

OXIDACIÓN /ANTIOXIDACIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO

PILAR ANDREA LÓPEZ GUTIÉRREZ

BRIGITTE VALENCIA VALENCIA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

BACTERIOLOGA

MARTHA GUERRA DE MUÑOZ MSc

DIRECTORA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

BOGOTA D.C.

2009

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

OXIDACIÓN /ANTIOXIDACIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO

PILAR ANDREA LÓPEZ GUTIÉRREZ

BRIGITTE VALENCIA VALENCIA

Dra. MARTHA GUERRA MSc.

Directora

Dra. MARTHA ALVARADO MSc

Asesora Estadística

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

BOGOTA D.C.

2009

OXIDACIÓN /ANTIOXIDACIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO

PILAR ANDREA LÓPEZ GUTIÉRREZ

BRIGITTE VALENCIA VALENCIA

APROBADO

Dra. MARTHA GUERRA MSc.

Directora

Dr. HUGO DIEZ MSc, PhD.

Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

BOGOTA D.C.

2009

OXIDACIÓN /ANTIOXIDACIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO

PILAR ANDREA LÓPEZ GUTIÉRREZ

BRIGITTE VALENCIA VALENCIA

INGRID SCHULLER, Ph. D

Decana Académica

Facultad de Ciencias

LUZ AMPARO MALDONADO M. Ed.

Directora

Carrera de Bacteriología

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

BOGOTA D.C.

2009

DEDICATORIA

Dedico con todo mi amor y cariño.

A ti Dios que me diste la fortaleza, sabiduría y la oportunidad de terminar mi carrera y por haberme permitido cumplir esta meta.

Especialmente a mis Padres Teresa y Heriberto por darme una carrera para mi futuro, por creer en mí y gracias a ellos soy quien soy hoy en día. A mi hermana Gina la cual ha estado a mi lado compartiendo experiencias vividas durante mi carrera, sobre todo por estar conmigo y apoyarme siempre.

A mi novio Enrique, por su compañía y comprensión durante este largo camino y finalmente pero igual de importante a mi mejor amiga y compañera de tesis Pilar, quien compartió conmigo día a día las dificultades y logros de este proceso y con quien hoy celebramos este gran triunfo.

Brigitte Valencia.

Primero que todo agradezco a Dios, porque me ha dado la fuerza y el valor para seguir adelante, porque gracias a él estoy acá cumpliendo uno de mis más anhelados sueños.

Con todo mi amor y la dedicación de este sueño hecho realidad a los seres que me dieron la vida, mis guías, mis amigos ellos son Clara y Luis mis Padres, gracias por amarme tanto y darme esta maravillosa oportunidad de ser profesional. Este triunfo es de ustedes también. A un ser muy especial para mí, quien también ha estado siempre a mi lado compartiendo todo y es mi hermanito Pipe, gracias nene, tu apoyo y tu amor fueron muy importantes en el reto que hoy asumo.

Además de ellos quisiera también dedicarle este logro a una persona muy especial, con la que compartí cinco años de mi vida y con la que comparto ahora la felicidad y la satisfacción del deber cumplido, Brigitte mi gran amiga gracias por tu apoyo y tu amistad.

Mi dedicación para alguien muy especial quien tendría que estar compartiendo con nosotras este triunfo, pero la vida, no se lo permitió, donde quiera que estés, Diani este triunfo también es tuyo, gracias por haber sido mi compañera y amiga. Te recordaremos siempre.

Pilar Andrea

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a Dios y la Virgen por la salud y la sabiduría que nos brindaron para la culminación de este trabajo.

A nuestra directora de tesis Dra. Martha Guerra, por habernos tenido en cuenta para la realización de este trabajo, por su incondicional apoyo, su paciencia y colaboración durante este tiempo.

A la Dra. Martha Alvarado, nuestra asesora estadística por su tiempo, dedicación y colaboración constantes.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Lista de gráficas	ix
Lista de tablas.....	x
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. Introducción	1
2. Justificación	2
3. Marco teórico	4
4. Objetivos	12
4.1 General	12
4.2 Específicos.....	12
5. Metodología	13
6. Resultados y Discusión	15
7. Conclusiones	26
8. Bibliografía	27

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Comparación de los promedios de la CuZn-SOD y la Se-GPx en (U/L) y su relación con la hemoglobina (U/gHb) en adultos mayores y controles. Bogotá DC. **Pág. 16**

Grafica 2. Comparación de los promedio del MDA (nmol/L) y de TAS (mmol/L) en adultos mayores y controles. Bogotá DC. **Pág. 16**

Grafica 3. Comparación de los promedios de la CuZn-SOD en (U/L) y (U/gHb) de adultos mayores y controles por género. Bogotá DC. **Pág. 23**

Grafica 4. Comparación de los promedios de la Se-GPx (U/L) y (U/gHb) de adultos mayores y controles por género. Bogotá DC. **Pág. 23**

Gráfica 5. Comparación de los promedios de TAS (mmol/L) (U/L) y de MDA (nmol/L) de adultos mayores y controles por género. Bogotá DC. **Pág. 24**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedios y desviaciones estándar de hemoglobina (g/dL), actividades de CuZn-SOD y Se-GPx (U/L), su relación con la Hb (CuZn-SODU/gHb y Se-GPxU/gHb), TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L), de adultos mayores y controles. Bogotá DC. **Pág. 15**

Tabla 2. Intervalos de confianza del 95% para los niveles promedio poblacionales de TAS, CuZn-SOD U/L, CuZn-SOD U/gHb, Se-GPx U/L y Se-GPx U/gHb, TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L) para los adultos mayores y controles. **Pág. 20**

Tabla 3. Valores p de las pruebas de comparación de los parametros de Hb, CuZn-SOD, Se-GPx, TAS y MDA en adultos mayores y controles. **Pág. 21**

Tabla 4. Promedios y desviaciones estándar de hemoglobina, actividades de CuZn-SOD y Se-GPx (U/L), su relación con la Hb (CuZn-SOD U/gHb y Se-GPxU/gHb), TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L), agrupados por género (Adultos mayores vs. Controles). **Pág. 22**

Tabla 5. Intervalos de confianza de la media poblacional entre hombres y mujeres adultos mayores y sus controles. Bogotá DC. **Pág. 24**

Tabla 6. Valores p de las pruebas de comparación entre los hombres y mujeres adultos mayores en los parámetros: Hb (g/dL), Cu/Zn-SOD (U/L), CuZn-SOD (U/gHb), Se-GPx (U/L), Se-GPx (U/gHb), TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L). Bogotá DC. **Pág. 25**

RESUMEN

Se estableció la asociación entre el estado antioxidante total (TAS: *Total Antioxidant Status*), las enzimas eritrocitarias CuZn-superóxido dismutasa (CuZn-SOD), Selenio glutatión peroxidasa (Se-GPx), la comparación de su actividad con la concentración de hemoglobina y el malondialdehído (MDA), como indicadores de estrés oxidativo, en 100 adultos mayores (50 hombres y 50 mujeres) con edades entre 60 y 80 años seleccionados en el Hogar Geriátrico San Francisco de Asis y se compararon con un grupo control conformado por individuos en igual número y género con edades entre 30 y 50 años. Se estimó el balance celular entre las enzimas antioxidantes mediante las reglas de Chebyshev y el análisis estadístico comparativo, por pares de variables, se realizó mediante la prueba *t de Student* e intervalos de confianza del 95% de comparación de medias poblacionales.

Existió disminución estadísticamente significativa de TAS ($p < 0,05$) en adultos mayores en relación a los controles. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) de CuZn-SOD (U/L), Se-GPx (U/L) y MDA (nmol/L) entre los adultos mayores y controles siendo dependientes del envejecimiento e independiente del género. El decremento de los marcadores de estrés oxidativo fue consecuente con la generación de EROs lo que conduce al desbalance del sistema antioxidante.

Palabras claves: *Envejecimiento, antioxidantes, estrés oxidativo, superóxido dismutasa, selenio glutatión peroxidasa y malondialdehído.*

ABSTRAC

The association was established between the total antioxidant status (TAS), the red cell enzymes CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD), selenium- glutathione peroxidasa (Se-GPx), the comparing of their activity whit the concentration of hemoglobin and malondialdehyde (MDA), as indicators of oxidative stress, in 100 major adults (50 men and 50 women) with ages between 60 and 80 years selected in the Geriatric Home San Francisco de Asis and there were compared with a group control shaped by individuals in equal number and kind with ages between 30 and 50 years. The cellular balance was estimated between antioxidant enzymes by means of Chebyshev's rules and the statistical comparative analysis, for pairs of variables, was realized by means of the Student t test and confidence intervals of 95% of comparison of population averages.

There existed TAS's statistically significant decrease ($p < 0,05$) in major adults in relation to the controls. Were found significant differences ($p < 0,05$) of CuZn-SOD (U/L), Se-GPx (U/L) and MDA (nmol/L) between the major adults and controls being dependent on the aging and independent from the kind. The decline of the markers of stress oxidativo was consistent with the generation of EROs what leads to disbalance of the antioxidant system.

