igual que la ceruloplasmina, es capaz de quelar el cobre e inhibir la formación de OH^\bullet a partir de H_2O_2 . Las enfermedades crónicas van acompañadas de una disminución en los niveles de albumina, lo cual se presenta con frecuencia en el anciano.¹²

➤ **Antioxidantes terciarios.**

Degradan, reparan o reemplazan las biomoléculas dañadas.⁸

- **Enzimas reparadoras de lípidos.**

En la reparación de lípidos dañados, principalmente de las membranas, actúan:

- La fosfolipasa cortando los segmentos dañados.
- La acetiltransferasa reemplazando ácidos grasos y uniendo lípidos.
- La glutatión peroxidasa y la glutatión transferasa expulsando los largos segmentos de ácidos grasos oxidados.

- **Enzimas reparadoras de proteínas.**

Las proteínas que han sido dañadas son degradadas y las enzimas que intervienen en este proceso son:⁸

- Proteínasa que es la encargada de unir proteínas oxidadas.
- Proteasa cuya función es la de cortar los productos de la actividad de la proteínasa.

- Peptidasa que corta aminoácidos que pueden ser reciclados para sintetizar nuevas proteínas.
- ◆ Enzimas reparadoras de ADN.

Los diversos mecanismos de reparación dependen de la existencia de dos copias de la información genética, una en cada hebra de la doble hélice del ADN, y en el proceso de reparación actúan:⁸

- Exo y endonucleasas que reconocen la porción dañada de una hebra y la eliminan.
- ADNpolimerasa que copia la información almacenada en la hebra completa mediante el apareamiento de bases complementarias.
- ADNligasa que sella la muesca que permanecía en la hélice de ADN completando la restauración de una hebra intacta de ADN.

Las especies reactivas de oxígeno formadas por mecanismos endógenos y exógenos, pueden causar daño oxidativo en varias macromoléculas. El daño oxidativo acumulado de estas biomoléculas se acumula con la edad y pueden contribuir a un gran número de procesos degenerativos, los cuales pueden ser prevenidos por los antioxidantes.¹⁵ (Fig. 5)

Cuando las defensas antioxidantes no son completamente eficientes se observa un incremento en la formación de radicales libres en el cuerpo, lo que probablemente desencadenará en un incremento en el daño; este efecto es denominado estrés oxidativo. Si se presenta un estrés oxidativo poco severo, los tejidos generalmente responden haciendo un esfuerzo por elaborar defensas antioxidantes "extra"; sin embargo, un estrés oxidativo severo puede causar daño y muerte celular.²¹

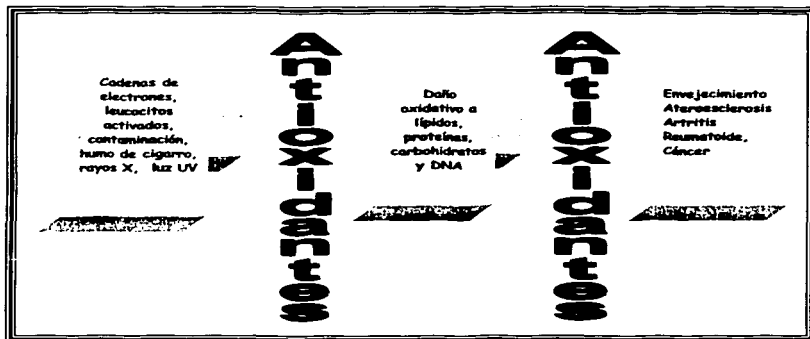


Figura 5. Radicales libres y antioxidantes.

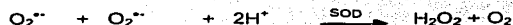
Fuente: Frei, 1994.¹⁵

Ante estos hechos, se ha promovido la ingestión de suplementos antioxidantes entre la población, lo cual, de acuerdo a algunos investigadores, tiene sólo un pequeño impacto sobre el tiempo de vida del ser humano. Sin embargo, lo que sí es muy claro, es que los mecanismos antioxidantes en un anciano enfermo se encuentran disminuidos, lo cual podría no interpretarse como un incremento en el daño celular mediado por radicales libres, sino que el organismo es menos capaz para enfrentarse a un incremento en la actividad de los radicales libres y a los efectos que éstos causan.⁸

III.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA.

En 1939 Mann y Keillin aislaron a partir de eritrocitos de bovino una proteína azul que contenía cobre, a la cual llamaron hemocupreína. Años más tarde, se caracterizó una proteína similar a partir de eritrocitos humanos, que entonces fue llamada eritrocupreína. Más adelante, proteínas similares fueron aisladas de otros tejidos de varios mamíferos, de cerebro humano:

cerebrocupreína, de hígado de caballo y bovino: hepatocupreína. Sin encontrarse actividad enzimática aparente en alguna de ellas. Fue hasta 1968, cuando Joe M. Mccord e Irwin Fridovich demostraron que la proteína contenida en los eritrocitos de bovino era una enzima que catalizaba la dismutación de los radicales superóxido, mediante la reacción:^{11,22}



Fue entonces denominada superóxido dismutasa, y descrita como enzima con un peso molecular de 34000 que contenía 2eq de cobre por mol de enzima, que éste podía ser removido de manera reversible, y que era necesario para llevar a cabo su actividad. Indicando también que podía encontrarse en varios tejidos en los mamíferos.^{11,22}

Más adelante, se estableció que los organismos anaerobios estrictos no exhiben actividad de superóxido dismutasa, ni de catalasa y que los organismos aerobios, que contienen sistemas de citocromos presentan actividad de ambas enzimas. Estos experimentos llevaron a demostrar que la función principal de la superóxido dismutasa es la protección de los organismos que metabolizan el oxígeno contra los efectos potencialmente tóxicos del radical superóxido que es un intermediario producido biológicamente resultante de la reducción univalente del oxígeno molecular.²³

Años más tarde, se descubrió que la superóxido dismutasa no sólo contenía cobre, el cual se encuentra en el sitio activo de la enzima sino que también contenía Zinc que funciona como estabilizador de la molécula, que está constituida por dos subunidades proteicas cada una de las cuales tiene sus propios átomos metálicos y denominándose entonces como CuZnSOD.¹¹

En 1973, se descubrió que *S. cerevisiae* contenía dos tipos de enzima que también se diferenciaban en su localización dentro de la levadura: una enzima que se encuentra en el citoplasma y es sensible al cianuro, fácilmente aislable que resultó ser la CuZnSOD; y la no-sensible a cianuro, encontrada dentro de la mitocondria y que contenía manganeso en su sitio activo, denominada MnSOD localizada específicamente en la matriz mitocondrial.²⁴

En 1982 se demostró la existencia de una superóxido dismutasa distinta de las anteriores, con un peso molecular de 135000 y compuesta por cuatro subunidades idénticas unidas de manera no covalente, con un átomo de cobre y zinc por cada subunidad, conteniendo además alguna cantidad de carbohidratos, siendo entonces denominada superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), por encontrarse en fluidos extracelulares; sin embargo, mantiene relación con la CuZnSOD, por tener los mismo átomos metálicos y ser sensible al cianuro.²⁵

Estudios realizados con mutantes deficientes de SOD evidencian que la enzima, dentro del sistema de defensa antioxidante, tiene una función fundamental que consiste en eliminar el radical superóxido antes de que éste reaccione con moléculas biológicas susceptibles u origine otros agentes tóxicos, ya que en condiciones normales, el peróxido formado a partir de la reacción de dismutación es eliminado por la catalasa o la glutatión peroxidasa.²⁶

Estudios con hepatocitos de rata demostraron que el 20% de los radicales superóxido formados en la mitocondria pueden pasar al citoplasma, mientras que el 80% restante es neutralizado por la enzima mitocondrial.²⁶

La enzima superóxido dismutasa se ha establecido como una molécula antioxidante que representa un papel muy importante en el metabolismo de los radicales libres, resaltando su importancia como enzima que participa en la regulación del envejecimiento y/o en la incidencia de enfermedades.²⁷

Existen diversos estudios que afirman los hechos anteriores, los cuales, se han clasificado de acuerdo a la naturaleza de los mismos en:

- γ Estudios de correlación
- γ Estudios genéticos

De acuerdo con la teoría del envejecimiento por radicales libres se han realizado estudios para obtener evidencia que soporte dicha teoría mediante la realización de estudios de correlación, en los que se relacione los niveles de SOD con la edad o el tiempo máximo de vida. Las hipótesis propuestas por estos estudios han sido que los niveles de SOD están correlacionados con el tiempo máximo de vida en algunas especies o que los niveles de SOD declinan con la edad en ciertas especies.²⁷

En este aspecto, Sohal et al (1990), reportan en estudios realizados con ratones y vacas, que existe una correlación entre los niveles de SOD y periodo máximo de vida ligeramente positiva en hígado, pero no en otros órganos como corazón o cerebro.²⁸ Lopez-Torres et al (1993), quienes concluyeron en su estudio con roedores, anfibios y aves, que no había relación alguna en los mismos aspectos del estudio anterior.²⁹ Cutler (1991), en cambio, encontró una correlación positiva para mamíferos tomando en cuenta la velocidad metabólica de los individuos, como oxígeno consumido por gramo de peso corporal por día.³⁰

Otros estudios, se han enfocado en encontrar correlación entre la restricción calórica, la cual se ha comprobado que prolonga el tiempo de vida en los roedores en un 40%, y los niveles de SOD, encontrando en algunos que dicha restricción previene el declive en la actividad de la enzima a través del tiempo, sin embargo en otros no se observó efecto alguno.²⁷

Por otro lado, la correlación entre la SOD con la edad aún no se aclara del todo, puesto que los estudios realizados tienen tal discrepancia que no permiten obtener algún esbozo como conclusión.²⁷

Por su parte, los estudios genéticos han tratado de encontrar la importancia de la enzima disminuyendo o aumentando la expresión genética de la misma esperando, por un lado, que los mutantes que tienen una baja expresión de la enzima serían no viables o con un periodo de vida muy corto, experimentando patologías prematuras; y por el lado contrario, la sobreexpresión de la enzima incrementaría el promedio de vida. Sin embargo, los resultados no han sido homogéneos.²⁷

Johnson describió un mutante del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (llamado age-1) el cual vive 65% más que la forma salvaje del gusano. El gen para age-1 ha sido mapeado y ubicado en el cromosoma II y está íntimamente relacionado con el gen que codifica para CU-ZnSOD (sod-1). Aunque los genes age-1 y sod-1 no son idénticos, la mutación en el age-1 lleva a un incremento en la actividad de la Cu-ZnSOD, el cual se inicia aproximadamente a los 10 días de vida del gusano y continúa hasta que éste muere entre los 25-30 días de vida, mientras que la forma salvaje del gusano sólo vive 15-20 días. Del mismo modo, se observó un incremento en la actividad de la catalasa en el organismo mutante. Estos resultados sugieren que el incremento en la actividad de SOD y catalasa puede ser responsable en el incremento del tiempo de vida para el mutante.³¹