Keywords: *Aging, Antioxidant, oxidative stress, superoxide dismutase, Selenium-glutathione peroxidasa and malondialdehyde.*

1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento o senescencia es el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que surgen como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos (Gómez Rinesi *et al.*, 2000). Es un proceso letal, progresivo, intrínseco y universal, que ocurre como consecuencia de la interacción de la genética del individuo y de su entorno ambiental. Está asociado con dos procesos que se superponen y que finalmente conducen a la muerte: la degeneración progresiva de las células y la pérdida de la capacidad regenerativa. Estos, ocurren en cada una de las etapas de la vida y permanecen en un balance perfecto bajo condiciones fisiológicas. La “homeostasis mitótica” permite que las células lesionadas sean reemplazadas preservándose así la integridad funcional de tejidos y de órganos. Sin embargo, en el envejecimiento este balance se inclina hacia la degeneración. Los mecanismos de este último estarían relacionados fundamentalmente con la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) o ROS (Reactive Oxygen Species) y a la glicosilación de proteínas; ambos procesos estrechamente relacionados a factores ambientales (Andreoli, 2000).

Por ello, a pesar que en las últimas décadas han surgido diversas teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento, entre ellas, la que tiene más adeptos es la de los radicales libres (RL). Harman estableció en 1956 que el envejecimiento se debía a la acción oxidante de estos radicales, los cuales también estarían implicados en la patogénesis de muchos procesos degenerativos cuya incidencia aumenta al envejecer. (Harman, 1956 y 1981). Así, clínicamente se han relacionado con numerosas patologías crónicas (enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas, enfermedad de Alzheimer, entre otras). También en la patogénesis de la arteroesclerosis se ha involucrado la producción excesiva de EROs que promueven el proceso de lipoperoxidación, induciendo la muerte masiva de macrófagos, con lo que se inicia la formación de lesiones arteroescleróticas (Wickens, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

Con el avance de la medicina y la búsqueda de calidad de vida, se ha generado modificación en la pirámide poblacional (aumento progresivo del grupo de adultos mayores). La mayoría de ellos, ostentan numerosas potencialidades por desarrollar, sin embargo, la sociedad tiende a desestimarlos por el hecho de haber llegado a cierta edad cronológica (Gómez Rinesi *et al.*, 2000).

Se considera bajo el concepto de "edad cronológica" que el proceso de envejecer inicia entre los 60 y 65 años; no obstante, en numerosos individuos se instaura déficit funcional evidente antes de esa edad. Sin embargo, en numerosas ocasiones, el decrecer vital no se acompaña de déficit en las funciones cerebrales que permanecen intactas hasta la muerte. Por ello, es admisible especular, que los diferentes sistemas del organismo no envejecen a igual velocidad, y que no se puede hablar de envejecimiento cerebral desde el punto de vista meramente cronológico (Bruce y Troen, 2003).

De acuerdo a la teoría de los RL, descrita por Denham Harman (1956) se propone que el envejecimiento sería el resultado de inadecuada protección contra el daño producido por los RL en los tejidos consecuente de la existencia de una atmósfera oxigenada, y por ello, oxidante. Los organismos superiores, como el ser humano, no pueden existir sin el oxígeno; sin embargo, a su vez, éste es nocivo para su existencia, de allí "la gran paradoja del oxígeno". El riesgo del oxígeno es inherente a su estructura; cada átomo tiene un electrón impar para su órbita externa lo que le confiere la condición de RL, y cada molécula posee dos electrones impares (birradical libre) (Harman, 1987; Pérez-Pérez, 2000).

La reducción tetravalente del oxígeno en la mitocondria para generar agua mediante la cadena transportadora de electrones es relativamente segura; no obstante, la reducción univalente del oxígeno, no programada, origina intermediarios reactivos. Éstos se consideran responsables de la toxicidad del oxígeno (Martínez-Sánchez, 2005).

Los estudios actuales están enfocándose a analizar el impacto que tienen las especies de radicales libres derivadas o no de oxígeno en el proceso de envejecimiento como una pauta para comprender el mecanismo sistemático que siguen estas moléculas para iniciar el deterioro o la apoptosis celular. Si bien, el proceso de envejecimiento depende de varios factores, el EOx es un aspecto crucial en el desarrollo del mismo, porque una vez iniciado el daño por los RL, éste puede generar una reacción en cadena que, aunada a la incapacidad de los sistemas antioxidantes endógenos para controlar el incremento en la producción de los RL termina por inducir afecciones letales en la fase de vejez (Paredes Salido y Roca Fernández, 2002)

El envejecimiento se ha asociado a incremento en la concentración de RL, posiblemente, por la disminución de la actividad antioxidante o de factores prooxidantes lo cual deriva del descontrol en la producción y eliminación de RL que se refleja en la elevación del daño oxidativo celular y se manifiesta en afecciones diagnosticadas durante la vejez. Clínicamente se han relacionado numerosas patologías crónicas con el envejecimiento (enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas, enfermedad de Alzheimer, entre otras) y con el daño producido por los RL, los cuales afectan todos los sistemas del organismo. También en la patogénesis de la arteroesclerosis se ha involucrado la producción excesiva de EROs que promueven un proceso de lipoperoxidación, induciendo la muerte masiva de macrófagos, con lo que se inicia la formación de lesiones arteroescleróticas (Wickens, 2001).

Según la evidencia con la que se cuenta hasta el momento, si se logra disminuir la generación de RL o se neutraliza su acción, se conseguiría reducir la instauración de estas condiciones logrando aumentar la longevidad y prevenir la muerte precoz.

Teniendo en cuenta, que en la literatura investigada en nuestro medio, no se hallaron antecedentes al problema, se considera de importancia realizar este estudio, porque los resultados obtenidos llenarían el vacío existente en esta área.

3. MARCO TEÓRICO

En 1956, Denham Harman propuso que los RL desencadenan el proceso de envejecimiento por daños al ADN y la función celular; en 1996 se elabora la teoría del estrés oxidativo.

Los radicales libres (RL) son compuestos que contienen uno o más electrones desapareados (Molina *et al.*, 2002). Son extremadamente reactivos, tendiendo a extraer un electrón de otras moléculas con el propósito de aparear el suyo, por lo cual, son agentes fuertemente oxidantes (Venereo, 2002). Resultan de procesos fisiológicos propios del organismo (metabolismo de nutrientes, la respiración y el ejercicio), o bien, generados por factores ambientales (contaminación industrial, tabaquismo, radiación, aditivos químicos en alimentos procesados y pesticidas) (Bennati *et al.*, 2008). Pueden causar daño oxidativo a numerosas macromoléculas biológicas, agrediendo los enlaces de proteínas de los tejidos, carbohidratos y ácidos nucleicos de las células, lo que acelera la reducción de colágeno y, por ende, el proceso de envejecimiento. También generan alteraciones mitocondriales que ocurren al envejecer por que se disminuye la cantidad máxima de energía que las células diferenciadas pueden producir durante condiciones de estrés o de sobrecarga funcional y, por tanto, se promueve disminución de la síntesis de proteínas y de la función especializada de órganos, como por ejemplo, el encéfalo y el corazón (Levine y Stadtman, 2001; Avello y Suwalsky, 2006). Al actuar, se activa una reacción en cadena que podría conducir a apoptosis celular. Lesionan la membrana celular por un proceso denominado peroxidación lipídica, que genera algunos productos de degradación, tales como aldehídos, entre los cuales sobresale el malondialdehído (MDA), que constituye un marcador de la peroxidación lipídica (Andreoli, 2000).

Diversos autores han clasificado los RL de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula. El tipo más frecuente encontrado es el Radical Libre del Oxígeno (RLO), en cuya estructura está presente el oxígeno como centro funcional. De menor preponderancia son los radicales tioles, que se caracterizan por contener azufre como grupo reactivo. Otros radicales descritos contienen carbono, fósforo o

nitrógeno como centro reactivo. Debido a la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los RLO son los más comunes. La mayoría de ellos, proceden de las reacciones metabólicas fisiológicas y se pueden incrementar por efecto de factores exógenos. Este grupo está constituido por el anión superóxido (O_2°), el radical hidroxilo (OH°) y los RL derivados de compuestos orgánicos: peroxilo ($R-O_2^{\circ}$) y alcoxilo (RO°). También se incluyen los compuestos reactivos tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (1O_2). Este último ha llevado a que se prefiera la denominación general de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) con el fin de incorporar a aquellas especies químicas que se comportan como oxidantes (peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, hidroperóxidos y metabolitos epóxido) y que no son RL (Paredes Salido y Roca Fernández, 2002).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a pesar de no poseer electrones no apareados, se considera una EROs por su capacidad de inactivar enzimas, atravesar membranas celulares y reaccionar con átomos de hierro y de cobre para generar radical hidroxilo (OH°) a través de la reacción de Fenton (Céspedes y Sánchez, 2000).

El OH° es un potente RL, más reactivo que el O_2° . Genera lesión principalmente al ADN, proteínas y lípidos, induciendo peroxidación lipídica y daño a las membranas, capaz de estimular la respuesta inflamatoria (Finkel y Holbrook, 2000).