En otro estudio, Rose crió progenies longevas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, gracias a la capacidad de las moscas hembra de reproducirse en etapas tardías de la vida. Esta estrategia produjo nueva progenie que vivía un periodo más largo que la población original. El tiempo máximo de vida variaba no sólo junto con el incremento en la resistencia a varios tipos de estrés, sino con un incremento en la expresión de una forma más activa de SOD. La

conclusión de este estudio indica que la expresión alterada en los alelos de SOD puede llevar a un aumento de por lo menos 5% en el tiempo de vida máximo para estas moscas.³²

Mockett y su equipo obtuvieron *Drosophila melanogaster* transgénica con sobreexpresión de MnSOD, encontrando que el aumento en la actividad de esta enzima no disminuye la velocidad de envejecimiento y que existe un óptimo nivel en la actividad el cual es capaz de minimizar el daño por estrés oxidativo, y sólo se tendrá éxito cuando dicha actividad esté aumentada, si va acompañada por el aumento de otras enzimas antioxidantes.³³

Del mismo modo, Charles Epstein y cols. (1992), obtuvieron ratones transgénicos con actividad de la enzima CuZnSOD aumentada desde 1.5 hasta 7 veces por encima de la normal, encontrando que tal aumento en la actividad incrementaba la capacidad de los cerebros de los roedores a resistir episodios agudos de estrés oxidativo.²⁷ Al respecto, Wispe(1992) produjo ratones transgénicos con sobreexpresión de MnSOD humana en las mitocondrias de las células epitelio distal pulmonar, con un aumento del 60%, contra un grupo no transgénico, encontrándose que, cuando se expusieron a una atmósfera con un 95% de oxígeno, los animales transgénicos sobrevivieron dos veces más que los ratones control y exhibieron menor índice en patologías pulmonares.³⁴

La sobreexpresión de la CuZnSOD por transfección en líneas celulares ha arrojado resultados confusos, lo cual podría radicar en la naturaleza de los cultivos celulares. Sin embargo, intentando generalizar los resultados, el incremento aislado de CuZnSOD aumenta la lipoperoxidación y el daño al ADN, induce la actividad de la GSH-Px, reprime a MnSOD y no induce cambio alguno en la catalasa.^{27, 35}

La expresión anormal de SOD ha sido asociada a dos enfermedades de tipo genético. La primera, el Síndrome de Down, en la cual una copia extra del cromosoma 21, o parte del mismo, está presente. La expresión de CuZnSOD está localizada en el cromosoma 21, y la actividad de la enzima se encuentra elevada en un 50% en las células de individuos con tal padecimiento, hecho que posiblemente conlleva a un aumento en la peroxidación lipídica, lo cual pudiera contribuir a la aparición de los síntomas clínicos asociados a la enfermedad, debido a que no existe un equilibrio entre los sistemas enzimáticos antioxidantes, tales como catalasa y/o glutatión peroxidasa.^{27, 36}

La otra enfermedad recientemente asociada con la expresión alterada del gen de la CuZnSOD es la esclerosis lateral amiotrófica, un desorden autosómico dominante dependiente de la edad de las neuronas motoras de la corteza, dado que de acuerdo a algunos autores que han mapeado el cromosoma 21, se ha demostrado que esta enfermedad está ligada a mutaciones puntuales en el gen de la CuZnSOD. En estudios realizados sobre 23 familias se encontró que la actividad de esta enzima en los eritrocitos se encuentra reducida en un 50% de los niveles normales. Estudiando estas mutaciones, se han encontrado 12 de ellas, las cuales en su mayoría se encuentran en regiones que afectan el control de las estructuras terciaria y cuaternaria de la enzima. En este campo se ha encontrado que las células mutantes conservan un 40% de la actividad normal, lo que sugiere que las formas mutantes de la enzima poseen una actividad parcial. La importancia de la actividad disminuida de la CuZnSOD puede ser debida a la acumulación del ión superóxido en las neuronas motoras, el cual reacciona con el óxido nítrico para formar peroxinitrilo, lo cual origina cambios irreversibles en proteínas; y la dependencia con la edad pudiera explicarse como una pérdida de las neuronas motoras a través del tiempo hasta niveles muy bajos debido al daño oxidativo causado por la acción del peroxinitrilo sobre muchas proteínas.²⁷

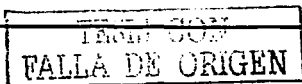
El ión superóxido es producido en todas las células, específicamente de manera abundante en la mitocondria, por lo cual es posible asumir que todos los tejidos están bajo amenaza constante de estrés oxidativo. Cuando este daño es excesivo debido al consumo inadecuado de antioxidantes en la dieta, o actividades de enzimas antioxidantes inadecuadas, se presentan niveles patológicos de daño oxidativo, generalmente presentes en personas en edad avanzada.²⁷

Otras enfermedades relacionadas son cataratas, cáncer y enfermedades cardiovasculares. Se han realizado investigaciones utilizando terapia antioxidante como protección contra estas enfermedades y otros estados patológicos, encontrándose que la SOD endógena juega un papel importante en la prevención de estas condiciones patológicas.³⁷

Church (1993) ha demostrado que la sobreexpresión de la Mn-SOD puede suprimir carcinógenos en líneas celulares de melanomas; tanto una sola copia extra en el cromosoma 6, que es el que codifica para Mn-SOD, o abundantes copias del mismo revierten totalmente el fenotipo transformado en melanomas humanos.³⁸

Estos estudios sugieren la posibilidad de que la SOD mitocondrial juegue un papel importante en la carcinogénesis en células no transformadas debido a que atenúa la promoción del tumor debido a especies reactivas de oxígeno. Esto es consistente con la observación de que la porción del cromosoma 6 en el que se encuentra el gen para MnSOD es frecuentemente perdido en melanomas humanos malignos.³⁹

Por otro lado, Nakazono (1991) ha implicado a la CuZnSOD en la prevención de hipertensión, mediante un estudio en el que la presión arterial de ratas hipertensas fue sustancialmente reducida por la administración intravenosa



de SOD ligada a otra proteína la cual fue tomada por las células endoteliales vasculares.⁴⁰ Esta última es la EC-SOD, pues de acuerdo a Adachi y cols (2000), más del 99% de la cantidad de esta enzima presente en los espacios extracelulares está ligada a proteoglicanos de heparansulfato en las paredes de los vasos, y sus niveles bajos están relacionados con la presencia de riesgos en el sistema cardiovascular.⁴¹

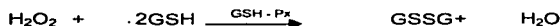
III.4 GLUTATION PEROXIDASA

La enzima glutatión peroxidasa (GSH -Px) fue descubierta en tejidos animales en 1957 por G. C. Mills en Estados Unidos.⁴²

En 1973 se observó la presencia de Selenio en esta proteína en cantidades estequiométricas, dando el adjetivo de selenoenzima a la glutatión peroxidasa, esto explicaba las condiciones patológicas presentadas en la deficiencia de selenio, las cuales estaban relacionadas con la peroxidación de lípidos insaturados, estableciendo entonces que la función antioxidante del selenio dietario es debida a su función como componente integral de la glutatión peroxidasa.⁴³

Su sustrato es el compuesto de bajo peso molecular llamado glutatión. Esta enzima cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno utilizando glutatión reducido como sustrato, de acuerdo a la siguiente reacción:

11.44



Está formada por cuatro subunidades protéicas, cada una de las cuales contiene un átomo de selenio en su sitio activo, formando una selenocisteína, en donde el átomo de azufre de la cisteína es reemplazado por el átomo de selenio y el gen para su codificación se encuentra en el cromosoma 6. El mecanismo de

acción muestra que el GSH reduce al selenio y la forma reducida de la enzima reacciona con el peróxido de hidrógeno o con los peróxidos lipídicos. El selenio presente en la enzima, es uno de los elementos traza que el organismo adquiere por medio de la dieta, así que varios de los síntomas por deficiencia de selenio pueden ser resultado de la disminución en la enzima.¹¹

Existen varias formas de esta enzima:⁴⁴

- ❖ No selenio dependientes, que son isoenzimas de la glutatión-S-transferasas y no utilizan peróxido de hidrógeno ni terbutilhidroperóxido como sustratos.
- ❖ Cuatro tipos de GSH-Px selenio dependientes:
 - GSH-Px 1 o cGSH-Px. Enzima celular o citoplasmática.
 - GSH-Px 2 o pGSH-GPx. Enzima extracelular principalmente localizada en plasma.
 - GSH-Px² o PHGSH-Px. Enzima específica para hidroperóxidos fosfolipídicos.
 - GSH-Px³ o GI-GPx. Enzima gastrointestinal.

La glutatión peroxidasa citoplasmática cGSH-Px es una enzima tetramérica con cuatro subunidades idénticas de 22Kda cada una con un átomo de selenio en su sitio activo. El contenido de selenio como parte de esta enzima, representa el 57% del contenido total de este elemento en la célula roja. Entre el 60-75% de la actividad total de las enzimas está a cargo de esta enzima, del cual el 25% está concentrado en la mitocondria.^{45, 46} Es capaz de reducir peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos, pero no hidroperóxidos fosfolipídicos.⁴⁷

Esta enzima, es dependiente de Se, por lo que los niveles de ésta se reduce en más de 10% cuando la ingesta de selenio no es adecuada, observando que la regulación de la expresión se da al nivel de mRNA, ya que la selenocisteína es codificada por un codón de terminación (UGA) en el mRNA de la enzima. Este codón es reconocido por un tRNA especial, el cual es primero cargado con una

serina, la cual es convertida a selenocisteína. Este selenoaminoácido es incorporado cotranslacionalmente dentro del polipéptido en las cadenas de las subunidades; la deficiencia de selenio *in vivo* e *in vitro* lleva a una dramática disminución en la actividad de la enzima, siendo hasta un 30%.^{44,45}

Particularmente, altos niveles de esta enzima son generalmente encontrados en tejidos con una alta producción de peróxido de hidrógeno, tales como: eritrocitos, hígado, riñón y pulmón. En ratas, los niveles más bajos se encontraron en testículos.⁴⁸

Su efecto para contrarrestar los eventos modulados por hidroperóxidos se ha puesto de manifiesto en diferentes maneras:

a. Señalización celular por citocinas:

En algunos estudios se ha demostrado que la cGPx puede proteger a las células endoteliales de alteraciones inducidas por los neutrófilos, inhibiendo la adhesión de éstos a las células endoteliales, la cual, es uno de los pasos importantes durante las respuestas de tipo inflamatorio al inhibir la inducción de la adhesión por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).^{48,49}

b. Apoptosis:

La apoptosis o muerte programada, elimina las células tanto no necesarias como dañadas, y juega un papel muy importante durante el desarrollo embrionario, la formación de órganos, la carcinogénesis y el sistema de defensa; de manera ideal, es un evento benéfico. La apoptosis puede ser inducida en las células T por el antígeno Fas o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) cuando especies reactivas de oxígeno activan a ambos. Debido a que éstos son suficientes para disparar el proceso de muerte celular, han sido denominados marcadores del proceso de apoptosis. Se ha observado que la actividad de la cGPx, aumentada por sobreexpresión o por suplementación alimenticia inhibe la apoptosis inducida por hidroperóxidos. Del mismo modo, también inhibe la

apoptosis bajo condiciones en que las especies reactivas de oxígeno se mantienen en niveles muy bajos de los detectables de manera experimental, pero no por ello, dejan de producir sus efectos dañinos.^{48, 50}

c. Infección de HIV (virus de inmunodeficiencia humana)