El peroxinitrito ($ONOO^-$) se forma por la interacción entre O_2° y el óxido nítrico (NO°). Perpetúa la acción del primero, actuando como agente proinflamatorio; inactiva la enzima superóxido dismutasa (SOD), induce peroxidación lipídica y ocasiona depleción del glutatión; además, lesiona el ADN con inhibición de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y del ATP. Su degradación depende del ambiente químico celular, pero no de una enzima específica, no obstante, su capacidad oxidativa puede ser bloqueada por antioxidantes como el glutatión y las vitaminas C y E (Beckman *et al.*, 1990).

El estrés oxidativo (EOx) se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o

factores prooxidantes involucradas en la peroxidación lipídica (PL) y los mecanismos antioxidantes encargados de neutralizar y eliminar dichas especies químicas (Díaz Soto 2002; Rodríguez Perón *et al.*, 2001).

La PL es un proceso que ocurre fisiológicamente en todas las células y tejidos en concentraciones bajas; involucra la conversión oxidativa de ácidos grasos insaturados a productos primarios conocidos como hidroperóxidos (ROOH), pudiendo atacar los dobles enlaces, lo cual se deriva de un proceso de agresión por RL (Clapés *et al.*, 2001).

El mecanismo de la PL involucra tres reacciones en cadena: iniciación, prolongación y terminación. La primera, es promovida por diversas moléculas entre las que se destaca el radical hidroxilo (OH^\bullet) generado en la reacción de Haber-Weiss, en la que participan el anión superóxido (O_2^\bullet) y el hierro en estado oxidado (Fe^{3+}) y se forma un radical lipídico (R^\bullet) y comienza la fase de propagación, en la cual, este radical sufre reacciones de combinación o de adición con el oxígeno generándose radicales peroxilo orgánicos (ROO^\bullet), que tienen la capacidad de captar un átomo de hidrógeno formando hidroperóxidos (ROOH). En la fase de terminación ocurre la combinación de los productos de PL (radicales lipídicos) para originar radicales no lipídicos tipo manodialdehído (MAD) o el 4-hidroxi-alqueno (4HNE), como productos finales de la reacción (Díaz *et al.*, 1998; Clapés *et al.*, 2001).

El MDA es un producto generado durante la oxidación de moléculas lipídicas que incluye tanto la síntesis de prostaglandinas, como de tromboxanos a partir del ácido araquidónico (en menor proporción), como también, de la peroxidación de lípidos (su fuente principal). El hígado elimina el MDA de la circulación por la acción de las enzimas del sistema aldehído deshidrogenasa y la tioquinasa. En sangre, es transportado por las LDL, a las que oxida modificando su apolipoproteína B_{100} (Clapés *et al.*, 2001).

El organismo posee un sistema de defensa antioxidante constituido por un grupo de compuestos que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Como

sustrato oxidable se pueden considerar la mayoría de las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas (proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN) (Beristain *et al.*, 2003).

Los antioxidantes al actuar de forma complementaria y sinérgica impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar e interactuar más rápido con los RLO y las EROs que con el resto de moléculas presentes en un determinado microambiente, membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadores con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante / antioxidante a favor de estos últimos (Díaz Soto, 2002).

De acuerdo a su origen los antioxidantes pueden clasificarse en endógenos o exógenos; los primeros agrupan a enzimas como por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), los cuales no se consumen al reaccionar con los RL y son dependientes de cofactores tales como el cobre, hierro, zinc, magnesio y selenio; y los exógenos que provienen de la dieta como las vitaminas E y C, los β -carotenos y los flavonoides; a diferencia de las enzimas se consumen al reaccionar con los RL, por ello, deben ser reemplazados (Paredes Salido y Roca Fernández, 2002).

De acuerdo al sitio de acción los antioxidantes se clasifican en intracelulares, de membrana y extracelulares. Entre los primeros se destacan: SOD, CAT, GPx, DT-deaforasa, glutatión (GSH), las proteínas que ligan metales, los sistemas proteolíticos y la vitamina C. Los antioxidantes de membrana son la vitamina E, los β -carotenos y el ubiquinol-10 (Q-10), y entre los extracelulares sobresalen: ceruloplasmina, transferrina, lactoferrina, albúmina, haptoglobina, vitaminas C y E, y el ácido úrico (Venereo, 2002).

La SOD (E.C. 1.15.1.1), fue descubierta por McCornd y Fridovich en 1969. Es un homodímero con PM de 32,5 kDa; sus cadenas están unidas por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Elchuri, *et al.*, 2005). Constituye la primera fase de defensa antioxidante y cataliza la reacción de demutación del $O_2^{\circ-}$ mediante su

transformación en H_2O_2 , el cual puede ser anulado, a su vez, por las actividades de la CAT o de la GPx (Díaz Soto, 2002).

Se encuentra distribuida ampliamente en el organismo. Existen diversas isoformas dependiendo del metal que contenga en su centro catalítico (cobre, zinc, magnesio o hierro) y de su *locus* celular: Cu/Zn SOD en eucariotas, Mn-SOD en mitocondrias; Fe-SOD en bacterias. A su vez, la Cu/Zn SOD se subdivide en citoplasmática y mitocondrial (Muller, *et al.*, 2006). La citosólica (SOD-1), se encuentra en forma de homodímero. La mitocondrial (SOD-2), es un homotetrámero con un átomo de manganeso en su sitio activo (Mn-SOD: PDB 1N0J, EC 1.15.1.1). Los ligandos de los iones de manganeso son: tres cadenas laterales de histidina, una de aspartato y una de agua; o un ligando hidroxilo dependiendo del estado de oxidación del Mn (2^+ y 3^+ respectivamente) (Sentman, *et al.*, 2006). La SOD extracelular (Ec - SOD; SOD-3) es una glicoproteína hidrofóbica de aproximadamente 135 KDa, contiene un átomo de cobre y otro de zinc en cada subunidad. Se encuentra como tetrámero, sin embargo, ocasionalmente, se ha hallado formando dímeros (Fattman *et al.*, 2003). El tetrámero está compuesto de dos dímeros unidos por puentes disulfuro. Esta isoforma se localiza fundamentalmente en corazón, pulmón, vasos sanguíneos, placenta y riñón. Su función es cooperar con la lisis de parásitos digeridos o encapsulados durante la “explosión respiratoria” generada durante la fagocitosis (Garcia *et al.*, 1997).

La GPx (E.C. 1.11.1.9), enzima que cataliza la reducción de H_2O_2 a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH) y se localiza en el citosol (eritrocitos) o en los lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune) (Díaz Soto, 2002). Está constituida por cuatro subunidades idénticas. Comparte su sustrato con la CAT, pero además, puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2) usando GSH, que es transformado en glutatión oxidado (GSSG); así, contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo (Cárdenas y Davies, 2000).

Existen dos isoformas: la selenio dependiente y la selenio independiente y, en vertebrados su expresión es ubicua, localizándose en el citosol y en las mitocondrias (Cisneros y Céspedes, 1997). En mamíferos se han aislado al menos cinco isoenzimas y la concentración de cada una varía dependiendo del tipo de tejido. La citosólica (GPx1), celular o clásica; predomina en eritrocitos, riñón e hígado. GPx-2: gastrointestinal (GPx-GI). GPx-3: extracelular o plasmática (GPx-P); se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, a excepción, del tracto intestinal y el riñón, respectivamente, GPx-4 (PHGPx) hidropéroxidasa de fosfolipídica se expresa mayoritariamente en células del epitelio renal y en los testículos. Éstas, tienen el mayor papel antioxidante en los compartimentos celulares y en el intersticio. Eliminan tanto hidropéroxidos orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H_2O_2). Recientemente se ha encontrado la GPx5, que es independiente de selenio la cual se expresa específicamente en el epidídimo de ratón (Cisneros *et al.*, 1997; Vanda *et al.*, 2007; Cárdenas y Davies, 2000).

La GPx1 reduce los hidropéroxidos de ácidos grasos y el H_2O_2 a expensas del glutatión. La GPx4 está asociada a membrana y es la responsable directa de la destrucción reductiva de los hidropéroxidos lipídicos de los fosfolípidos, peróxidos de ácidos grasos e hidropéroxidos de colesterol, que se generan en las membranas peroxidadas y en las lipoproteínas oxidadas (Cárdenas y Davies, 2000).

El ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección contra niveles bajos de EOx, pero la CAT tiene papel más trascendental en la protección frente al estrés oxidativo severo. En células animales, y especialmente, en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la destoxificación de H_2O_2 es la GPx, por que la CAT presenta menos afinidad por el H_2O_2 (Cárdenas y Davies, 2000).

En la actualidad, varios autores han postulado diversas teorías que explicarían los mecanismos promotores del proceso del envejecimiento, las cuales ofrecen explicaciones de las causas y efectos de este proceso, que es similar en los diferentes niveles de organización biológica (tisular, celular y molecular) tanto en el hombre como en cualquier otro ser multicelular: descenso progresivo de los valores máximos de rendimiento fisiológico, disminución del número de células que se

encuentran en los epitelios germinales y cambios atróficos o apoptosis de las células diferenciadas, acompañados en el ámbito subcelular, por descenso del número de ribosomas y de mitocondrias, y acumulación del pigmento del envejecimiento, la lipofuscina (Miquel, 2006; Vargas *et al.*, 2007). De todas las teorías de mayor relevancia son: La de los RLO, la de las mitocondrias, la de las membranas y la de los telómeros (Pardo, 2003).