En las células infectadas por el virus, se observa una disminución en la actividad de la enzima la cual ha sido correlacionada con el aumento en la sensibilidad de dichas células hacia los hidroperóxidos. La deficiencia antioxidante puede predisponer a las células infectadas a la apoptosis inducida por oxidación, y finalmente, llevar a la pérdida de las importante células T, como típicamente se observa en pacientes infectados, por lo que una suplementación antioxidante en tales pacientes podría ser de gran ayuda.⁴⁸

La glutatión peroxidasa plasmática (pGSH-Px) es una enzima tetramérica con peso molecular de aproximadamente 100000 daltons, cuyas subunidades pesan alrededor de 23000 daltons y contiene cuatro átomos de selenio: el 47% del contenido de selenio en el plasma humano, corresponde precisamente a la presencia de este átomo como parte estructural de la enzima.⁴⁶ Además, esta enzima no sólo es capaz de utilizar glutatión como sustrato, cuya concentración en plasma es sólo de aproximadamente 30 μ M, sino también emplea tioredoxina y glutaredoxina.⁴⁸

La fuente principal de esta enzima es el riñón, donde es producida por las células parietales de la cápsula de Bowman y liberada al torrente sanguíneo, y es también este órgano en el que el contenido de RNAm tiene su nivel más alto; en menor cantidad es posible también encontrarla en hígado, músculo esquelético, páncreas, cerebro, pulmón, corazón, el epitelio ciliar del ojo, las células del epitelio absorbivo de maduración en el intestino, epidídimo, placenta y glándulas mamarias. A partir del sitio de síntesis es secretada al ambiente extracelular, siendo incluso encontrada en la leche materna, líquido amniótico, lavado

pulmonar, y, aunque también es secretada en el epidídimo, no se encuentra en el lumen de los vasos deferentes.⁴⁸

La presencia de esta enzima en casi todos los "puntos fronterizos" del cuerpo humano hace notar su función como barrera para la transferencia de cualquier hidroperóxido, así mismo, regula la concentración extracelular de los mismos.⁴⁸ Puede reaccionar tanto con peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos, como con hidroperóxidos fosfolipídicos, excepto hidroperóxido de colesterol. Esta reactividad adicional sólo se ve impedida cuando estos hidroperóxidos son atrapados por lipoproteínas, a las cuales la enzima no puede acceder.^{47,50}

La PHGSH-Px es una enzima monomérica con un peso de 20000, con un sitio activo de selenocisteína, tiene una relativamente alta afinidad a la membrana celular de carácter hidrofóbico, carece totalmente de afinidad al glutatión para ser utilizado como sustrato, pero una amplia afinidad por los hidroperóxidos, incluidos los hidroperóxidos fosfolipídicos, hidroperóxidos de colesterol, pero no con peróxido de hidrógeno o terbutilhidroperóxido como sustratos.^{50,51,53}

Fue descubierta como un factor preventivo a la peroxidación lipídica, y considerada como la glutatión peroxidasa encargada de la protección de las membranas celulares y subcelulares contra el estrés oxidativo.^{48,53}

Una de las peculiaridades de esta enzima, es su inusual distribución en los tejidos, pues generalmente se encuentra más baja que la cGPx en todos los órganos, con excepción de los testículos, en donde se observa la mayor actividad.⁴⁸

Sus principales funciones se han hecho evidentes a través de diferentes procesos, tales como:

- a. Maduración sexual.

La canalización preferencial del selenio hacia la PHGPx en el aparato reproductor y los órganos del sistema endocrino, no sólo tiene funciones antioxidantes, sino también juega un papel importante en la regulación del estado redox, maduración sexual y diferenciación. Su prevalencia en los testículos sugiere un papel en la fertilidad masculina, siendo su presencia como una estructura proteica enzimáticamente inactiva en el collar mitocondrial del espermatozoide, una pregunta aún sin respuesta.⁴⁸

Mucho se han enfocado los estudios sobre esta enzima hacia la capacidad que tiene para reducir los hidroperóxidos de fosfolípidos, que no se ha valorado la importancia de su habilidad para utilizar no el glutatión como sustrato, sino otro tipo de proteínas conteniendo grupos tiol. De acuerdo a esta capacidad, se ha demostrado que la PHGPx oxida las protaminas liberadas durante la estancia del espermatozoide en el epidídimo, en presencia de hidroperóxidos, el cual se ha calificado como un evento necesario para la condensación de la cromatina durante el tránsito del espermatozoide a través del epidídimo y su proceso de maduración.⁴⁸

b. Ateroesclerosis

La aterogénesis pertenece al grupo de procesos patológicos relacionados con el estrés oxidativo. El conocimiento actual sobre la aterogénesis está basado en 2 teorías:^{48, 52} la teoría de la respuesta al daño, la cual explica que la aterogénesis es un proceso activo iniciado por lesiones endoteliales seguidas por la adhesión de monocitos y macrófagos, activación de células T y proliferación de las células del músculo liso. Y la teoría de infiltración de lípidos, la cual se basa en la importancia de la elevación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales son oxidadas y absorbidas por los macrófagos y las células del músculo liso, resultando en la formación de células espumosas y finalmente *fatty streaks*.⁴⁸

Las LDL oxidadas, pueden entonces ser consideradas como iniciadoras y propagadoras de la cadena de eventos patológicos que finalmente llevan a la aterosclerosis. La oxidación de las LDL es un proceso complejo, que varía de acuerdo al modo de oxidación y composición de la LDL, y afecta tanto a la parte protéica como a la parte lipídica de la partícula. Entre otros mecanismos, la lipoxigenasa, en especial la 15-lipoxigenasa, puede generar hidroperóxidos lipídicos dentro de las LDL, los cuales pueden actuar como puntos de cristalización para lipoperoxidaciones posteriores. En este aspecto, la GPX, en especial cGPx y PHGPx, pueden actuar sobre las LDL oxidadas que se han infiltrado, con el objeto de contrarrestar los eventos antes mencionados. ^{48, 55}

c. Espermatogénesis.

Los testículos retienen el selenio con prioridad en estados deficientes del elemento. En ratas, después de la inyección de Se como óxido de selenio, éste aparece rápidamente, en el lapso de un día, en sangre, hígado, músculo, riñón, bazo y pulmón. En dos días, fue requerido para obtener su concentración máxima en cerebro y timo. En contraste, la incorporación de selenio en testículos fue observada 2-3 semanas después de la inyección. Por lo tanto, cerca del 40% del selenio acumulado, se encuentra en epidídimo y testículos. Dentro de la estructura espermática, la presencia de selenio se concentra en la parte media del espermatozoide, encontrando que en estados de deficiencia de selenio, la parte media del espermatozoide, que contiene el anillo mitocondrial rodeado por una cápsula, muestra morfología alterada y estructuras aparentemente rotas. Tales espermatozoides tienen motilidad deteriorada, y finalmente pierden las colas resultando en la completa inmovilidad del espermatozoide. ⁴⁸

Como se ha dicho anteriormente, la PHGPx pertenece a las moléculas de respuesta tardía a la deficiencia de selenio y es preferencialmente expresada en testículos. Su distribución en estos órganos involucra el citoplasma y organelos celulares, de los cuales, la principal fuente de enzima es la membrana

mitocondrial y ácidos nucleicos, en estos últimos se encuentra ligado a la cromatina por medio de interacciones electrostáticas. ⁴⁸

De manera interesante, se ha probado que esta enzima no se expresa, sino hasta después de la pubertad; mientras que en estados de hipofisectomía, la expresión de la enzima se encuentra completamente abatida, en un proceso que es totalmente revertido por la administración de gonadotropinas, aunque la expresión de la misma no se ve afectada por la administración de hormonas. Sin embargo, se observa una alta transcripción dentro de las espermátidas, la cual es regulada por la testosterona secretada por las células de Leydig, pero en espermatozoides maduros, no es posible detectar mRNA o actividad de PHGPx, aunque se ha revelado que la enzima permanece sólo como estructura proteica inactiva fuertemente ligada a la cápsula mitocondrial. Todos estos hechos, podrían explicar el severo daño que los espermatozoides sufren en deficiencias de selenio y la importancia del elemento en la fertilidad masculina. ⁴⁸

La enzima glutatión peroxidasa gastrointestinal (GI-GSH-Px) es una proteína tetramérica compuesta por monómeros de 22Kda. Tiene una relativamente más alta afinidad hacia hidroperóxidos orgánicos que hacia peróxido de hidrógeno. Se asume que su expresión en los tejidos del tracto gastrointestinal, se debe principalmente a la presencia de hidroperóxidos orgánicos provenientes de la dieta. ⁵⁶

La expresión de esta enzima, parece estar restringida al epitelio del tracto gastrointestinal en ratas, aunque en humanos, ésta se ha encontrado también en hígado, con lo que puede observarse que en este órgano se expresan los cuatro tipos de glutatión peroxidasa. ⁴⁸

La inusual distribución tisular de la enzima, lleva a la hipótesis de que representa la primer barrera de defensa contra los peróxidos lipídicos ingeridos, la

cual es apoyada por varios datos encontrados por diferentes investigadores, tales como el que GSH disminuye la cantidad de hidroperóxidos transportados desde la luz intestinal hacia la linfa.⁴⁸

Otros investigadores, han sugerido un papel de la enzima como protector contra el cáncer de colon, con lo cual se da la pauta para la investigación de la enzima en este sentido, que pudiera estar relacionado en la protección hacia varios procesos malignos nivel del tracto gastrointestinal.⁴⁸

En general, la biosíntesis de las selenoproteínas depende de la disponibilidad del selenio, regularmente, el selenio es utilizado para tal síntesis, sólo cuando se encuentran niveles óptimos del mismo. En concentraciones limitadas, el selenio es canalizado de manera preferente hacia la síntesis de algunas proteínas, mientras que las otras se ven reducidas en su suplemento del elemento. Por lo tanto, algunas selenoproteínas responden más rápido a la deficiencia de selenio con una pérdida en su actividad, otras permanecen estables en deficiencias moderadas del metal y sólo decrece su actividad si la deficiencia del elemento es sustancial y prolongada. Se observa entonces que algunas proteínas responden lentamente a una privación de selenio y son restauradas rápidamente después de la suplementación.^{42, 48}

Este fenómeno también se presenta entre los cuatro tipos de GSH-Px, estableciendo entonces "jerarquías" entre ellas. Las enzimas de lenta respuesta a la deficiencia de selenio tendrán entonces una jerarquía alta, lo cual significaría que juegan un papel fisiológico más importante que las de respuesta rápida. De acuerdo a estudios realizados, se observa que la jerarquía se presenta de la siguiente manera:⁴⁸



Por otro lado, pacientes con necesidad de alimentación parenteral, en cuyas fórmulas los niveles de selenio no se ajusten de manera adecuada, presentan una disminución en la actividad de la enzima.⁵⁷

De la misma manera, se observa una disminución en los niveles enzimáticos de GSH-Px después de un infarto al miocardio, debido a que los niveles de GSH disminuyen, y la enzima se ve directamente afectada.⁵⁸

III.5 ANTIOXIDANTES TOTALES.