En el año 1956 Harman y Gerschman, independientemente, establecieron la teoría de los RL, la cual afirma que el envejecimiento está ligado a desorganización celular por el estrés oxidativo causado por RL y EROs, cuyas concentraciones incrementadas promueven oxidación y degradación de biomoléculas (Zorrilla, 2002).

Harman D. en 1972 y Miguel J. *et al.*, en 1980, establecieron lo que se conoce como la “teoría de las mitocondrias”. Estos autores señalan que el envejecimiento depende del funcionamiento correcto de las mitocondrias, sitio donde se origina el 90% de los RLO. En estos organelos ocurre la fosforilación oxidativa, proceso en el cual hay transferencia de electrones que finalmente genera energía (ATP). Si existen cambios estructurales en el genoma de las mitocondrias de las células diferenciadas como principal diana de las EROs se induciría pérdida natural de electrones hasta el punto que puede sobrepasarse la capacidad antioxidante, y como consecuencia, se aumentarían las degradaciones moleculares de proteínas estructurales, de enzimas, lípidos, DNA y se aceleraría el proceso de envejecimiento biológico (Sastre *et al.*, 2000; Bieslski, 2002).

La teoría denominada de los telómeros fue establecida por Hayflick en 1982. Es independiente de las anteriores, no obstante, tienen como denominador común los RL. Los telómeros son las porciones terminales de los cromosomas que repiten millares de bases con la secuencia TTAGGG. En cada replicación celular, la enzima telomerasa, encargada de la replicación de los telómeros, no lo hace completamente dejando siempre una pequeña secuencia sin replicar. Después de 40-50 divisiones celulares, la célula no se puede replicar más por falta de ADN telomérico, por lo tanto, ocurre un proceso de apoptosis celular. De hecho, los telómeros actúan como un reloj biológico de las células. A lo largo de generaciones,

las células nuevas ("jóvenes") varían la expresión génica y con el transcurso de los años, no se expresan genéticamente como lo hacían sus predecesoras veinte o treinta años atrás. Este hecho es también un condicionante del proceso del envejecimiento biológico (Pardo, 2003). El Premio Nobel de Medicina 2009, que concede el Instituto Karolinska de Estocolmo, fue otorgado a Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Jack W. Szostak descubridores de los telómeros y la enzima telomerasa cuyas implicaciones afectan tanto al proceso del envejecimiento como del cáncer.

Zs-Nagy en 1994 estableció la teoría de las membranas. Este autor observó que el proceso de envejecimiento se caracterizaba por acumulación de una sustancia denominada lipofucsina (lípidos que se tiñen por el colorante de la fucsina) generada como consecuencia de la oxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares, y su depósito progresivo originaba invasión del espacio intracelular inhibiéndose sus funciones, siendo una de las causas, como también, consecuencia concreta de la sobreproducción de RL (Pardo, 2003).

Los estudios actuales están enfocándose a analizar el impacto que tienen las ER derivadas o no de oxígeno en el proceso de envejecimiento, como una pauta para comprender el mecanismo sistemático que siguen estas moléculas para iniciar el deterioro o la apoptosis celular. Si bien, el proceso de envejecimiento depende de varios factores, el EOx es un aspecto crucial en el desarrollo del mismo, porque una vez iniciado el daño por los RL, éste puede generar una reacción en cadena que, aunada a la incapacidad de los sistemas antioxidantes endógenos para controlar el incremento en la producción de los RL, termina por inducir afecciones letales en la fase de vejez (Paredes Salido y Roca Fernández, 2002).

La presente investigación, contribuye a acrecentar los resultados obtenidos por otros investigadores en la línea: Clínico-Genético-Molecular en dislipoproteinemias. Línea: Factores de riesgo cardiovascular (sistemas de oxidación y antioxidación); cumpliendo un papel de respaldo ante investigaciones previas, y como referencia, para futuros estudios. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Evaluar la relación oxidación/ antioxidación durante el proceso de envejecimiento, valorando la asociación existente entre las enzimas antioxidantes citoplasmáticas: CuZn-superóxido dismutasa (CuZn-SOD), Se-glutación peroxidasa (Se-GPx), y el malondialdehído (MDA) en pacientes de la tercera edad.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar mediante técnicas colorimétricas, enzimáticas y cinéticas el estado de antioxidantes totales (TAS: *Total Antioxidant Status*) y las actividades de las enzimas antioxidantes citoplasmáticas: CuZn-superóxido dismutasa (CuZn-SOD) y selenio-glutación peroxidasa (Se-GPx), respectivamente, en pacientes de la tercera edad.
- Valorar mediante ensayo enzimático-colorimétrico la producción de malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica en pacientes de la tercera edad.
- Relacionar la actividad de las enzimas antioxidantes CuZn-SOD, Se-GPx y MDA en individuos de la tercera edad y adultos, y agrupados por género.
- Comparar los resultados obtenidos con investigaciones realizadas por otros autores en diversas latitudes.

5. METODOLOGÍA

Los resultados de este trabajo fueron tomados de una base de datos de estudios previos realizados por el grupo de investigación Clínico-Genético-Molecular en Dislipoproteinemia. Línea: Oxidación/antioxidación en diversas condiciones. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

La muestra estuvo constituida por 100 adultos mayores de la ciudad de Bogotá, D.C. Colombia, de similares condiciones socioeconómicas, con edades comprendidas entre 60 y 80 años, seleccionados en el Hogar Geriátrico San Francisco de Asís. El grupo control (n: 100) lo conformaron individuos aparentemente saludables (edad 30-50 años), para lo cual se aplicó una encuesta en donde se indagó acerca de los antecedentes médicos, personales y familiares y, hábitos tales como el tabaquismo, sedentarismo, etc.; se les comunicó acerca de las características e importancia del estudio y se obtuvo su consentimiento por escrito, el cual, sigue las directrices establecidas por la legislación colombiana (Londoño *et al.*, 1993).

Las condiciones preanalíticas fueron las recomendadas mundialmente para este tipo de determinaciones. La muestra se obtuvo mediante venopunción directa con agujas múltiples, utilizando tubos con anticoagulantes EDTA y heparina a una concentración final de 1 mg/mL (Vacutainer®). Con el primero, se valoró la hemoglobina total, posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma y en él se determinó MDA. El tubo que contenía heparina se centrifugó para separar los glóbulos rojos. Éstos se hemolizaron para determinar las actividades de la CuZn-SOD y Se-GPx y en el plasma se cuantificó TAS.

Los métodos de los analitos en estudio fueron: Hemoglobina, por la técnica de Cianometahemoglobina (Drabkin *et al.*, 1935); las actividades de CuZn-SOD y de Se-GPx (U/L) mediante las metodologías de Woolliams *et al.*, (1983) y de Paglia y Valentine (1967), respectivamente (Laboratorios Randox) y se relacionaron con los gramos de hemoglobina existentes (U/gHb). TAS por la técnica

de Miller *et al.*, (1993) (Laboratorios Randox), y el MDA fue evaluado como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA: *Thiobarbituric Acid*) mediante el ensayo de peroxidación lipídica (Gallou *et al.*, 1993-Calbiochem). Se utilizaron controles de calidad normal y anormal (Sera-Chek; Siemens y Calbiochem) y para controlar la eficiencia de los instrumentos, calibradores de concentración conocida (Siemens). Todos los ensayos se realizaron por duplicado (estándares, muestras, controles de calidad).

El análisis de la información, desde el punto de vista estadístico, se realizó usando la prueba t de Student para dos medias poblacionales, en el caso de la comparación por pares de grupos de los parámetros en estudio. Previo a estas pruebas, se realizó la prueba F de comparación de varianzas. Se empleó además, el análisis de correlación de Pearson (r) para medir la intensidad de la relación de dos variables de interés dentro de cada grupo. En este caso, teniendo en cuenta los tamaños muestrales y aplicando el teorema del límite central, no fue necesario hacer pruebas de normalidad para las poblaciones involucradas en el estudio.

Las valoraciones de los analitos en estudio se realizaron en el laboratorio de la Especialización en Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. Colombia, en los instrumentos RA-50 (Siemens).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

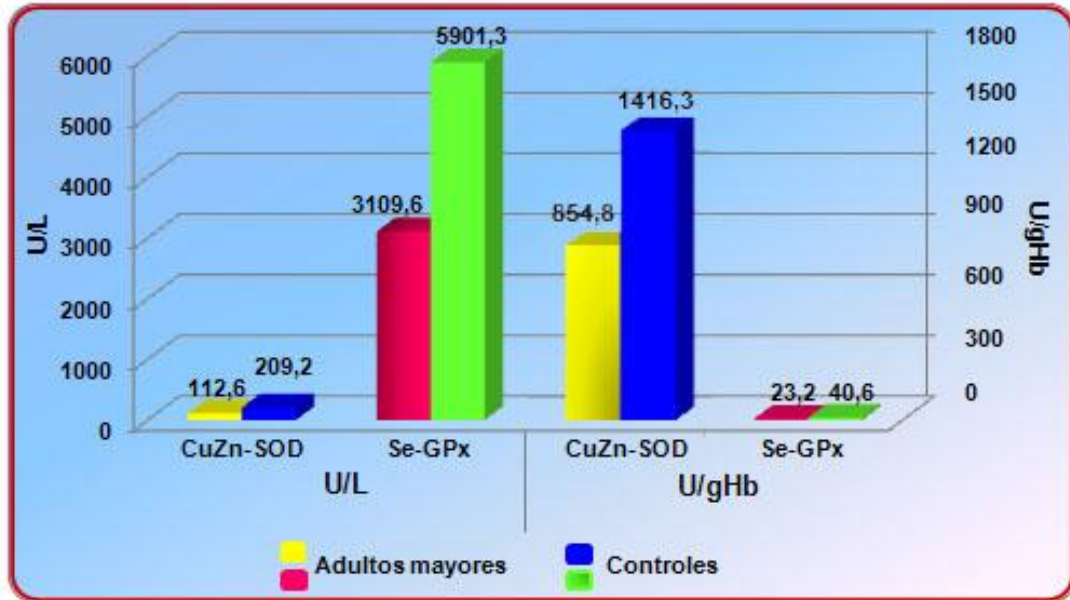
En este estudio se valoró la asociación existente entre algunos marcadores de estrés oxidativo prooxidantes (MAD), y antioxidantes [estado de antioxidantes totales (TAS: *Total Antioxidant Status*) y actividad de las enzimas citosólicas: Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) y la selenio-glutatiión peroxidasa (Se-GPx)] en 100 adultos mayores (n: 50 hombres y 50 mujeres) y controles en igual número y género.

Los promedios, las desviaciones estándar de los analitos valorados y la conversión de la actividad de las enzimas (U/L) a gramos de hemoglobina (U/gHb) de los adultos mayores y controles se muestran en la Tabla 1 y en las Gráficas 1 y 2.

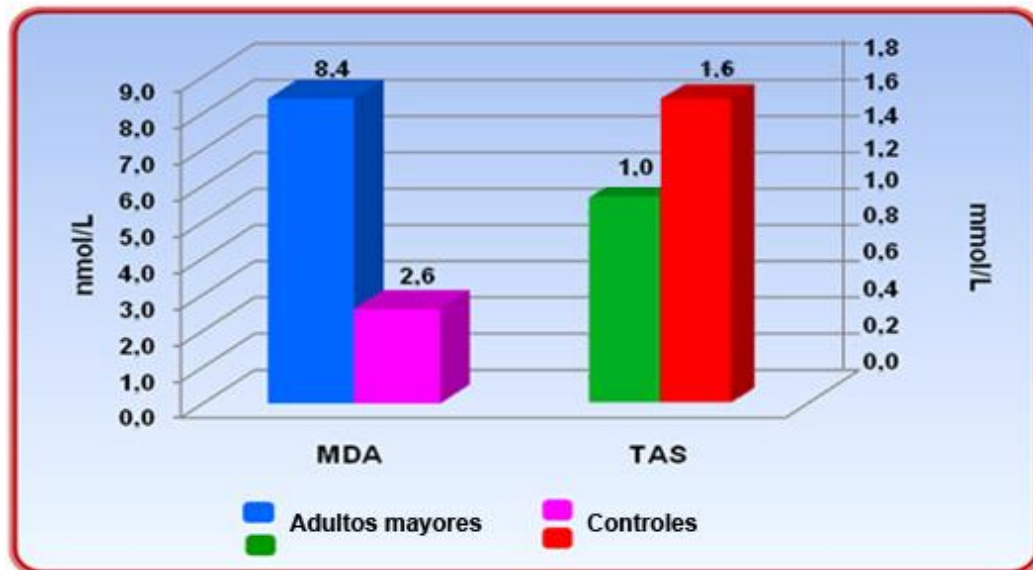
Tabla 1. Promedios y desviaciones estándar de hemoglobina (g/dL), actividades de CuZn-SOD y Se-GPx (U/L), su relación con la Hb (CuZn-SOD U/gHb y Se-GPx U/gHb), TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L), de adultos mayores y controles. Bogotá DC.

Analitos	ADULTOS MAYORES		CONTROLES	
	X	S	X	S
Hb g/dL VR: 12 - 16	14,4	0,9	14,5	0,9
CuZn-SOD U/L VR: 164 - 240	107,8	26,0	204,5	22,2
CuZn-SOD U/gHb VR: 1092 - 1817	751,0	189,0	1415,4	171,1
Se-GPx U/L VR: 4171 - 10881	2833,8	679,3	5773,2	872,1
Se-GPx U/gHb VR: 27,5 - 73,6	19,7	4,7	39,9	6,2
TAS mmol/L VR: 1,30 - 1,77	1,0	0,2	1,6	0,1
MDA nmol/L VR: 0,25 - 5,0	8,4	1,8	2,6	1,0

Grafica 1. Comparación de los promedios de la CuZn-SOD y la Se-GPx en (U/L) y su relación con la hemoglobina (U/gHb) en adultos mayores y controles. Bogotá DC.



Gráfica 2. Comparación de los promedio del MDA (nmol/L) y de TAS (mmol/L) en adultos mayores y controles. Bogotá DC.



Se observó disminución estadísticamente significativa de TAS, de las actividades de las enzimas citoplasmáticas CuZn-SOD y Se-GPx (U/L) y de su relación con los gramos de hemoglobina (U/g Hb) en los adultos mayores al confrontarlos con los controles ($p < 0,05$). Los resultados de MDA (nmol/L) mostraron comportamiento inverso, siendo significativo ($p < 0,05$). Estos resultados fueron similares a los reportados por Bhatia *et al.* (2003).

Existen evidencias científicas en el campo de la biogerontología con respecto a que el EOX se incrementa conforme aumenta la edad, evidenciado por la cuantificación de TAS, de las enzimas citoplasmáticas antioxidantes intracelulares SOD, GPx y del MAD (Finkel y Holbrook, 2000).

Las defensas antioxidantes extracelulares se valoran a través de la denominada capacidad o estado antioxidante total (TAS), en la cual se considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en el plasma y los fluidos corporales, siendo un parámetro integrado, y no la simple suma de antioxidantes medidos (Ghiselli *et al.*, 2000).

El envejecimiento y la disminución de la longevidad parecen ser ocasionados, en parte, por acción de los RL inductores de diversas reacciones de oxidación enzimática. Algunos trabajos realizados por Cutler, (2004), indican que existe correlación positiva entre la longevidad máxima de una especie y la concentración de antioxidantes fisiológicos, como por ejemplo las enzimas CuZn-SOD, y Se- GPx.

Investigaciones recientes han demostrado que el sistema antioxidante enzimático pierde eficacia con el envejecimiento, lo cual se evidencia por decrementos en las actividades de CuZn-SOD, y Se- GPx, situación que podría ser explicada por la saturación de los sistemas antioxidantes enzimáticos, como también, por inhibición de las enzimas antioxidantes, como proponen Jira *et al*, 2000. Nuevos estudios realizados en bacterias, moscas y ratas, han demostrado que la atenuación progresiva que experimenta la capacidad antioxidante enzimática con el envejecimiento se debe a reducción de la expresión génica para estas enzimas. A su vez, los efectos biológicos más marcados como por ejemplo, aumento en la

sobrevida, o resistencia al EOX, han sido reconocidos en estos organismos manipulados genéticamente para expresar sobreactividad de la SOD y la GPx; sin embargo, existe controversia en investigaciones realizadas en humanos (Jayakumar, *et al.*, 2006).

La SOD constituye la primera línea de defensa antioxidante; cataliza la reacción de dismutación de los radicales superóxido ($O_2^{\circ-}$) abstrayendo un electrón para originar H_2O_2 , la segunda reacción es la reducción de este compuesto a H_2O y O_2 catalizada por la CAT o GPx. El desequilibrio entre la primera y la segunda reacción tiene el potencial de incrementar H_2O_2 y el OH^{\bullet} intracelular, promoviendo senescencia celular tanto de cultivos celulares como en eritrocitos humanos (Muchová *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la actividad baja de la SOD es derivada de las concentraciones elevadas de H_2O_2 generados durante la reacción, que inhiben la enzima por retroalimentación negativa (Muller, *et al.*, 2006). La actividad disminuida de la CuZn-SOD hallada son semejantes a las obtenidas por Seclen-Santisteban *et al.* (2006).

La Se-GPx constituye una de las defensas primarias del ciclo redox; cataliza la reducción del H_2O_2 o lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH), lo que sugiere que en condiciones fisiológicas, esta enzima lo degrada primariamente, teniendo en cuenta el contenido alto de glutatión GSH en los glóbulos rojos (Vergara, *et al.*, 2000). Su principal función bioquímica la ejerce en las reacciones celulares de oxidorreducción para protección celular contra daños oxidativos (defensa antioxidante) promovidos por RL y peróxidos, por lo que está involucrada en la fisiopatología de diferentes procesos como por ejemplo, el envejecimiento.