Como se ha descrito anteriormente, los organismos vivos han desarrollado una barrera antioxidante para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno que son tan dañinas para la vida. Antioxidantes no enzimáticos tales como albúmina, glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina y flavonoides, constituyen un aspecto importante de dicha barrera antioxidante. La medición de estos antioxidantes, se establece como una necesidad para evaluar el estado antioxidante *in vivo*. Sin embargo, la cantidad de moléculas antioxidantes presentes en plasma, suero, orina y otras muestras biológicas, hacen difícil su medición por separado, pues las posibles interacciones entre ellos pueden hacer que la medición de algunos de manera individual arroje un resultado poco representativo si éste pretende representar el estado antioxidante en general, por lo que se establece la medición del estado antioxidante total como la forma más confiable para obtener resultados con información clínica confiable.^{59,60}

Muchos métodos se han desarrollado para medir la capacidad antioxidante total de una muestra biológica por inhibición de una especie reactiva involucrada. Algunos de ellos son:⁵⁶

> ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) Este método utiliza un sustrato proteínico como sustancia oxidable, un sistema generador de radicales

peroxilo o hidroxilo. Se ha utilizado para obtener resultados de la capacidad antioxidante de varias muestras biológicas a partir de compuestos antioxidantes puros tales como melatonina, dopamina, flavonoides.

➤ FRAP (Ferric reducing ability of plasma) Este método depende de la reducción de un complejo férrico a ferroso por un agente reductor a pH bajo, pero tiene el inconveniente de no incluir a aquellos antioxidantes que no son capaces de reducir el complejo férrico, como el glutatión.

➤ TRAP (Total radical trapping parameter) Este método incluye radicales peroxilo generados a partir del compuesto AAPH (dicloruro de (2,2'-azobis)2-amidinopropanona) y materiales peroxidables contenidos en el plasma.

➤ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) Este método reportado inicialmente por Miller y modificado por Re, está basado en la inhibición de la absorción del catión ABTS⁺ (2,2'-azino-di-(3-etilbezotiazolín sulfonato)). Este método mide la capacidad de un compuesto para reducir el ABTS⁺, los compuestos antioxidantes incluidos son: ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión, ácido úrico. El uso de este método ha permitido encontrar que la capacidad antioxidante total se encuentra aumentada en pacientes con infarto agudo al miocardio y disminuida en infantes prematuros.^{59, 61}

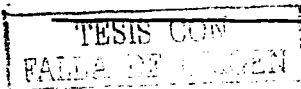
IV. PROBLEMA

Es sabido que el envejecimiento es resultado del paso del tiempo, sin embargo, cada vez es más evidente que el nivel y tipo de vida, así como factores ambientales y alimenticios tienen una gran influencia sobre dicho proceso.

En los últimos años se ha demostrado que el estrés oxidativo (Eox) se encuentra involucrado en la fisiopatología de enfermedades crónico degenerativas como Diabetes Mellitus e Hipertensión arterial, así como en el envejecimiento celular. En este sentido el Eox es un proceso que se encuentra relacionado con la edad, ya que a medida que el organismo envejece el sistema antioxidante comienza a fallar y esto provoca un aumento de radicales libres, que trae como consecuencia daños irreversibles a nivel celular, sin embargo esto no es del todo concluyente por lo que es conveniente realizar investigaciones que permitan identificar la relación entre los niveles de lipoperóxidos y el sistema enzimático antioxidantes y los padecimientos crónico-degenerativos en los adultos mayores.

Por tal motivo es importante conocer los niveles lipoperóxidos y los niveles de antioxidantes presentes en adultos mayores sanos y en los que presenten enfermedades crónico degenerativas, como Diabetes Mellitus e Hipertensión Arterial, para poder establecer el impacto de los factores anteriores en esa población. Dados tales hechos, se hacen las siguientes preguntas:

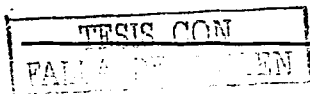
- ¿Existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de lipoperóxidos en una población de ancianos sanos y con enfermedades crónico degenerativas, como Diabetes Mellitus e Hipertensión Arterial?
- ¿Existen diferencias estadísticamente significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa y la concentración sérica de antioxidantes totales en una población de ancianos sanos y con enfermedades crónico degenerativas, como Diabetes Mellitus e Hipertensión Arterial?



V. HIPOTESIS

- ✓ Considerando que en el proceso normal de envejecimiento se producen radicales libres normalmente, mismos que aumentarán en los adultos mayores que presenten alguna enfermedad crónico-degenerativa, como diabetes mellitus o hipertensión arterial, suponemos que los ancianos con padecimientos crónicos presentarán concentraciones de lipoperóxidos significativamente superiores con respecto a los sanos.

- ✓ Dado que la función de los antioxidantes es la eliminación y/o control de los radicales libres producidos en el organismo, suponemos que, la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, así como los niveles de antioxidantes totales se encontrarán disminuidos en los ancianos con padecimientos crónicos, como diabetes mellitus o hipertensión arterial, con respecto a los ancianos sanos.



VI. OBJETIVOS

- Evaluar la concentración de lipoperóxidos de una población de adultos mayores sanos y con enfermedad crónica de la Ciudad de México.
- Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, y la concentración de antioxidantes totales de una población de adultos mayores sanos y con enfermedad crónica de la Ciudad de México.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

VII.1 POBLACIÓN Y DISEÑO

➤ Se llevó a cabo un estudio analítico de tipo prolectivo, transversal y comparativo en una muestra de 128 adultos mayores (≥ 60 años) residentes de la ciudad de México en los últimos 5 años o más. 61 adultos mayores clínicamente sanos desde el punto de vista gerontológico (sin padecimientos crónicos agudizados y con funcionalidad física y mental adecuada para su edad, para su sexo y su participación social en actividades socioculturales); 16 adultos mayores con diabetes mellitus, 42 con hipertensión arterial y 9 con ambas patologías crónico-degenerativas.

VII.2 VARIABLES

VII.2.1 Independientes

- Edad: Tiempo cronológico transcurrido desde el nacimiento hasta la captación del sujeto en estudio.
 - ❖ Años Cumplidos: Adultos mayores: más de 60 años.
- Sexo: Características fenotípicas que caracterizan al ser humano.
 - ❖ Masculino, femenino
- Enfermedad:
 - ❖ Diabetes Mellitus
 - ❖ Hipertensión arterial

VII.2.2 Dependientes

- Peroxidación lipídica. Medición directa de daño por radicales libres.
Lipoperóxidos.
0.195 – 0.400 $\mu\text{mol/L}$

- SOD: Enzima antioxidante capaz de dismutar el radical superóxido.
Niveles eritrocitarios de la enzima.
178 – 190 UI / L

- GSH-Px: Enzima antioxidante encaminada a la eliminación de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos.
Niveles plasmáticos de la enzima.
8000 - 9800 UI / L

- Antioxidante totales. Niveles plasmáticos del grupo de moléculas incluidos en este grupo de acuerdo al método de medición.
1.19 – 1.54 mmol / L

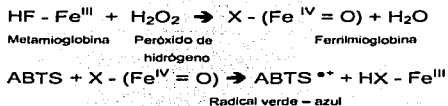
VII.3 Procedimiento.

A todos los adultos mayores se les tomó una muestra sanguínea en ayuno de 8h entre 7-9 am. A la muestra se le determinaron biometría hemática, química sanguínea de 4 elementos y perfil lipídico. Además se les realizó una historia clínica para establecer su estado patológico.

Estado de los Antioxidantes totales.

ABTS⁺ [2,2'- azino - di - (3 - etilbenzotiazolin sulfonato)] se incubó con peroxidasa (metamioglobina) y H₂O₂ para dar el radical cation ABTS⁺. Este radical

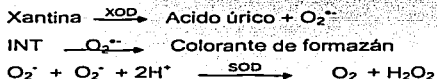
presenta una coloración verde - azulada relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de este color, siendo esta supresión proporcional a la concentración de antioxidantes.



Superóxido dismutasa.

La función de la SOD es acelerar la dismutación del radical tóxico superóxido, producido durante un proceso oxidativo en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

Este método emplea Xantina y Xantina oxidasa (XOX) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2 - (4 - yodofenil)-3-(4-nitrofenol) -5- feniltetrazolio (INT) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la SOD por el grado de inhibición de esta reacción a 505 nm.



Glutation peroxidasa.

El método está basado en el trabajo de Paglia y Valentine, donde la glutatión peroxidasa cataliza la reacción de glutatión en presencia de hidróxido de cumeno. El glutatión oxidado en presencia de glutatión reductasa y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm.



Peroxidación lipídica.

La muestra para esta prueba fue colectada en un tubo heparinizado, centrifugada a 3000rpm/5min; el plasma fue separado y se le adicionaron 10µL butilhidroxitolueno (BHT) 2mM. Posteriormente 400µL del plasma se mezclaron con 50µL de BHT 12.6mM y 400µL de ácido ortofosfórico 0.2M. Se mezcló en vortex durante 10 s. Se adicionaron 50µL de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0.11M/L y se mezcló con vortex nuevamente. Esta mezcla de reacción se colocó en un baño de agua a 90°C en un tubo tapado durante 45min. Posteriormente se enfrió en hielo y se agregaron 1000µL de n-butanol y 100µL de solución saturada de cloruro de sodio. Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 30 s. Posteriormente due centrifugada a 5000rpm durante 1 min. 500µL de la fase de n-butanol fueron transferidos a una celda y leídos a 535nm y a 572 nm para corrección de la absorción.

VII.4 DISEÑO ESTADÍSTICO

Los datos fueron descritos a través de promedios \pm DE y frecuencias y analizados a través de las pruebas χ^2 al 95%, t de student al 95%, ANOVA y razón de momios con su respectivo intervalo de confianza. Para tal efecto se utilizaron los paquetes estadísticos Epi-info 6.0 y SPSS 10.0.

Prueba χ^2

$$\chi^2 = \frac{\sum(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Con $K-r$ grados de libertad

Donde:

O_i = frecuencia observada

E_i = frecuencia esperada

K = número de eventos o categorías

r = número de restricciones

Prueba "t" de student

$$t = \frac{x - y}{\sqrt{\frac{s^2_1}{n_1} + \frac{s^2_2}{n_2}}}$$

Donde:

x = promedio muestral II

y = promedio muestral I

s^2_1 = varianza muestral I

s^2_2 = varianza muestral II

n_1 = número de elementos muestra I

n_2 = número de elementos muestra II

Análisis de varianza o ANOVA

$$X_{ij} = \mu + a_{ij} + e_{ij}$$

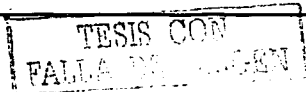
Donde:

X_{ij} = observación de una persona en un grupo

μ = la gran media del grupo

a_{ij} = diferencia entre la media del grupo y la gran media

e_{ij} = diferencia entre la observación individual y la media del grupo.