Así, la actividad baja de GPx observada en los adultos mayores estudiados sugiere existencia de estrés oxidativo, o bien, que los sistemas de regeneración del glutatión funcionan inadecuadamente. Aún en condiciones fisiológicas, Matheus y López, (2008) encontraron que la actividad de GPx determinada en ratas, disminuye a medida que avanza la edad.

Diversas investigaciones han señalado que la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes o de TAS, habitualmente, no indican una condición indeseable si los niveles de especies oxidantes se encuentran en concentraciones bajas aceptables, de ahí, que se puede asegurar que si los componentes del sistema antioxidante están disminuidos, no siempre se debe a la insuficiencia de este sistema, sino a que pueden estar actuando de manera eficiente contra las EOx para evitar que se genere desequilibrio a favor de estos últimos y lesionen las células, o a que no sean necesarios porque no existan compuestos oxidantes que degradar (Dröge, 2002).

La hipótesis de la acción de los RL en el proceso de envejecimiento propuesta por Harman en 1957 se basa en la posibilidad de generación de moléculas altamente reactivas que reaccionan con biomoléculas, lo que causa lesión oxidativa irreparable e irreversible que se acumula con el tiempo y conduce a pérdida gradual de la capacidad funcional (Céspedes *et al.*, 2000; Vijg y Suh, 2005). Así, los productos reactivos al ácido tiobarbitúrico son indicadores de la peroxidación lipídica (PL) por acción de los RLO sobre los ácidos grasos poliinsaturados mediante un mecanismo de reacción en cadena, originando hidroperóxidos los que se degradan a gran variedad de productos, y pueden ser cuantificados por diferentes metodologías. El procedimiento más comúnmente utilizado en los tejidos y fluidos humanos es la medición del MDA acoplado a ácido tiobarbitúrico (TBA: *Thiobarbituric Acid*), que origina un cromógeno (TBARS: *Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*), considerado el método de elección en estudios epidemiológicos. Por tal motivo, su determinación constituye herramienta muy importante en el estudio del balance oxidación/antioxidación en humanos (Finkel y Holbrook, 2000; Gil *et al.*, 2002).

Las concentraciones marcadas de MAD obtenidas en este trabajo, sugieren posible existencia de PL, generada particularmente por el radical hidroxilo (OH^*), sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Estos hallazgos son semejantes a los encontrados por Sivonova *et al.*, (2006) quienes observaron incremento acelerado de la PL con la edad. A su vez, Jayakumar *et al.*, (2006) hallaron concentraciones elevadas de MAD, en ratas envejecidas.

En la estimación de los parámetros evaluados en los adultos mayores y sus controles, se utilizaron intervalos de confianza del 95% para la media poblacional; éstos permitieron determinar el rango dentro del cual fluctuaron los promedios de cada parámetro (Tabla 2).

Tabla 2. Intervalos de confianza del 95% para los niveles promedio poblacionales de TAS, CuZn-SOD U/L, CuZn-SOD U/gHb, Se-GPx U/L y Se-GPx U/gHb, TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L) para los adultos mayores y controles.

LÍMITES	ADULTOS MAYORES	CONTROLES
Hb g/dL (VR 12 - 16)		
Inferior	14,2	14,3
Superior	14,6	14,7
CuZn-SOD U/L (VR 164 - 240)		
Inferior	102,7	200,1
Superior	112,9	208,9
CuZn-SOD U/gHb (VR 1092 - 1817)		
Inferior	715,0	1381,8
Superior	789,7	1448,9
Se-GPx U/L (VR 4171 - 10881)		
Inferior	2702,9	5602,3
Superior	2964,8	5944,1
Se-GPx U/gHb (VR 27,5 - 73,6)		
Inferior	18,8	38,7
Superior	20,7	41,2
TAS mmol/L (VR 1,3 - 1,77)		
Inferior	1,0	1,5
Superior	1,0	1,6
MAD nmol/L (VR 0,25 - 5,0)		
Inferior	8,0	2,4
Superior	8,7	2,8

Para hacer las comparaciones entre adultos mayores y controles se realizaron las pruebas de hipótesis (*prueba t de student*) de comparaciones de medias poblacionales. Los valores *p* de estas pruebas se describen en la Tabla 3, en la cual se puede observar que existen diferencias significativas entre los analitos valorados

en los dos grupos. La elección de la prueba en cada caso, se fundamentó en la prueba F de comparación de varianzas.

Con los valores p se evidencia que existen diferencias significativas en los dos grupos (adultos mayores y controles) en relación a cada uno de los parámetros analizados, excepto para la hemoglobina.

Tabla 3. Valores p de las pruebas de comparación de los parámetros de Hb, CuZn-SOD, Se-GPx, TAS y MDA en adultos mayores y controles.

Parámetro	Valor p	Significancia S*
Hb g/dL	0,33347767	NS
CuZn-SOD U/L	0,0054524802	S
CuZn-SOD U/g Hb	0,014383553	S
Se-GPx U/L	0,004277332	S
Se-GPx U/g Hb	0,003356031	S
TAS mmol/L	0,015520365	S
MDA nmol/L	6,10656E-08	S

S*: significativo ($p < 0,05$). NS: No significativo ($p > 0,05$).

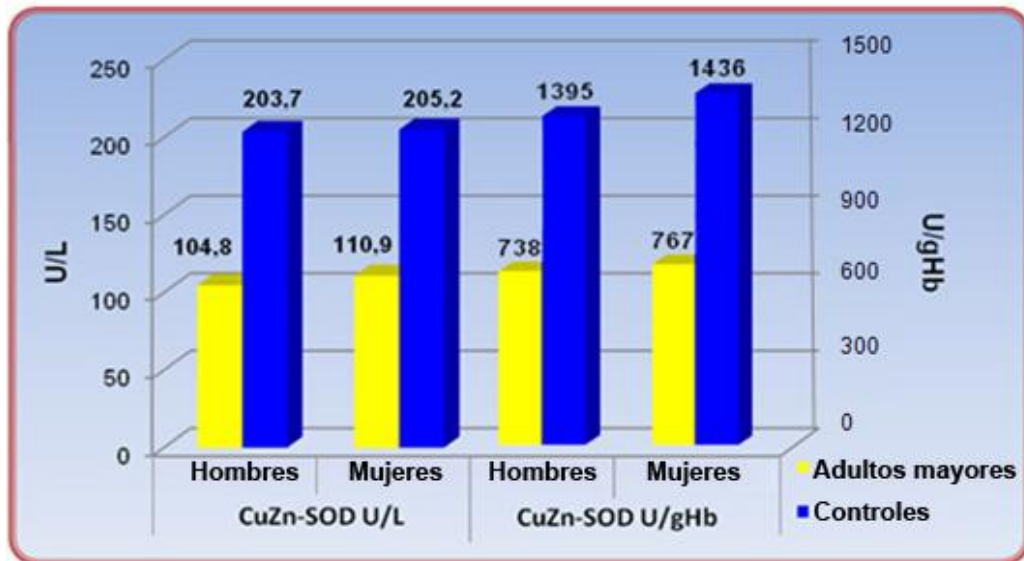
Los adultos mayores motivo de este estudio, se agruparon por género. Se encontró que el potencial antioxidante de ambos grupos era menor que el de los controles, evidenciado por los promedios de TAS (nmol/L), de las actividades de Cu/Zn-SOD y de Se-GPx (U/L) y su comparación con los gramos de Hb (U/gHb) (Tabla 4 y Gráficas 3 y 4). Éstos son análogos a los obtenidos por Alvarez y Boveris (2004). Sin embargo, existió tendencia a resultados superiores en las mujeres, sin que fueran estadísticamente significativos ($p > 0,05$). Estudios realizados por Andresen *et al.*, 2006 y por Borrás Blasco, 2003, revelaron comportamiento similar. En contraste, los promedios de las concentraciones de MDA (mmol/L) (Tabla 4 y Gráfica 4), exhibieron comportamiento inverso (incrementos marcados) altamente significativos ($p < 0,05$). Recientemente Inal, *et al.*, (2001) hallaron semejanza en investigaciones

realizadas, en donde correlacionaron la existencia de estrés oxidativo con la edad y con el género. Lo anterior permite especular que el comportamiento de los elementos que participan en los procesos de oxidación/antioxidación, son dependientes del envejecimiento e independiente del género, guardando relación lineal, como lo demostró Haffner (2000).