Razón de momios

Factor de evaluación

Presente

A

B

Ausente

C

D

A	B
C	D

$$RM = (A)(D) / (C)(B)$$

$$\text{Intervalo de confianza (95\%)} = \exp \left[\ln RPC \pm 1.96 \sqrt{1/A + 1/B + 1/C + 1/D} \right]$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. RESULTADOS

1. Edad

La edad promedio para los sanos fue de 67.4 ± 6.1 años mientras que para los enfermos fue de 67.3 ± 7.1 años. (Cuadro 4)

Asimismo, la edad promedio en relación con el tipo de enfermedad fue de 66.0 ± 5.0 años para diabetes mellitus, 64.9 ± 4.7 años para diabetes mellitus + hipertensión arterial y 68.3 ± 8.0 años para el grupo de hipertensión arterial, sin que entre ellos se observara diferencia. (Cuadro 5)

2. Sanos y enfermos

Se observó que los niveles promedio de antioxidantes totales para el grupo de sanos (1.17 ± 0.23 mmol/L) fueron más altos que los observados para el grupo de enfermos (1.12 ± 0.19 mmol/L), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p=0.037$). (Cuadro 4)

Del mismo modo, la actividad promedio de superóxido dismutasa se encontró más alta en el grupo de sanos (172.6 ± 16.7 UI/L) que en el grupo de enfermos (170.2 ± 15.5 UI/L), observándose una tendencia a la disminución en los enfermos, pero no fue estadísticamente significativa. (Cuadro 4)

La actividad promedio de glutatión peroxidasa fue más baja en el grupo de sanos (6738 ± 2187 UI/L) que en el grupo de enfermos (7051 ± 2112 UI/L), con una tendencia al aumento en el grupo de enfermos. (Cuadro 4)

Los niveles de lipoperóxidos fueron más bajos para los sanos (0.33 ± 0.13 mmol/L) que para los enfermos (0.38 ± 0.16 mmol/L). (Cuadro 4)



3. Tipo de enfermedad.

Dividiendo a la población respecto al tipo de enfermedad presentada, se encontró que el grupo de sanos presenta los niveles de antioxidantes totales más altos (1.17 ± 0.23 mmol/L), al cual sigue el grupo de hipertensión arterial (1.15 ± 0.020 mmol/L), mientras que los niveles más bajos los presentó el grupo de diabetes mellitus (1.06 ± 0.18 mmol/L), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre éste y el grupo de los sanos ($p=0.08$). (Cuadro 5)

Las actividades promedio de superóxido dismutasa se encontraron similares entre los grupos de sanos, diabetes mellitus + hipertensión arterial e hipertensión arterial, sin embargo, se observó que el grupo de diabetes mellitus presentó la actividad promedio más baja (166 ± 12 UI/L), sin que se presentaran diferencias significativas entre algún grupo. (Cuadro 5)

La enzima glutatión peroxidasa presentó actividades parecidas en los grupos de sanos y diabetes mellitus, el grupo de diabetes mellitus + hipertensión presentó la actividad promedio más baja (5940 ± 2698 UI/L), mientras que el grupo de hipertensión arterial presentó la actividad promedio más alta de los cuatro (7442 ± 2012 UI/L); este grupo presentó diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de sanos ($p=0.1$) (Cuadro 5).

Los niveles de lipoperóxidos se observaron muy parecidos entre los grupos de sanos, diabetes mellitus + hipertensión e hipertensión arterial, mientras que el grupo de diabetes mellitus presentó los niveles más altos (0.45 ± 0.16 mmol/L), presentando diferencia estadísticamente significativa entre éste y el grupo de sanos ($p=0.019$) (Cuadro 5).

4. Sanos, enfermos y edad.

Observando los niveles promedio de antioxidantes totales entre sanos y enfermos, pero tomando en cuenta la edad, se encontró que el grupo de sanos entre 60-69 años tienen los niveles promedio más altos de antioxidantes totales (1.22 ± 0.23 mmol/L), observándose una diferencia estadísticamente significativa entre este grupo y el de los enfermos de 70 años y más ($p=0.05$), diferencia estadística observada entre el mismo grupo y el de enfermos de 60-69 años ($p=0.018$). (Cuadro 6)

Con respecto a superóxido dismutasa, se encontró la actividad más alta en el grupo de sanos de 60-69 años (173 ± 13 UI/L), mientras que la actividad más bajas la presentó el grupo de enfermos de 70 años y más (166 ± 12 UI/L), sin que se observaran diferencias significativas entre algún grupo. (Cuadro 6)

La enzima glutatión peroxidasa presentó la actividad promedio más alta en el grupo de enfermos de 70 años y más (7318 ± 1995 UI/L), el grupo de enfermos de 60-69 años presentó actividad más baja que los primeros, pero más alta que los sanos en ambos grupos de edad, siendo los sanos de 70 años y más los que presentaron la actividad más baja de la enzima. (Cuadro 6)

En relación con los valores de lipoperoxidos se encontró que los enfermos de 60 a 69 años mostraron los valores más altos (0.381 ± 0.17), pero sin encontrar diferencias significativas con los mayores de 70 años ni con los grupos de sanos de 60 a 69 años ni con los mayores de 70 años. (Cuadro 6)

5. Sanos, enfermos y género.

Al observar los niveles promedio de antioxidantes totales entre sanos y enfermos, pero tomando en cuenta el género, se encontró que el grupo de

hombres sanos tienen los niveles promedio más altos de antioxidantes totales (1.20 ± 0.179 mmol/L), diferencia no estadísticamente significativa entre este grupo y el de los enfermos ni con los grupos de mujeres sanas y enfermas. (Cuadro 7)

Con respecto a superóxido dismutasa, las actividades promedio entre los hombres sanos y enfermos son iguales (177 UI/L), mientras que entre las mujeres fueron más bajas en el grupo de enfermas (167 ± 14 UI/L), sin que se observaran diferencias significativas. (Cuadro 7)

La enzima glutatión peroxidasa presentó la actividad más alta en el grupo de hombres enfermos (7738 ± 2235 UI/L), pero no se observaron diferencias significativas entre el grupo de sanos ni con los grupos de mujeres sanas y enfermas. (Cuadro 7)

El promedio en los niveles de lipoperóxidos más altos se observó en el grupo de hombres enfermos. (Cuadro 7)

6. Tipo de enfermedad y edad.

Dividiendo a la población en grupos de edad de acuerdo al tipo de enfermedad, se observaron niveles de antioxidantes parecidos entre el grupo de sano de 60-69 años y el grupo de hipertensión arterial de 70 años y más, mientras que los grupos restantes también presentaron niveles similares entre ellos, con excepción del grupo de diabetes mellitus + hipertensión arterial que presentó los niveles más bajos (0.98 ± 0.11 mmol/L), encontrándose diferencias significativas entre el grupo de sanos y diabetes mellitus de 60-69 años ($p=0.019$), sanos y diabetes mellitus + hipertensión arterial de 60-69 años ($p=0.13$), sanos e hipertensión arterial de 60-69 años ($p=0.03$), así como sano e hipertensión arterial de 70 años y más ($p=0.032$). En el grupo de 60-69 años, se observa que los niveles de los sanos son más altos con respecto a los grupos de enfermedad,

mientras que en el grupo de 70 años y más, se presenta la situación contraria. (Cuadro 8)

Con respecto a la actividad de superóxido dismutasa, ésta se presentó de manera similar en los grupos, siendo los grupos de diabetes mellitus de 60-69 años e hipertensión arterial de 70 años y más, los que presentan la actividad más bajos de todos, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre los grupo de sanos y diabetes mellitus de 60-69 años ($p=0.07$). (Cuadro 8)

La actividad de glutatión peroxidasa se observó con mas diferencias entre estos grupos, pero sin que llegaran a ser estadísticamente significativas; al respecto, los grupos de hipertensión arterial en ambos grupos de edad presentaron la actividad más alta de GPx, mientras que el grupo de diabetes mellitus + hipertensión presentó la actividad más baja. (Cuadro 8)

7. Lipoperóxidos y sistemas antioxidantes como riesgo de enfermedad.

Categorizando los resultados cuantitativos de acuerdo al valor de corte para cada parámetro de Eox se observó que los hipertensos tienen actividad de GPx menor que los sanos con una significancia limítrofe. Con respecto a los LPO, se observó que los ancianos mayores con DM e HTA presentaron niveles incrementados en comparación con los sanos ($p<0.05$). (Cuadro 9)

Se encontró una razón de momios de 1.57 en el grupo de enfermos con la probabilidad de presentar antioxidantes bajos pero esta no fue estadísticamente significativa al observar un intervalos de confianza de 0.75 a 3.29 (Cuadro 9)

Por otro lado, el valor obtenido en la razón de momios de 1.67 con un intervalo de confianza de 0.79 a 3.54 que tampoco fue estadísticamente significativo para actividad baja de SOD. Al observar el valor de razón de momios este no fue significativo ya que se obtuvo un dato de 0.579. (Cuadro 9)

Al revisar el valor obtenido en la razón de momios para los enfermos se encontró que este grupo tiene la probabilidad de tener 2.23 veces más de tener los lipoperóxidos altos que el grupo de sanos con un intervalo de confianza de 1.328 a 7.84 siendo estadísticamente significativo. (Cuadro 9)

Al observar el valor de razón de momios para el grupo de sanos con respecto al de hipertensos se encontró un valor de 2.23 ($IC_{95\%} = 0.85-5.93$) no siendo estadísticamente significativo. (Cuadro 9)

En cuanto a los valores de razón de momios se encontró que para el grupo de diabéticos fue de 4.22 ($IC_{95\%} = 1.0-18.4$) y para el grupo de hipertensos de 3.59 ($IC_{95\%} = 1.23-10.7$) mostrando diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. (Cuadro 9)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Niveles de Antioxidantes Totales, Superóxido Dismutasa, Glutatión Peroxidasa y Lipoperóxidos en relación a adultos mayores sanos y enfermos.

	Sanos n=61	Enfermos n=67
Edad	67.4 ± 6.1	67.3 ± 7.1
Antioxidantes Totales (mmol/L)	1.17 ± 0.23	1.12 ± 0.19
Superóxido dismutasa (UI/L)	172.6 ± 16.7	170.2 ± 15.5
Glutatión peroxidasa (UI/L)	6738 ± 2187	7051.5 ± 2112
Lipoperóxidos (mmol/L)	0.33 ± 0.13	0.38 ± 0.15

Antioxidantes totales sanos vs enfermos p=0.037 (t-student 95%)

Cuadro 5. Niveles de Antioxidantes Totales, Superóxido Dismutasa, Glutación Peroxidasa y lipoperóxidos con relación al tipo de enfermedad.