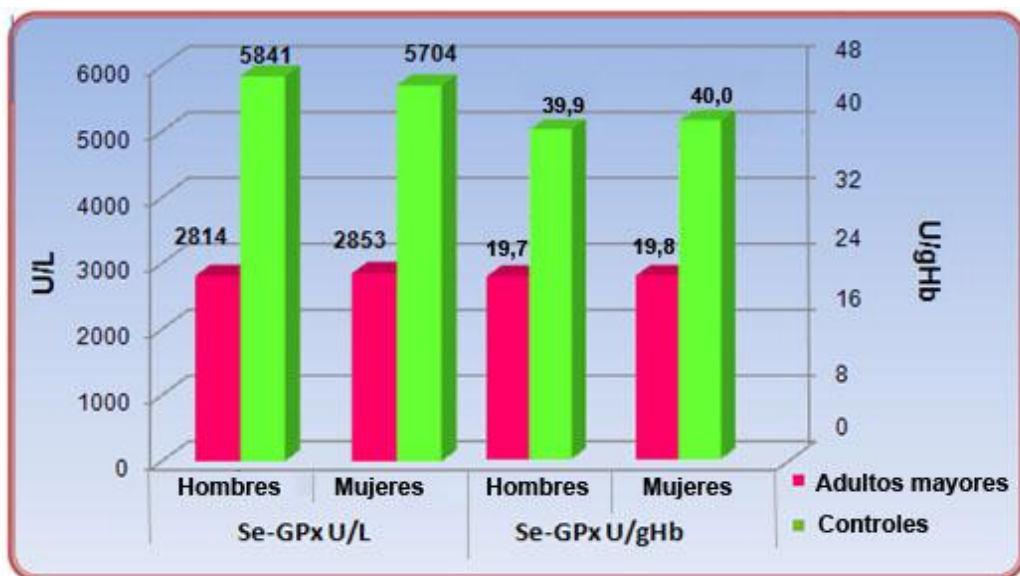
Tabla 4. Promedios y desviaciones estándar de hemoglobina, actividades de CuZn-SOD y Se-GPx (U/L), su relación con la Hb (CuZn-SOD U/gHb y Se-GPxU/gHb), TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L), agrupados por género (Adultos mayores vs. Controles).

Analitos	MUJERES				HOMBRES			
	MAYORES		CONTROLES		MAYORES		CONTROLES	
	X	S	X	S	X	S	X	S
Hb g/dL VR: 12-16	14,5	0,79	14,3	0,9	14,3	1,0	14,7	1,0
CuZn-SOD U/L VR: 164-240	110,9	28,4	205,2	22,1	104,8	23,3	203,7	22,4
CuZn-SOD U/gHb VR: 1092-1817	767,0	201,3	1436	168,5	738,0	179,8	1394,8	173,0
Se-GPx U/L VR: 4171-10881	2853,0	683,2	5704,5	790,8	2814,6	659,0	5841,8	949,5
Se-GPx U/gHb VR: 27,5-73,6	19,8	5,0	40,0	6,2	19,7	4,5	39,9	6,2
TAS mmol/L VR: 1,30-1,77	1,0	0,1	1,6	0,1	1,0	0,2	1,6	0,1
MDA nmol/L VR: 0,25-5,0	8,7	1,6	2,6	0,9	9,1	1,6	2,6	1,1

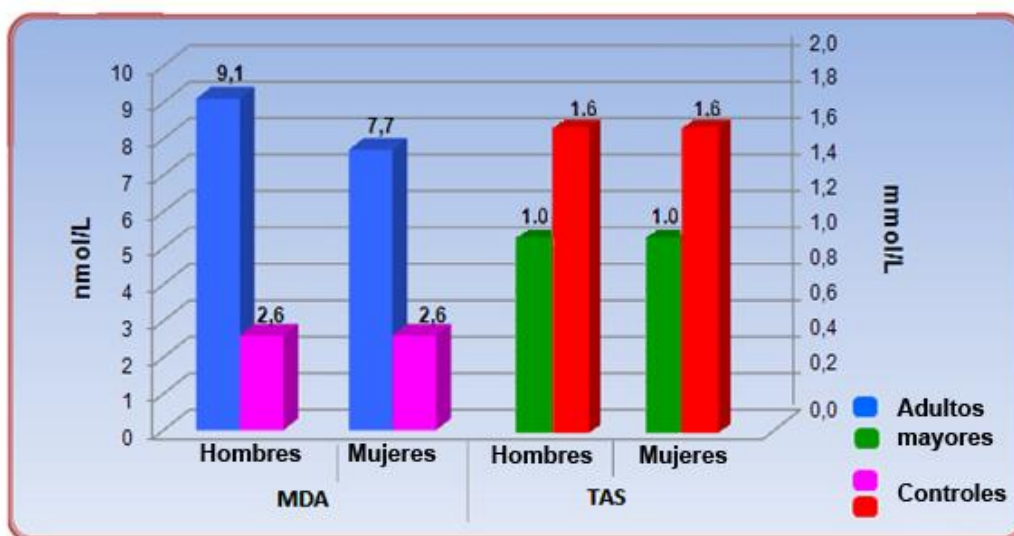
Grafica 3. Comparación de los promedios de la CuZn-SOD en (U/L) y (U/gHb) de adultos mayores y controles por género. Bogotá DC.



Grafica 4. Comparación de los promedios de la Se-GPx (U/L) y (U/gHb) de adultos mayores y controles por género. Bogotá DC.



Gráfica 5. Comparación de los promedios de TAS (mmol/L) (U/L) y de MDA (nmol/L) de adultos mayores y controles por género. Bogotá DC.



A los resultados obtenidos en estos individuos, se les realizó intervalos de confianza (Tabla 5) y la prueba t de Student (Tabla 6) sobre la diferencia de medias (comparación de los parámetros poblacionales) similar a lo efectuado en la población total (adultos mayores vs controles).

Tabla 5. Intervalos de confianza de la media poblacional entre hombres y mujeres adultos mayores y sus controles. Bogotá DC.

MUJERES			HOMBRES		
LIMITES	ADULTOS MAYORES	CONTROLES	LIMITES	ADULTOS MAYORES	CONTROLES
Hb g/dL (VR 12 -16)					
Inferior	14,3	14,1	Inferior	14,0	14,4
Superior	14,7	14,6	Superior	14,6	14,9
CuZn-SOD U/L (VR 164 - 240)					
Inferior	103,0	199,1	Inferior	98,3	197,4
Superior	118,8	211,4	Superior	111,2	209,9
CuZn-SOD U/Hb (VR 1092 -1817)					
Inferior	711,2	1389,0	Inferior	687,8	1347,0
Superior	822,9	1483,0	Superior	787,4	1443,0
Se-GPx U/L (VR 4171 - 10881)					
Inferior	2663,7	5485,3	Inferior	2632,0	5578,7
Superior	3042,4	5923,7	Superior	2997,3	6105,0

Se-GPx U/Hb (VR 27,5 - 73,6)					
Inferior	18,4	38,0	Inferior	18,4	38,0
Superior	21,2	42,0	Superior	20,9	42,0
TAS mmol/L (VR 1,3 - 1,77)					
Inferior	1,0	1,5	Inferior	0,9	1,5
Superior	1,1	1,6	Superior	1,0	1,6
MAD nmol/L (VR 0,25 - 5,0)					
Inferior	7,2	2,3	Inferior	8,6	2,3
Superior	8,1	2,8	Superior	9,6	2,9

Tabla 6. Valores p de las pruebas de comparación entre los hombres y mujeres adultos mayores en los parámetros: Hb (g/dL), Cu/Zn-SOD (U/L), CuZn-SOD (U/gHb), Se-GPx (U/L), Se-GPx (U/gHb), TAS (mmol/L) y MDA (nmol/L). Bogotá DC.

Mujeres vs Hombres	Valor p	Significancia
Hb g/dL	0,06276117	NS
CuZn-SOD U/L	0,084513637	NS
CuZn-SOD U/g Hb	0,214946234	NS
Se-GPx U/L	0,400880085	NS
Se-GPx U/g Hb	0,212087382	NS
TAS mmol/L	0,387513041	NS
MDA nmol/L	0,441832199	NS

S*: significativo ($p < 0,05$). NS: No significativo ($p > 0,05$).

Basados en la propuesta de Beristain, *et al.*, (2006) de realizar un constructo que permitiera evaluar los grados de estrés oxidativo, y la enunciada por Sánchez-Rodríguez *et al.*, (2000) para valorar integralmente el EOX, mediante el coeficiente de la relación U/gHb entre CuZn-SOD y la Se-GPx como buen estimador del balance celular entre las enzimas antioxidantes, en el presente estudio, se buscó este cociente en los individuos saludables (controles), utilizando tanto la regla de Chebyshev como sucesivas pruebas de hipótesis sobre la relación promedio CuZn-SOD/Se-GPx (previa conversión de la actividad enzimática a gramos de hemoglobina), hallándose el punto de corte de 0,035. Por ello, relaciones $> 0,035$ suponen existencia de desbalance celular entre las enzimas antioxidantes, como se obtuvo en el cociente U/gHb CuZnSOD/Se-GPx (0,038).

6. CONCLUSIONES

Los adultos mayores, mostraron menor actividad en las enzimas CuZn-SOD, Se-GPx y de TAS, al confrontarlos con los controles.

Las concentraciones de TAS y las actividades bajas de las enzimas CuZn-SOD, Se-GPx encontradas en los adultos mayores puede ser reflejo de incrementos de RLO y predisposición a desarrollar fenómenos que conducen a complicaciones adversas.

En los adultos mayores, las concentraciones de MDA, como marcador de peroxidación lipídica, exhibieron incremento estadísticamente significativo, al confrontarlos con los controles.

Los adultos mayores agrupados por género exhibieron resultados similares a los observados en la población total, sin embargo, las mujeres mostraron tendencia a ligeros incrementos, sin que fueran estadísticamente significativos. Esto permite suponer que el sistema oxidación/antioxidación está en disvalance en el proceso de envejecimiento, y es independiente del género.