	Sanos n=61	Diabetes mellitus n= 16	Diabetes mellitus + hipertensión n=9	Hipertensión arterial n=42
Edad	67.4 ± 6.1	66 ± 5.0	64.9 ± 4.7	68.3 ± 8.0
Antioxidantes totales (mmol/L)	1.17 ± 0.23	1.06 ± 0.18	1.07 ± 0.11	1.15 ± .020
Superóxido Dismutasa (U/L)	172 ± 17	166 ± 12	173 ± 23	171 ± 15
Glutación Peroxidasa (U/L)	6738 ± 2187	6651 ± 1804	5940 ± 2698	7442 ± 2012
Lipoperóxidos (mmol/L)	0.33 ± 0.13	0.45 ± 0.16	0.33 ± 0.14	0.36 ± 0.14

Antioxidantes totales sanos vs diabetes mellitus p=0.08 (t-student 95%)

Glutación peroxidasa sanos vs hipertensión arterial p= 0.1 (t- student 95%)

Lipoperóxidos sanos vs diabetes mellitus p=0.019 (ANOVA 95%)

Cuadro 6. Niveles de Antioxidantes Totales, Superóxido Dismutasa, Glutación Peroxidasa y Lipoperóxidos con relación a la edad en individuos sanos y enfermos.

Niveles	Sanos		Enfermos	
	60 - 69 años	70 años y mas	60 - 69 años	70 años y mas
Antioxidantes Totales (mmol/L)	1.22 ± 0.23	1.07 ± 0.20	1.09 ± 0.17	1.18 ± 0.22
Superóxido Dismutasa (UI/L)	173 ± 13	170 ± 23	172 ± 17	166 ± 12
Glutación Peroxidasa (UI/L)	6767 ± 2136	6675 ± 2255	6985 ± 2208	7318 ± 1995
Lipoperóxidos (mmol/L)	0.303 ± 0.11	0.379 ± 0.16	0.381 ± 0.17	0.374 ± 0.17

Los niveles de antioxidantes totales en el grupo de sanos 60-69 años vs sanos 70 años y más presentaron $p=0.05$ (ANOVA 95%)

Los niveles de antioxidantes totales en el grupo de sanos 60-69 años vs enfermos 60-69 años presentaron $p=0.018$ (ANOVA 95%)

Cuadro 7. Niveles de Antioxidantes Totales, Superóxido Dismutasa, Glutatión Peroxidasa y Lipoperóxidos en relación con el género en individuos sanos y enfermos.

Niveles	Mujeres		Hombres	
	Sanos	Enfermos	Sanos	Enfermos
Antioxidantes Totales (mmol/L)	1.163 ± 0.234	1.123 ± 0.208	1.200 ± 0.179	1.112 ± 0.171
Superóxido Dismutasa (UI/L)	172 ± 20	167 ± 14	177 ± 9	177 ± 17
Glutatión Peroxidasa (UI/L)	6799 ± 2176	6799 ± 2017	6967 ± 1895	7738 ± 2235
Lipoperóxidos (mmol/L)	0.346±0.14	0.374±0.14	0.269±0.09	0.386±0.17

Cuadro 8. Niveles de Antioxidantes Totales, Superóxido Dismutasa y Glutación Peroxidasa en relación a edad y tipo de enfermedad.

	60 - 69 años				70 años y más			
	Sanos	DM	DM-HTA	HTA	Sanos	DM	DM-HTA	HTA
Antioxidantes Totales (mmol/L)	1.22 ± 0.23	1.04 ± 0.18	1.09 ± 0.10	1.10 ± 0.18	1.07 ± 0.20	1.11 ± 0.18	0.98 ± 0.11	1.22 ± 0.21
Superóxido Dismutasa (UI/L)	173 ± 13	165 ± 12	173 ± 24	175 ± 16	170 ± 23	169 ± 12	172 ± 22	165 ± 11
Glutación Peroxidasa (UI/L)	6767 ± 2186	6553 ± 1818	6306 ± 2985	7210 ± 2145	6674 ± 2255	6846 ± 1972	4656 ± 731	7770 ± 1821

Antioxidantes totales sanos 60-69 años vs diabetes mellitus 60-69 años $p=0.019$ (t-student 95%)

Antioxidantes totales sanos 60-69 años vs diabetes mellitus -hipertensión arterial 60-69 años $p=0.13$ (t-student 95%)

Antioxidantes totales sanos 60-69 años vs hipertensión arterial 60-69 años $p=0.03$ (t-student 95%)

Antioxidantes totales sanos 70 años y más vs hipertensión arterial 70 años y más $p=0.032$ (t-student 95%)

Superóxido dismutasa sanos 60-69 años vs diabetes mellitus 60-69 años $p=0.07$ (t-student 95%)

Cuadro 9. Razón de Momios para Niveles de Antioxidantes Totales, Superóxido Dismutasa, Glutación Peroxidasa y Lipoperóxidos en individuos sanos y enfermos.

	Sanos	Enfermos
Antioxidantes totales (<1.19 mmol/L)	61 (48%)	65 (52%)
Superóxido dismutasa (<178 UI/L)	58 (48%)	64 (52%)
Glutación peroxidasa (<8000 UI/L)	54 (45%)	65 (55%)
Lipoperóxidos (>0.400 μ mol/L)	47 (44%)	60 (56%)

Lipoperóxidos sanos vs enfermos $p=0.008$ (χ^2 95%)

Cuadro 10. Frecuencias y porcentajes para valores de corte de Antioxidantes Totales, Superóxido Dismutasa, Glutación Peroxidasa y Lipoperóxidos con relación al tipo de enfermedad.

	Sanos	Diabetes mellitus	Diabetes + HTA	HTA
Antioxidantes totales	61	15	9	41
1.19 – 1.54 mmol / L	(48%)	(12%)	(7%)	(33%)
SOD	58	16	9	39
178 – 190 UI / L	(48%)	(13%)	(7%)	(32%)
GPx	54	15	9	41
8000 - 9800 UI / L	(45%)	(13%)	(8%)	(34%)
Lipoperóxidos	47	14	9	37
0.195 – 0.400 μ mol/L	(44%)	(13%)	(8%)	(35%)

Glutación peroxidasa sanos vs hipertensión arterial $p=0.07$ (X^2 95%)

Lipoperóxidos sanos vs diabetes mellitus $p=0.021$ (X^2 95%)

Lipoperóxidos sanos vs hipertensión arterial $p=0.008$ (X^2 95%)

IX. DISCUSIÓN.

Desde 1956 Denham Harman propuso que los radicales libres tenían una influencia sobre el proceso de envejecimiento, hoy sabemos que el desbalance a favor de éstos radicales con relación al sistema antioxidante da como resultado el llamado estrés oxidativo que es un fenómeno con el cual es posible relacionar múltiples padecimientos crónico-degenerativos, como la diabetes mellitus, cáncer, artritis reumatoide, aterosclerosis, cataratas, enfermedad de Alzheimer, entre otros. Asimismo en los últimos años el estudio de los antioxidantes, como posibles protectores y/o agentes terapéuticos para dichos padecimientos, así como sus mecanismos de acción para su máxima eficiencia han sido de particular importancia en el estudio de la biología del envejecimiento.

Al respecto la evaluación y monitoreo del daño a los ácidos poliinsaturados, conocida como lipoperoxidación, así como de los niveles séricos de antioxidantes totales y de enzimas antioxidantes (SOD y GSH-Px), permitiría detectar en forma temprana procesos fisiopatológicos de relevancia gerontológica como es el síndrome de fragilidad.^{18,62,63} En este sentido, los resultados reportados en la literatura científica no son del todo consistentes, sobre todo en población gerontológica, ya que hay autores que señalan que el envejecimiento en sí mismo se acompaña de estrés oxidativo y por lo tanto un mayor daño a biomoléculas en comparación de los adultos jóvenes.⁶⁴⁻⁶⁶

Para la biología del envejecimiento es de particular interés evaluar los niveles de lipoperóxidos y la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa así como los niveles de antioxidantes totales en adultos mayores sanos y con alguna enfermedad crónico-degenerativa, considerando que la posible relación entre estas variables podría aportar conocimientos para la prevención, diagnóstico temprano y tratamiento de la fragilidad biológica. Por tal motivo, los resultados de la presente investigación confirman datos reportados en

la literatura médica además de aportar algunos conocimientos nuevos y vislumbrar incógnitas teóricas que permitirán seguir trabajando en esta línea de investigación.

Con relación a la concentración de lipoperóxidos se han reportado niveles de dienos conjugados y malondialdehídos en tejidos de animales viejos, asimismo la cantidad de lipofuscina en la célula (pigmento producto de la peroxidación lipídica) aumentan con la edad.⁶⁷ En este sentido los valores encontrados en nuestro estudio reflejan el aumento de los lipoperóxidos conforme aumenta la edad en adultos mayores sanos pero no en adultos mayores enfermos que después de los 70 años se mantienen, sin embargo, ninguno de estos valores fue estadísticamente significativo (Cuadro 6), resultados que están acordes con lo respecta a la edad a lo reportado por Sagai (1980)⁶⁸. Asimismo Knight (1987) señala que las concentraciones de lipoperóxidos varían con la edad y que los varones presentan niveles más altos que las mujeres ⁶⁹, en nuestro estudio no obtuvimos un comportamiento similar ya que los valores promedio de lipoperóxidos más altos sólo se encontraron en los varones que cursaban con una patología crónico-degenerativa y fue de 0.386 ± 0.17 . (Cuadro 7)

Los eritrocitos son especialmente susceptibles al daño oxidativo debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y a la alta concentración de oxígeno intracelular y hemoglobina, los cuales se sabe son precursores importantes en la formación de radicales libres. Aguirre y cols (1998) encontraron un claro aumento en la susceptibilidad de los eritrocitos de pacientes diabéticos al estrés oxidativo, con el lógico aumento en los niveles de hidropéroxidos en plasma y una pronunciada disminución en el potencial antioxidante,⁶⁰ tal como lo muestran nuestros resultados. Al respecto en la disminución de la capacidad plasmática antioxidante, supone el mismo autor, es responsable del daño oxidativo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) lo que lleva a la aparición de complicaciones cardiovasculares como aterosclerosis en estados diabéticos.⁶⁰