El comportamiento de TAS, de la CuZn/SOD y Se/GPx, en los adultos mayores estudiados fueron similares a estudios realizados en otras latitudes y por diversos investigadores.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, S.; Boveris, A. 2004. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free radical biology and medicine*; 37: 1472-1478.
- Andreoli, TE. 2000. Free radical and oxidative stress. *Am J Med*; 108: 8: 650-651.
- Andresen, M.; Regueira, T.; Leighton, F. 2006. Oxidative stress in critically ill patients. *Revista Médica de Chile*; 134: 649 – 656.
- Avello, M, Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Universidad de Concepción, Chile. *Atenea*; 494: 161-172.
- Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Nat Acad Sci USA*; 87: 1620-4.
- Bennati, E.; Ferlit, L.; Motta, M.; Magnolfi, S.U.; Malentacchi, F.; Malaguarnera, M.; Petruzzi, E.; Petruzzi, I.; Pinzani, P. 2008. Cognitive and functional status in the extreme longevity. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 46: 245-252.
- Beristain - Perez, A.; Sánchez – Rodriguez, M.; Mendoza – Nuñez, V. 2006. Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertensión arterial en adultos mayores. *Bioquímica*; 31:001: 13-22.
- Beristain, A.S.; Sánchez, R.M.A.; Ruiz, M.; Mendoza, V.M. 2003. ¿Cómo evaluar la eficiencia del sistema antioxidante en el estrés oxidativo? Propuesta de un constructo. *Arch Geriat*. 6: 100-104.
- Bhatia S.; Shulkla R.; Venkata-Madhu S.; Kaur-Cambhir J.; Madhava-Prabhu K. 2003. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem*; 36: 557-562.
- Bieslski, H.K. 2002. Free Radical Theory of Aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 5: 5-10.
- Bruce, R. y. Troen M. D. 2003. "The biology of aging", en *Mt Sinai J Med.*, 70: 8-23.
- Cárdenas, E.; Davies, K. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad. Biol. Med*; 29: 222-230.
- Céspedes Miranda E.; Llópiz Janer, N.; Cruz Martí, N. 2000. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed*; 19:3:186-90.
- Céspedes, E.; Hernández, I.; López, N. 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Invest Biomed*; 15: 1: 23- 28.
- Céspedes, T.; Sánchez, D. 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, *Rev. Cubana Cardiol*; 14: 1: 55-60.

Cisneros, E.; Pupo, J.; Céspedes, E. 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed*; 16: 1: 10-15.

Clapés S, Torres O, Companioni M, Villariño U, Broche F, y Céspedes M. 2001. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cubana Invest Biomed.* ; 20: 2: 93-98.

Cutler, D. 2004. Changes in the age distribution of mortality over the twentieth century. En Wise, David A. (ed.): *Perspectives on the economics of aging*. Chicago: University of Chicago Press; 9: 333-365.

Díaz Soto, L. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana de Medicina militar. Instituto superior de Medicina Militar*; 31: 2: 126-33.

Díaz J, Serrano E, Acosta F, Leal M, Alonso de Vega JM, Martínez P, Jiménez R, Carbonell L. 1998. ¿Participan los radicales libres en los procesos de peroxidación lipídica?. *An. Clin.*; 33: 3: 149- 154.

Drabkin, D.L.; Austin, J.H. 1935. Hemoglobina solución Drabkin. Método cianometahemoglobina. Para determinación de hemoglobina en sangre. *Biol Chem*; 112-151

Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell functions. *Physiol Rev*: 82:1: 47-95

Elchuri, S; Oberley, TD.; Qi, W.; Eisenstein, R.; Roberts, J.; Remmen, V.; Epstein, C.; Huang, T. 2005. CuZn/SOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. 24:367-380.

Fattman, CL.; Schaefer, LM. and Oury T.D. 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine, *Free Radic. Biol. Med.* 35: 3: 236–256.

Finkel, T, Holbrook, NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*; 408: 23-247.

Gallou G, Ruelland A, Legras B. 1993. Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*; 214: 227-234.

García, B.; García, O.; Clapes, S.; Rodes, L.; García, J.C. 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Rev Cubana Invest Biomed*; 14: 1: 10-15.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*; 29: 1106-1114.

Gil P.; Fariñas F.; Casado A.; López-Fernández E. 2002. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology*; 48: 209-214.

Gómez Rinesi, J.F.; Saiach, S.; Lecuna, N. 2000. Envejecimiento. *Revista de Posgrado de la Cátedra VIa, Medicina*. 100: 21-23.

- Haffner, S. 2000. Clinical relevance of the oxidative stress concept, metabolism: clinical and experimental; 49: 30-34.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*; 11:298-300.
- Harman, D. 1957. Aging: A theory based on the free radical and radiation chemistry. *J. Geront.*, 2: 298-300
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria?. 1972. *J Am Geriatr Soc.*;20: 4 :145-147.
- Harman D. 1981. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 78: 7124–7128.
- Harman, D. H. 1987. Free radical theory of aging: effects of antioxidants on mitochondrial function. *Age* 10: 58-61.
- Inal M.E.; Kanbak E.; Sunal G. 2001. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta*; 305: 75-801.
- Jayakumar T.; Aloysius P.; Geraldine P. 2006. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol*.
- Jira W.; Spitellet G.; Richter A. 1997. Increased levels of lipid peroxidation products in low density lipoproteins of patients suffering from rheumatoid arthritis. *Chem Phys Lipids*; 87: 81-89.
- Levine, R.; Stadtman, E. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Rev Experimental Gerontology*. 36: 1495-1502.
- Londoño de La Cuesta, J.L.; Alvarado, E.J.; Casa, J.V.; Roselli, D.A, 1993. Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud resolución N° 008430 de 1993. Ministerio de Salud, Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico, Santa Fe de Bogotá, D.C.
- Martínez Sánchez, G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm*; 39: 3.
- Matheus Cortéz, N.; López Ortega, A. 2008. Asociación entre la concentración sérica de testosterona y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en testículos de ratones de diferentes edades. *Revista científica, universidad de Zulia*; 3: 305-311.
- Miller, J.K.; Brzezinka-Slebozinska, E.; Madsen, F.C. 1993 Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci*; 76: 2812-2823.
- Miquel, J. 2006. Integración de teorías del envejecimiento (parte I). *Revista española de geriatría y gerontología: Órgano oficial de la Sociedad Española de Geriatría y Gerontología*; 41: 1: 55-63.
- Molina, A.; Muñoz, A; Valenzuela, A. 2002. Radicales libres: consideraciones generales. *Edición Formación Alcalá*; 13: 243-244.
- Muchová J.; Sustrová M.; Garajová I.; Liptáková A.; Blazíček P.; Kvasnicka P.; et al. 2001 Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radical Biol Med* 31:499-508.

- Muller, et al., FL. 2006. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med*; 40: 1993-2004.
- Paglia, D.E.; Valentine W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- Pardo Andreu, G. 2003. Consideraciones generales sobre algunas de las teorías del envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed*; 22: 1: 58-67.
- Paredes Salido, F.; Roca Fernández JJ. 2002. Influencia de los radicales libres. *OFFARM*; 21: 7: 96-100.
- Pérez-Pérez, L.M. 2000. Estrés oxidativo; especies de oxígeno reactivo. *Rev Cubana Endocrinol*; 11: 3: 139- 142
- Rodríguez Perón, J.M.; Menéndez López, J.R.; Trujillo López, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit*; 30: 1: 15-20
- Sanchez-Rodriguez, M. A.; Retana-Ugalde, R.; Ruiz-Ramos, M. 2004. Capacidad antioxidante en relación a niveles séricos de lipoperóxidos en ancianos sanos de la ciudad de México. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam*; 38:2:193-198.
- Sastre, J.; Pallardo, F.V.; García de la Asunción, J.; Viña, J. 2000. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res*; 32: 189-98.
- Seclen Santisteban, S.; Baracco Maggi, R.; Mohanna Barrenechea, S. 2006. Antioxidantes en poblaciones adultas del nivel del mar y de grandes alturas: Actividad de la superóxido dismutasa. *Rev Med Hered*; 17:1: 04-07.
- Sentman, M. L. 2006. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem*; 281: 6904-6909.
- Sivonova M.; Tatarkova Z.; Durackova Z.; Dobrota Z.; Lehotsky J.; Matakova T.; et al. 2006. Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and dna in aged rats. *Physiol Res*.
- Vanda L.; Lu J.; Holmgren A.; Khanna KK. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*; 9:775-806.
- Vargas, F.; Rivas C. ; Nursamaa A.; Zoltan T. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*; 2: 2:3-15.
- Venereo, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*; 31, 2: 126-133.
- Vergara M, Smith-Wheelock M, Harper JM, Sigler R, Miller RA. 2000. Hormone-treated Snell dwarf mice regain fertility but remain long-lived and disease resistant. *J. Geron. Biol. Sci.*;59A:1244–1250.
- Vijg J.; Suh Y. 2005. Genetics of longevity and aging. *Annu Rev. Med*; 56:193-212.
- Wickens, A.P. 2001. Ageing and free radical theory. *Resp Physiol*; 128: 379-391.
- Zorrilla García, A. 2002. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 21: 3: 178-185.