Los antioxidantes totales representan el número de moles de radicales peroxilos que pueden ser secuestrados por el suero humano lo cual esta determinado por el contenido de ácido ascórbico, alfa-tocoferol, ácido úrico y proteínas como la albúmina,⁶⁸⁻⁶⁹ por lo que la cuantificación de los mismos resulta de gran utilidad para evaluar una parte del sistema antioxidante; algunos estudios al respecto reportan que los antioxidantes totales disminuyen a medida que avanza la edad, además si está asociada a un padecimiento crónico-degenerativo este disminución será más acentuada⁷⁰⁻⁷²; en nuestros resultados la concentración sérica promedio resultó superior en los adultos mayores sanos que en los enfermos, cuya diferencia fue estadísticamente significativa, por lo que consideramos que los adultos mayores enfermos están cursando por un proceso de estrés oxidativo y los antioxidantes totales son consumidos y por lo tanto se encuentran bajos. En este sentido Kaneto y cols (1999) explican que el tratamiento con antioxidantes de pacientes con diabetes mellitus tipo II, preserva las funciones celulares, lo cual sugiere el potencial uso de antioxidantes en el tratamiento de la misma ya que el estrés oxidativo causa disfunción de las células β del páncreas.⁷³ Al respecto, nuestros resultados muestran que el estrés oxidativo, evaluado por la cantidad de lipoperoxidos presentes, es mayor en pacientes con diabetes mellitus con respecto al grupo control con una $p=0.019$, mientras que los niveles de antioxidantes presentan niveles bajos en los mismos pacientes. (Cuadro 5)

Con relación a la superóxido dismutasa (SOD) esta actúa a nivel mitocondrial en su forma de MN-SOD, citosólica CuZn-SOD y extracelular CuZn-SOD, asimismo de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), existe una forma intracelular (GSH-Px-c), una extracelular o plasmática (Gpx-p) y otra con actividad específica para los fosfolipoperoxidos (GSH-Px-PH) que por lo general esta asociada a la membrana celular^{68-69,74}; ambas enzimas antioxidantes son consideradas como la defensa primaria de la biomoléculas contra el daño oxidativo y que estas decrecen conforme avanza la edad.⁷⁵⁻⁷⁶

Los organismos aeróbicos han evolucionado desarrollando defensas antioxidantes para protegerse contra especies reactivas de oxígeno, una de las principales defensas es la de tipo enzimático, la cual consiste esencialmente de 2 pasos: en el primero se observa la dismutación del ión superóxido a peróxido de hidrógeno por las superóxido dismutasa; en el segundo se presenta la conversión de peróxido de hidrógeno en agua, la cual es catalizada por glutatión peroxidasa y/o catalasa. Teóricamente al menos, el balance entre el primero y segundo pasos de las enzimas antioxidantes puede ser crítico; por un lado, la actividad de SOD con respecto a GPx podría llevar a la acumulación de ión superóxido, el cuál es tóxico para las macromoléculas; y por otro lado, un aumento en la actividad de SOD con respecto a GPx llevará a un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno, el cuál puede ser responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno mucho más nocivas, como el radical hidroxilo. Un desequilibrio entre la actividad del primero y segundo paso de las enzimas antioxidantes aparece en varios procesos patológicos y puede contribuir directa o indirectamente en estos procesos. Al respecto, De Haan y col (1996) demostraron la relación de las actividades enzimáticas del primero y segundo pasos de manera balanceada, más que los niveles absolutos de las actividades de las enzimas involucradas, como factores determinantes en la preservación del funcionamiento celular.⁷⁷ Nuestros resultados muestran que en el grupo de sanos, la SOD se encuentra elevada la glutatión peroxidasa disminuye, y en los enfermos, la SOD disminuye mientras que la GPx aumenta, precisamente como un proceso para el mantenimiento del balance en el estado antioxidante.

Por su parte Tiedge y cols(1998) explicaron que las células que contienen niveles bajos de una o más enzimas antioxidantes son particularmente vulnerables al daño oxidativo. Mediante un experimento de sobreexpresión de enzimas se demostró que dadas las diferencias entre los comportamientos cinéticos de las enzimas GPx y catalasa, la catalasa es más efectiva que la GPx en la protección contra altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, mientras que la GPx da

protección más eficiente que la catalasa cuando se trata de altas concentraciones de peróxidos lipídicos;⁷⁸ lo cual también puede explicar el por qué se encuentran aumentados los niveles de dicha enzima en nuestros resultados en el grupo de enfermos, si se considera que los niveles de peróxidos también se encuentran aumentados en dicho grupo con respecto a los sanos con una diferencia estadísticamente significativa. (Cuadro 4)

Casado y cols, (1988) encontraron que la enzima SOD se encontraba elevada en un grupo de pacientes catalogados como pacientes con alteración vascular, en el que se encontraba incluida la hipertensión, con respecto a un grupo control teniendo, además, niveles bajos de catalasa;⁷⁹ al respecto Jay y col. (1992) postulan que un aumento en la actividad de SOD genera una mayor cantidad de H_2O_2 al dismutar el superóxido, debido a que no hay suficiente catalasa necesaria para descomponer el peróxido de hidrógeno, éste estaría disponible para generar especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo, y que de esta manera, la variación inversa entre SOD y catalasa contribuirían al establecimiento de la enfermedad en lugar de aliviar la condición.⁸⁰ En este aspecto, nuestros resultados no demostraron diferencia significativa en los niveles de SOD entre el grupo de hipertensión arterial y el grupo control, sin embargo, si mostraron diferencia significativa en los niveles del glutatión peroxidasa que es una enzima con función homóloga a la catalasa, cuyo hecho podría explicar la disminución en los niveles de catalasa, asumiendo que quien realiza la función de eliminación de peróxido de hidrógeno, o incluso peróxidos lipídicos es la glutatión peroxidasa, manteniendo así el equilibrio antioxidante, tal vez explicando la estabilidad fisiológica de este grupo. (Cuadro 5)

Ceriello (1997) estudió el comportamiento de la expresión de las enzimas antioxidantes bajo diferentes concentraciones de glucosa, encontrando que bajo concentraciones normales de glucosa, los niveles enzimáticos no se alteran; sin embargo, observó que la CuZnSOD aumenta a altas concentraciones de glucosa,

mientras que la MnSOD permanece sin cambio. En cuanto a GPx, observaron niveles aumentados en pacientes con diabetes, así como también niveles de lipoperóxidos. Estos datos indican que la exposición a altas concentraciones de glucosa induce la defensa antioxidante y demuestra la falla de la misma en pacientes con diabetes mellitus tipo I.⁸¹ Nuestros resultados, por el contrario no mostraron niveles aumentados de enzimas SOD y GPx, probablemente, porque se trata de pacientes controlados en su enfermedad, aunque sí es posible observar los niveles bajos de antioxidantes y los niveles aumentados de lipoperóxidos, cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas. (Cuadro 5)

Al respecto, Hanriette y col (1999) encontraron que la glucosa estimula de manera aguda la actividad de la CuZnSOD en los islotes pancreáticos, lo cual sugiere un importante mecanismo para proteger a los islotes contra la toxicidad del oxígeno debida a la exposición periódica de altas concentraciones de glucosa que se presentan en los pacientes después de comer.⁸²

Del mismo modo, Santini y col (1996), indican que en los pacientes con diabetes insulino dependiente se presenta un aumento en el estrés oxidativo, mientras que el sistema antioxidante es ineficiente, lo cual se presenta en el paciente sin tomar en cuenta la duración de la enfermedad, el control metabólico o la presencia de complicaciones⁸³, tal como lo muestran nuestros resultados en el grupo de pacientes con diabetes mellitus y diabetes mellitus + hipertensión arterial, quienes presentan los niveles más bajos de antioxidantes totales.

Chen (2001), encontró que la presión arterial mejora en ratas con tratamiento de vitamina C y E, influenciando el aumento en los niveles de SOD.⁸⁴ Nuestros resultados muestran niveles de SOD más altos en pacientes con hipertensión y diabetes mellitus + hipertensión con respecto a los pacientes con diabetes mellitus, pero no así con respecto a los pacientes sanos, que muestran niveles parecidos.

Como se puede apreciar el fenómeno de envejecimiento es un proceso complejo donde existen muchas dudas por resolver, asimismo no existe suficiente evidencia científica para aseverar que los antioxidantes por sí solos sean capaces de reducir el riesgo de enfermedad; además es necesario considerar otros factores que están involucrados en este difícil proceso como son la modulación homeostática de la hormona melatonina o el hecho de que algunas vitaminas antioxidantes bajo ciertas circunstancias pueden actuar como pro-oxidantes.⁸⁴⁻⁸⁸

Otro de los aspectos relevantes en la calidad de vida durante el envejecimiento, es el ejercicio físico habitual, es importante señalar que dicha actividad debe ser supervisada y monitorizada, ya que si no es acompañada de una dieta adecuada (incluyendo antioxidantes) el ejercicio físico en sí mismo es generador de radicales libres y potencialmente puede provocar estrés oxidativo y con esto un aumento en los valores de los lipoperóxidos.⁸⁹⁻⁹¹

Además, el número de horas de sueño es considerado como uno de los mecanismos fisiológicos que favorecen la función antioxidante endógena del organismo, hay que hacer notar que durante el envejecimiento los adultos mayores disminuyen el número de horas de sueño, tal vez provocado por la disminución en la secreción de melatonina por la glándula pineal, de ahí que se recomiende su uso como regulador del sueño, con lo cual se favorece la función antioxidante.⁹¹

Finalmente, los resultados de la presente investigación permitirán continuar trabajando en la biología del envejecimiento a través de estudios epidemiológicos longitudinales en los que se incluyan un mayor número de variables independientes pro-oxidantes, así como la realización de ensayos clínicos en los que se considere la medición de vitaminas séricas y su administración.

X. CONCLUSIONES**> Hipótesis**

Considerando que en el proceso normal de envejecimiento se producen radicales libres normalmente, mismos que aumentarán en los adultos mayores que presenten alguna enfermedad crónico-degenerativa, como diabetes mellitus o hipertensión arterial, suponemos que los ancianos con padecimientos crónicos presentarán concentraciones de lipoperóxidos significativamente superiores con respecto a los sanos.

> Conclusión

Se encontró diferencia significativa en la elevación de la concentración de lipoperóxidos en ancianos con enfermedad crónica con respecto a ancianos sanos, lo cual indica que el padecer una enfermedad condiciona la presencia de concentraciones elevadas de lipoperóxidos, cuyo riesgo se aumenta si se padece diabetes mellitus con respecto a hipertensión arterial o la presencia de ambas.

> Hipótesis

Dado que la función de los antioxidantes es la eliminación y/o control de los radicales libres producidos en el organismo, suponemos que, los niveles de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, así como de antioxidantes totales, se encontraran disminuidos en los ancianos con padecimientos crónicos, como diabetes mellitus o hipertensión arterial, con respecto a los ancianos sanos.

➤ Conclusión

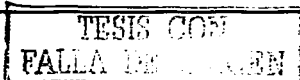
Se encontró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de antioxidantes totales del grupo de sanos con respecto al grupo de enfermos, así mismo, se encontró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de antioxidantes totales en el grupo de sanos con respecto al grupo de ancianos con diabetes mellitus; lo cual indica, tomando en cuenta las diferencias en concentraciones de lipoperóxidos, que a mayor estrés oxidativo presente menor concentración de antioxidantes totales circulantes, pues se encuentran disminuidos al estar siendo utilizados.

Con respecto a la enzima glutatión peroxidasa, sus niveles se vieron aumentados en ancianos con hipertensión arterial, con diferencia estadísticamente significativa con respecto a ancianos sanos o padeciendo diabetes mellitus, este aumento se presenta debido a que la GSH-Px es una enzima específica para la eliminación de lipoperóxidos, que justamente se encuentran normales en los pacientes con hipertensión, por lo que la enzima se encuentra libre.

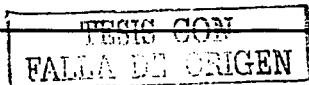
Los niveles de la enzima superóxido dismutasa se encontraron estadísticamente disminuidos en pacientes con diabetes mellitus,

XI. REFERENCIAS.

1. Confort A. Teorías sobre el envejecimiento. En Tratado de clínica geriátrica y gerontología. Argentina: Medica Panamericana, 1975: 56 – 67
2. Harman D. The aging process. Proc Natl Acad Sci 1981; 78:7124 –7128
3. Medvedev AZ. An attempt at a rational classification of theories of ageing. Biol Rev 1990; 65: 375-398.
4. Gutteridge JMC. Free radicals and aging. Rev Clin Gerontol 1994; 4: 279-288.
5. Rodríguez CK, Céspedes ME. Estrés Oxidativo y Envejecimiento. Rev Cubana Invest Biomed 1999; 18: 67-76.
6. Gabbita SP, Butterfield DA, Hensley K. Aging caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: and electron paramagnetic resonance investigation. Free Rad Biol Med 1997; 23: 191-201.
7. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferendik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci 1999; 65: 1865-1874.
8. Bunker W. Free radicals, antioxidants and ageing. Med Lab Sci 1992; 49: 299-312.
9. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am J Med 1991; 91: 3C-14S – 3C-22S.
10. Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radical, melatonin and aging. Exp Gerontol; 30:213-227.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in Biology and Medicine, 2a ed. Gran Bretaña: Oxford University Press, 1989: 10-12.
12. Sánchez RMA, Retana UR. Estrés Oxidativo y Envejecimiento. En: Martínez Arronte F. Tópicos de Gerontología. Academia 2. México: Serie de Monografías Científicas de la FES Zaragoza, 1998: 7-18.
13. Gutteridge MCJ. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41: 1819-1826.



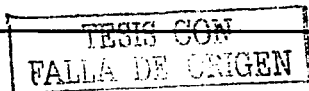
14. Weiss R. Envejecer. *Nacional Geographics* 1997; Noviembre: 10-31.
15. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994; 97: 3A-5S – 3A-13S.
16. Loeckie L, Meerman HNJ, Commandeur MJN, Vermeulen ENP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 202-226.
17. McCall RM, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med* 1999; 26:1034-1053.
18. Knight JA. Free radicals, antioxidants, aging and disease. USA: AACC Press, 1999: 1-2.
19. Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. Inductions of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 2000; 36: 142-148.
20. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension* 1999; 34: 539-545.
21. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-724.
22. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1969; 244:6049-6055.
23. McCord JM, Keele B, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 1971; 68:1027-1027.
24. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1973; 248:4793-4796.
25. Marklund S. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 7634-7638.
26. García TB, García MO, Clapes HS, Rodes FL, García PJC. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Rev Cubana Invest Biomed* 1995; 14: 1-3



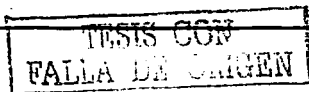
27. Warner RH. Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. Free Rad Biol Med 1994; 17: 249-258
28. Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT. Relationship between antioxidants defences and longevity in different mammalian species. Mech Age Dev 1990; 53: 217-227
29. Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cárdenas S, Barja G. Maximum life span in vertebrates: Relationship with liver antioxidants enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H_2O_2 and basal and maximum aerobic capacity. Mech Age Dev 1993; 70:177-199.
30. Cutler GR. Antioxidants and aging. Am J Clin Nutr 1991; 53:373S- 379S.
31. Johnson TE. Increased life span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower rate of aging. Science 1990; 249: 908-912
32. Rose MR. Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. Evolution 1988; 42: 708-716.
33. Muckett RJ, Orr WC, Rahmandar JJ, Benes JJ. Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase transgenic *Drosophila melanogaster*. Arch Biochem Biophys 1999; 371:260-269.
34. Wispe JR, Warner BB, Clarck JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW. A human Mn- superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection against oxygen injury. J Biol Chem 1992; 267: 23937- 23941.
35. Koningsberger JC, Van Asbeck BS, Faasen E, Wieghman LJ. Copper, zinc superoxide dismutase and hydrogen peroxide: a hydroxyl radical generating system. Clin Chim Acta 1994; 230: 51-61.
36. Elroy-Stein O, Bernstein Y, Groner Y. Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. EMBO J 1986; 5: 615-622.

37. Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Rad Biol Med* 1993; 15: 77-96.
38. Church LS, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 3113-3117.
39. Millikin D, Meese E, Vogelstein B, Witkowski C. Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in malignant melanoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5449-5453.
40. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 10045-10048.
41. Adachi T, Wang J, Wang XL. Age-related change of plasma extracellular superoxide dismutase. *Clin Chim Acta* 2000; 290: 169-178.
42. Navarro-Alarcón M, López MMC. Essentiality of selenium on the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ* 2000; 249: 347-371.
43. Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *Febs Lett* 1973; 32: 132-134.
44. Nakane T, Asayama K, Kodera K, Hayashibe H, Uchida H. Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Rad Biol Med* 1998; 25: 504-511.
45. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1994; 17: 235-248.
46. Takashi K, Avissar N, Whittin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256: 677 - 686.

47. Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305: 541 – 545.
48. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 951-965.
49. Moutet M, D'Alessio P, Malette P, Devaux V, Chaudière J. Glutathione peroxidase mimics prevent TNF- α and neutrophil-induced endothelial alterations. *Free Rad. Biol Med* 1998; 25: 270-281.
50. Esworthy RS, Chu FF, Geiger P, Girotti AW, Doroshow JH. Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307: 29-34.
51. Roveri A, Casaco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. *J Biol Chem* 1992; 267: 6142-6146.
52. Buttke T, Sandstrom P. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10.
53. Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1990; 265: 454 – 461.
54. Schwenke D. Antioxidants and atherogenesis. *J Nutr Biochem* 1998; 9: 424-445
55. Rosenblat M, Aviram M. Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL: in vitro and in vivo studies. *Free Rad Biol Med* 1998; 24: 305-317.
56. Fong-Fong C, Doroshow HJ, Esworthy SR. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; 268: 2571-2576.
57. Lane HW, Lotspeich CA, Moore CE, Ballard J, Dudrick SJ, Warren DC. The effect of selenium supplementation on selenium status of patients receiving chronic total parenteral nutrition. *J Parent Enteral Nutr* 1987; 11: 177-182.



58. Konukoglu D, Ackay T, Erdem T. Susceptibility of erythrocyte lipids to oxidation and erythrocyte antioxidants status in myocardial infarction. *Clin Biochem* 1998; 8: 667-671.
59. Prior LR, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 1173-1181.
60. Aguirre F, Martin I, Grinspon D, Ruiz M, Hager A, Paoli DT. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity and glucemic control in elderly NIDDM patients. *Free Rad Biol Med* 1998; 24: 580-585.
61. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 1231-1237.
62. Fries J. Compression of morbidity in the elderly. *Vaccine* 2000; 18: 1584-1589.
63. Retana U R, Altamirano L M, Mendoza N V, Molina A B. 1997. Daño en el ADN como posible predictor de fragilidad en el proceso de envejecimiento. *Tópicos de Investigación y Posgrado*. 5(3), 180-184.
64. Hildebrand JK, Joos SK, Lee MA. Use of the diagnosis "Failure to thrive" in older veterans. *J Am Geriatr Soc* 1997; 45: 1113-1117
65. Verdery, R.B. 1995. Failure to thrive in the elderly. In: Lipschitz, D.A. Nutrition, aging, and age-dependent diseases clinics in geriatrics medicine. 11(4). 653-659.
66. Jazwinski SM. Longevity, genes and aging 1996; 273: 54-58.
67. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Med* 1997; 23: 134-147.
68. Sagai CM, Ichinose T. Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases by rats. *Life Sci* 1980; 27: 731-738.
69. Knight JA, Smith ES, Kinder EV, Anstall BH. Reference intervals for plasma lipoperoxides: age, sex, and specimen-related variations. *Clin Chem* 1987; 33(12): 2289-2291.



70. García TB, García MO, Clapes HS, Rodes FL, García PC. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: Superóxido dismutasas. *Rev Cubana Inves Biomed* 1995; 14(1): 1-3.
71. Cisneros PE, Pupo BJ, Céspedes ME. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Rev Cubana Inves Biomed* 1997; 15(2): 1-5.
72. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean PH. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997; 43:562-568.
73. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: posible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 1999; 48: 2398-2406
74. Bendich A. Symposium: Antioxidants, immune response and animal function. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2789-2794
75. King CM, Bristow-Craig HE, Gillespie ES, Barnett YA. In vivo status DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75 to 80 year old humans. *Mutat Res* 1997; 377: 137-147.
76. Céspedes ME, Hernández LI, Llopiz JN. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Inves Biomed* 1996; 15(2): 1-5.
77. De Haan JB, Cristiano F, Ianello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genetics* 1996; 5: 283-292.
78. Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing R1Nm5f cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 1998; 47:1578 - 1585.
79. Casado A, de la Torre R, López-Fernandez E, Carrascosa D, Venarucci D. Niveles de superóxido dismutasa y catalasa en enfermedades del ancianos. *Gac Med Méx* 1988; 134 (5): 539-544.

80. Jay D, Cuéllar A, Jay EG, Gleason R, Muñoz E. Study of a Fenton type reaction: Efecto of captopril and chelating reagents. *Arc Biochem Biophys* 1992; 298: 740-746
81. Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type I diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 1997; 46: 1853-1858.
82. Henriette RO, Curi R, Carpinelli AR. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Cell Physiol* 1999; 276: C507-C510.
83. Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Martorana GE. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1996; 45: 471-477.
84. Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADP^H oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 2001; 38: 606-612.
85. Reiter RJ. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessay* 1992; 14: 169-175.
86. Pierpaoli W, Lenikov V. Theoretical considerations on the nature of pineal "ageing clock". *Gerontology* 1997; 43: 20-25.
87. Oikawa S, Yamada K, Yamashita N, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. N-acetylcysteina, a cancer chemopreventive agent, causes oxidative to cellular a isolated DNA. *Carcinogenesis* 1999; 20(8): 1485-1490.
88. Paolini M, Pozzetti L, Pedullì GF, Marchesi E, Candelli-Forti G. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci* 1999; 64(23): 373-378.
89. Niki E. action of antioxidants against oxidative stress. In Dizdaroglu M, Karakaya AE. *Advances in DNA damage and repair oxygen radical effects, cellular protection, and biological consequences*. Vol. 302 Series a Life Sciences. New York: Plenum Publishers, 199: 313-318.
90. Hartmann A, Plappert U, Raddtz K, Grüner-Fuchs M, Speit G. does physical activity induce DNA damage. *Mutagenesis* 1994; 9: 269-272.

91. Kretzschmar M, Muller D. Aging training and exercise. Sports Med 1993; 15: 196-209.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN