

Influencia de la Edad y el Sexo en el Balance Oxidación/Antioxidación

C Cano¹, V Bermúdez¹, G Sulbarán¹, R Morales¹, M Medina¹, A Amell¹, A Souki¹, M Ambard¹, M Núñez¹, D García¹, H Restrepo¹, ME Vargas¹, H Seyfi¹ y S Cruz¹.

1. Centro de Investigaciones Endocrino - Metabólicas «Dr. Félix Gómez»,
Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

RESUMEN

El metabolismo oxidativo es el mecanismo de mayor relevancia involucrado en la producción de energía en los animales superiores. La falta de control en este proceso conduce a una sobreproducción de radicales libres de oxígeno, los cuales pueden ocasionar daño a las estructuras celulares. El malondialdehído (MDA) es un marcador de la peroxidación lipídica, cuya producción puede ser compensada por el óxido nítrico (NO), vitamina C y glutatión reducido (GSH) como integrantes del sistema antioxidante del organismo. El objetivo de este estudio fue establecer la influencia de la edad y el sexo en el sistema oxidante/antioxidante en un grupo de sujetos sanos. El MDA fue determinado como producto del ácido tiobarbitúrico, el NO como nitritos totales, la vitamina C oxidada y reducida, utilizando el método de Schwarz y Williams y el GSH mediante kit colorimétrico del GSH-400 Assaytm. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de oxidante (MDA), así como tampoco en el sistema antioxidante (NO, vitamina C, GSH) cuando se compararon sujetos de 13 a 19 años con sujetos de 20 a 38 años. Sólo se encontró diferencia significativa al analizar los valores de NO entre sexos, presentando las mujeres un valor significativamente superior ($p < 0,012$). Estos resultados sugieren que el MDA, NO, vitamina C y GSH no cambian en el intervalo de edad estudiado (13-38 años) y que la concentración de NO, sólo se ve afectada por el sexo.

Palabras Claves: Malondialdehído, Óxido nítrico, Radical libre, Ácido ascórbico, Óxido-reducción.

ABSTRACT

Oxidative pathway is the most important mechanism involved in energy production of superior animals. The lack of control in this pathway results in overproduction of oxygen free radicals that may damage cellular structures. Malondialdehyde (MDA) is a reliable sensor for lipid peroxidation whose production can be balanced by nitric oxide (NO), ascorbic acid (Asc) and reduced glutathione (GSH) as antioxidant system. The objective of this study was to establish the influence of age and sex on antioxidant and oxidant system in a group of healthy subjects. MDA was measured as thiobarbituric adducts, NO as total nitrites, ascorbic acid through Schwarz and Williams method and GSH through commercial kit. No significant differences were observed either in oxidant

(MDA) or in antioxidant system (NO, Asc and GSH) concentration when comparing subjects between 13 – 19 to subjects between 20 – 38 years old. According to sex only NO concentration was significantly higher in women ($p < 0,012$). Our results suggest that MDA, NO, Asc and GSH do not change in the interval of ages (13 – 38) and sex affects only nitrite's concentration.

Key Words: Malondialdehyde, Nitric oxide, Free radicals, Ascorbic acid, Reduction oxide

INTRODUCCIÓN

En los países occidentales las enfermedades crónico degenerativas representan la primera causa de morbilidad y mortalidad, especialmente en individuos que se encuentran aun en su etapa productiva. Es por ello que los esfuerzos se han dirigido al entendimiento de sus causas y también a su diagnóstico precoz. En este contexto el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares se ha asociado a factores genéticos y ambientales, siendo la sobreproducción de sustancias tóxicas la responsable de trastornos del equilibrio celular.

Entre estas sustancias nocivas se encuentran los radicales libres⁽¹⁾, los cuales en condiciones fisiológicas son inactivados por los complejos sistemas antioxidantes, pero cuando el equilibrio oxidación/antioxidación es descompensado, estas partículas reactivas pueden actuar sobre estructuras macromoleculares generando alteraciones de diferente severidad como la peroxidación lipídica^(2,3) (tanto de los fosfolípidos de las membranas celulares como de las lipoproteínas plasmáticas) y la degeneración del DNA⁽⁴⁾.

El daño más frecuente es la peroxidación lipídica, hecho que da origen a transformaciones profundas de la membrana celular que pueden conducir hasta su destrucción, dando lugar a una serie de productos de descomposición como el malondialdehído (MDA), el cual se emplea como indicador directo del daño celular y de la peroxidación lipídica⁽⁵⁾.

En el metabolismo celular existe además, otra importante molécula implicada en los desórdenes oxidativos, el Óxido Nítrico (NO), producido por una enzima llamada Óxido Nítrico Sintetasa (NOS), con función inducible o constitutiva, guardando relación con el tipo de tejido y función que desempeña. La síntesis del NO a nivel del endotelio en su forma constitutiva es responsable de regular el tono vascular, lo que a la vez constituye un mecanismo simple pero efectivo que permite mantener la hemostasia y prevenir la trombosis. Este sistema es finalmente controlado y la pérdida del equilibrio puede desencadenar cambios morfológicos y funcionales que afectan no sólo al endotelio mismo, sino a la íntima y a la musculatura lisa vascular⁽⁶⁾. Por otra parte, la NOS en su carácter inducible está asociada a la inmunidad inespecífica. Si el organismo no es capaz de contrarrestar el agente estimulante de la respuesta inmune dependiente de NO, este permanece elevado, traduciéndose en un efecto citolítico debido a la desactivación de las enzimas dependientes de hierro y la desarticulación de toda la maquinaria energética celular^(7,8).

Encontramos de esta forma que los procesos oxidativos descontrolados representan estados altamente peligrosos para el metabolismo celular⁽¹⁾, por ello, los organismos

superiores han desarrollado todo un sistema antioxidante que comprende agentes enzimáticos que interactúan con algunas vitaminas para garantizar la integridad celular. Entre las principales enzimas encontramos las dependientes de glutatión reducido (GSH), como la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, y entre las vitaminas involucradas encontramos la C y E⁽⁹⁾.

El papel biológico del ácido ascórbico radica en dos de sus propiedades químicas: una, la reversibilidad de su oxidación^(10,11), lo que permite su regeneración a estado reducido a expensas del glutatión, y en segundo lugar el carácter soluble polar de la molécula, debido a la cual se ubica en el citosol de la célula y proporciona los equivalentes reductores necesarios para estabilizar los ácidos grasos poliinsaturados antes de que ocurra la peroxidación lipídica avanzada, efecto que ejerce, asociada a la vitamina E o a-tocoferol, de naturaleza lipofílica y presente en las membranas celulares^(10,11).

Debido a la constante necesidad de equivalentes reductores por los sistemas antioxidantes deducimos que el Glutatión Reducido representa el punto crítico para el mantenimiento del estado reducido de las moléculas, evitando la oxidación de las sustancias intracelulares, en especial, las incluidas en la membrana celular como son los ácidos grasos poliinsaturados y que conducirían a estados de intenso estrés oxidativo⁽¹²⁾.

Se observa entonces, la existencia de un complejo sistema de interacciones y sinergismo entre los antioxidantes de la fase lipídica (membrana) de la célula y de la fase acuosa (citosol), que conducen a neutralizar los radicales citotóxicos, especialmente los originados de la peroxidación lipídica.

Es importante destacar que todos los procesos bioquímicos que descompensan el equilibrio orgánico ocurren mucho antes de manifestarse físicamente, es decir, que previamente a los síntomas y signos clínicos de una patología, ocurren una serie de eventos que conducen a la formación de productos cuantificables en la circulación. Al lograr su determinación se obtendrá un diagnóstico precoz y eficiente en el período reversible de la enfermedad^(3,9).

La comprensión de la interrelación de agentes oxidantes y antioxidantes representa un gran avance en el diagnóstico de afecciones relacionadas con desórdenes como la diabetes, hipertensión arterial y cáncer en el punto en el cual el proceso es reversible, es por ello recomendable determinar los valores séricos de MDA, NO, GSH y vitamina C, en ambos sexos y en todas las edades a fin de conocer sus variaciones y relación con estados tanto fisiológicos como patológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente trabajo fueron seleccionados 26 jóvenes de sexo masculino y femenino de la Unidad Educativa "Rafael María Baralt" de la ciudad de Maracaibo; a cada uno de los cuales se les elaboró historia clínica completa para corroborar un buen estado de salud. Previo ayuno de 12 horas, les fue tomada una muestra de sangre por venopunción. Se obtuvo el suero por centrifugación y se determinó la concentración basal de glucosa, triacilglicéridos, colesterol total y colesterol de HDL-c mediante métodos comerciales (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbh), y

niveles de VLDL-c y LDL-c por la aplicación de la fórmula de Friedewald, a fin de verificar que no padecían ningún desorden del metabolismo lipoproteico. Igualmente, se realizaron determinaciones de malondialdehído, por el método colorimétrico del ácido tiobarbitúrico o TBA modificado⁽⁵⁾; el óxido nítrico, mediante la técnica de diazotización o ensayo del ácido sulfanílico, el cual mide NO de forma indirecta a través de la cuantificación de los nitritos inorgánicos⁽¹³⁾; la vitamina C (oxidada y reducida), utilizando el método de Schwarz y Williams⁽¹⁴⁾; y el glutatión mediante kit colorimétrico del GSH-400 Assay^{tm(15)} (Oxis International Inc, Missouri, USA), todos ellos como indicadores del balance de oxidación/antioxidación.

Los resultados fueron comparados con los obtenidos de 13 individuos de sexo masculino y femenino, con edades comprendidas entre 20 y 38 años y con un buen estado de salud, según datos semiológicos de sus historias médicas obtenidas del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez".

Los resultados fueron expresados en promedios, error estándar y el análisis estadístico de las diferencias fue realizado utilizando la "t" de student para impares, considerándose significativas cuando el valor de p fue menor de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron analizados según la edad y el sexo, a manera de establecer posibles diferencias entre ambos grupos.

COMPARACIONES SEGÚN LA EDAD

Concentración Basal de Malondialdehído

El nivel sérico de malondialdehído no presentó variaciones significativas entre el grupo de 13 a 19 años ($1,28 \pm 0,17$ mM) y el grupo de 20 y 38 años ($1,34 \pm 0,33$ mM) ([Figura 1](#)).

Concentración Basal de Vitamina C

La concentración sérica del ácido ascórbico en estado oxidado y reducido fue similar en ambas poblaciones. Los niveles de ácido ascórbico reducido fueron de $1,0 \pm 0,15$ mg/ml para el grupo de 13 a 18 años y $0,92 \pm 0,12$ mg/ml para las personas entre 20 y 38 años ([Figura 2](#)). Por su parte, los valores de ácido deshidroascórbico se ubicaron en $0,86 \pm 0,21$ mg/ml para el primer grupo y $1,19 \pm 0,14$ mg/ml para el segundo, no observándose diferencias significativas entre los dos grupos etarios ([Figura 3](#)).

Concentración Basal de Óxido Nítrico

El promedio de los valores de óxido nítrico de los adolescentes fue de ($29,89 \pm 1,08$ mM) y el de adultos jóvenes ($41,25 \pm 4,7$ mM) no encontrándose diferencia significativa entre ambos ([Figura 4](#)).

Concentración Basal de Glutatión

La comparación de la concentración de glutatión reducido entre los dos grupos demostró que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos de edades, en los adolescentes se ubicó en $(229,29 \pm 8,85 \text{ mg/ml})$ y en los adultos de $(226 \pm 5,47 \text{ mg/ml})$ ([Figura 5](#)).

COMPARACIONES SEGUN EL SEXO

Concentración Basal de Malondialdehído

El nivel sérico de malondialdehído no presentó diferencias significativas entre el grupo femenino $(1,18 \pm 0,24 \text{ mM})$ y el grupo masculino $(1,44 \pm 0,21 \text{ mM})$ ([Figura 1](#)).

Concentración Basal de Vitamina C

El comportamiento de la vitamina C en estado oxidado y reducido fue similar en ambos sexos. Los niveles de ácido ascórbico reducido fueron de $0,76 \pm 0,06 \text{ mg/ml}$ para el sexo femenino y $1,01 \pm 0,21 \text{ mg/ml}$ para el sexo masculino ([Figura 2](#)). Por su parte, los valores de ácido deshidroascórbico se ubicaron en $1,06 \pm 0,22 \text{ mg/ml}$ para las mujeres y $1,06 \pm 0,23 \text{ mg/ml}$ para los hombres ([Figura 3](#)).

Concentración Basal de Óxido Nítrico

El promedio de los valores de óxido nítrico de las mujeres $(34,91 \pm 2,03 \text{ mM})$ fue significativamente más alto ($p < 0,012$) que el de los hombres $(27,45 \pm 1,48 \text{ mM})$ ([Figura 4](#)).

Concentración Basal de Glutatión

La comparación de las concentraciones de glutatión reducido entre los dos sexos demostró que no existe diferencia significativa entre el grupo femenino $241,65 \pm 10,86 \text{ mg/ml}$ y el masculino $250,38 \pm 12,81 \text{ mg/ml}$ ([Figura 5](#)).

Figura 1: Concentración basal de malondialdehído según edad y sexo

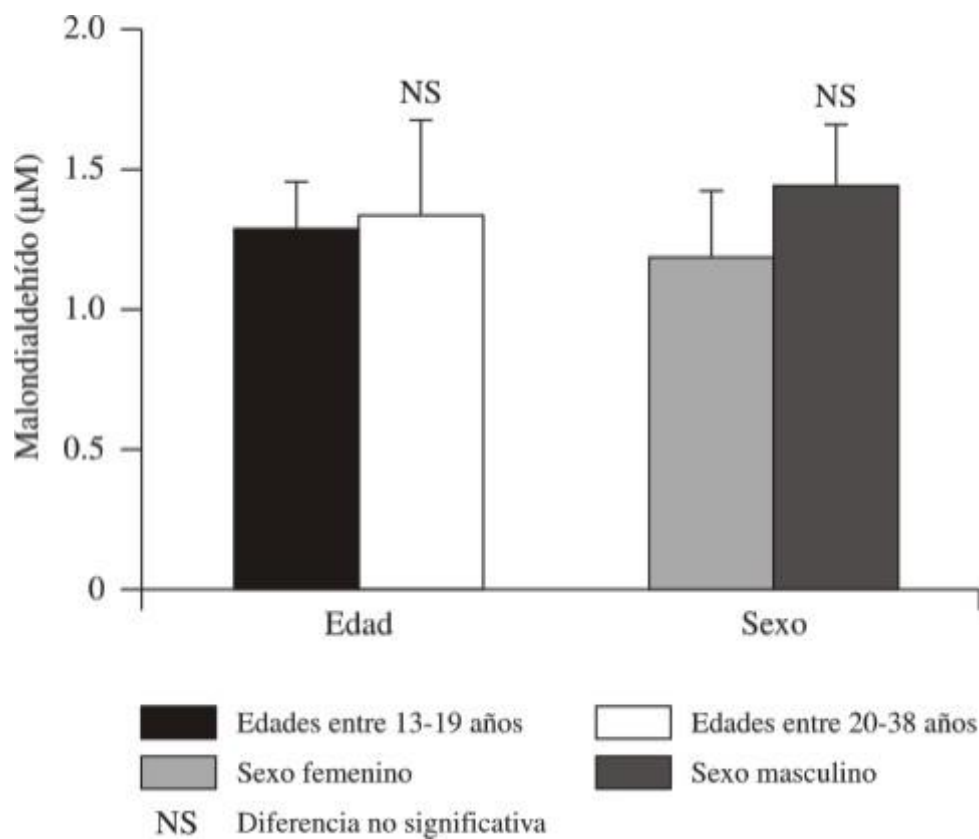


Figura 2: Concentración basal de vitamina C oxidada según edad y sexo

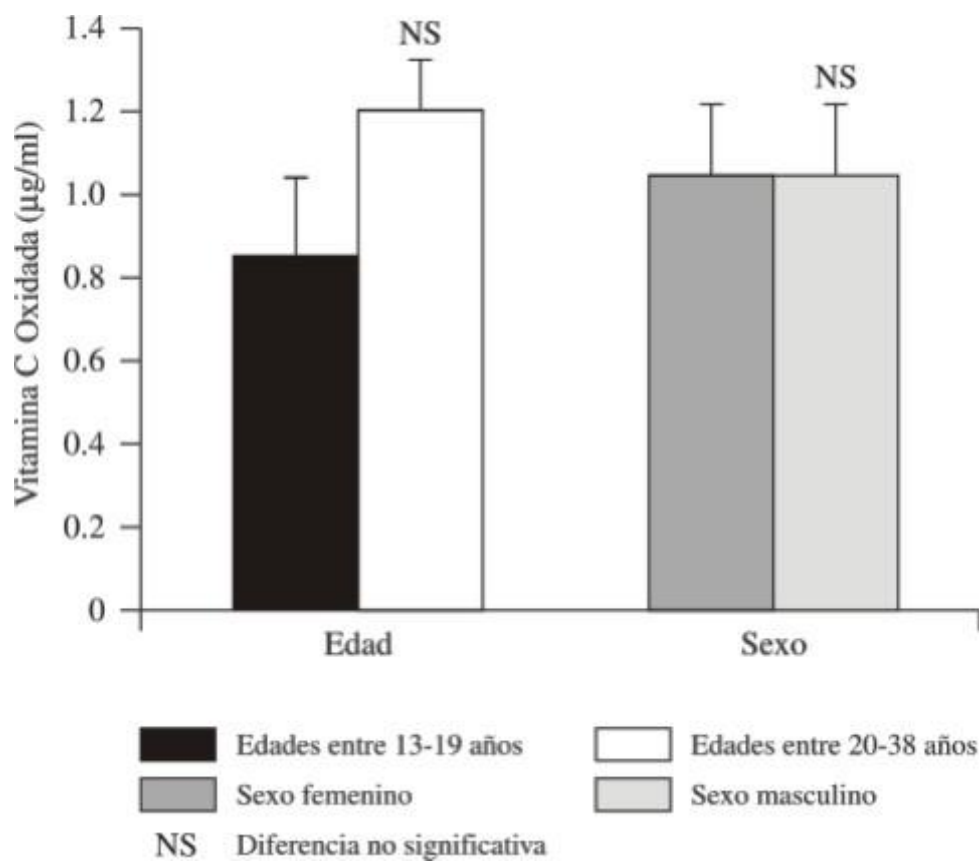


Figura 3: Concentración basal de vitamina C según edad y sexo

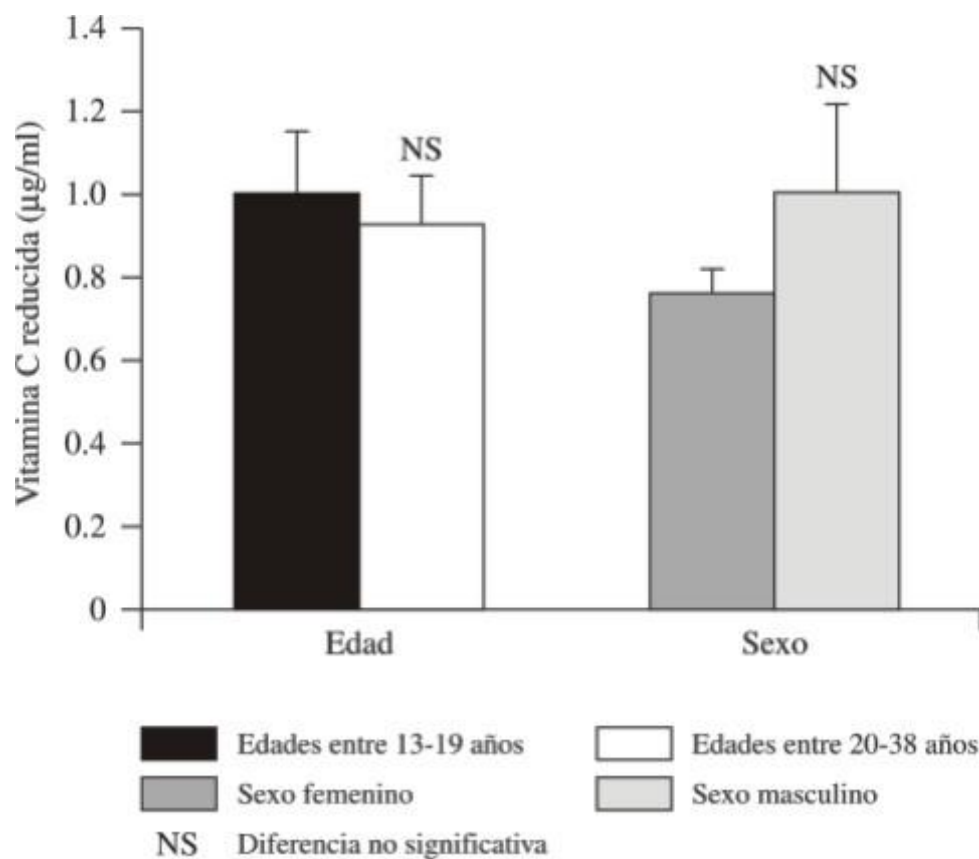


Figura 4: Concentración basal de oxido nítrico según edad y sexo

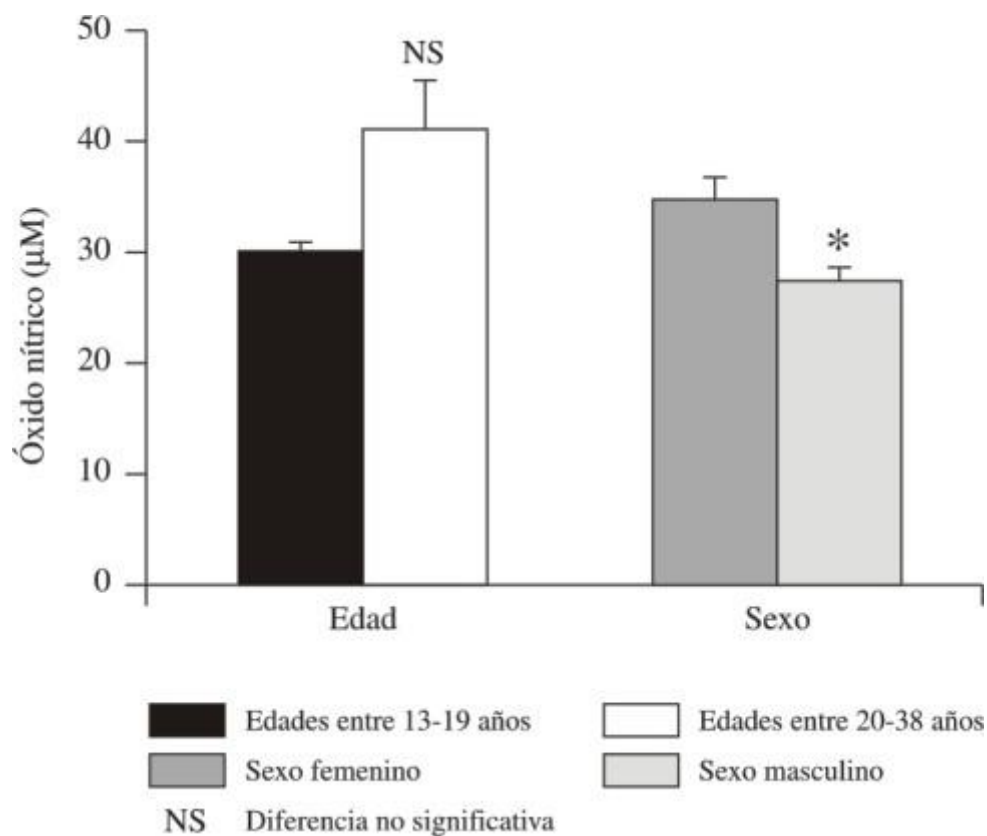
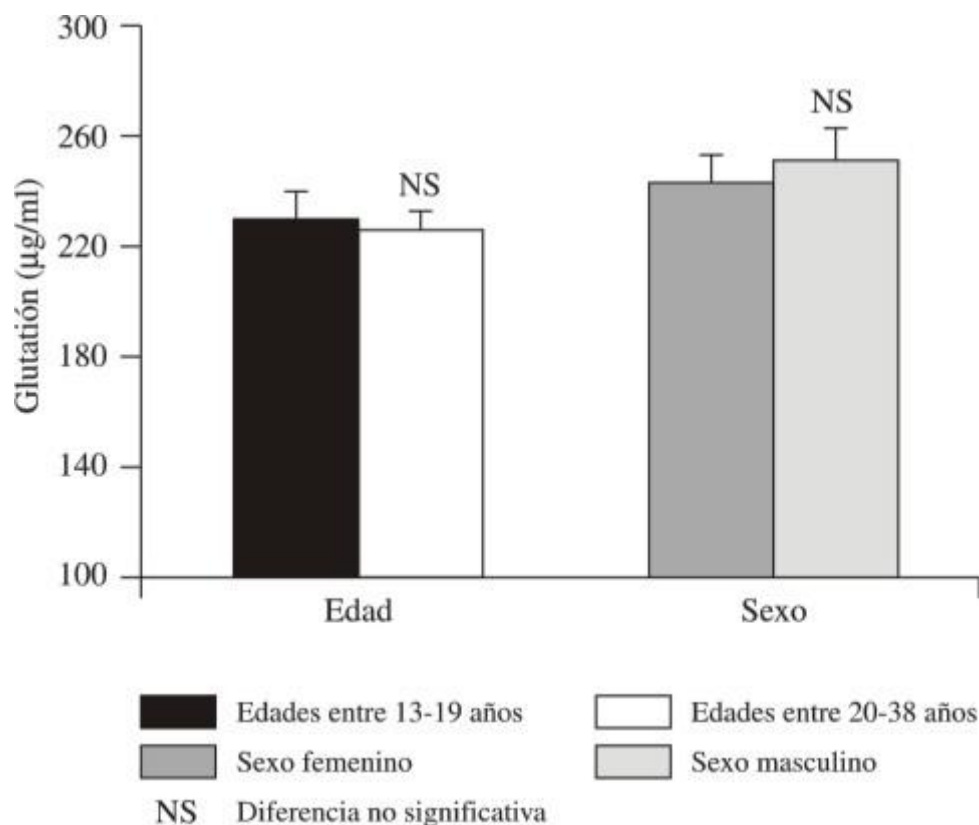


Figura 5: Concentración basal de glutatión según edad y sexo



DISCUSIÓN

La determinación del MDA en ambos sexos y grupos etarios reveló que no existe diferencia significativa entre ellos, lo cual debe ser considerado de gran importancia al permitir interpretar de forma clara cualquier alteración de los parámetros normales y poder predecir patologías asociadas de manera precoz y aun en etapa reversible. Entre las patologías relacionadas con elevada concentración de MDA podemos mencionar, la periodontitis, diabetes mellitus, infarto del miocardio y angina de pecho^(16,17,18,19).

El MDA es un indicador directo del grado de estrés oxidativo, peroxidación lipídica y por esta razón de daño celular¹⁸, ya que es originado en la etapa final de la peroxidación de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares por acción de los radicales libres de oxígeno. Por tal motivo, su determinación sérica constituye una herramienta muy importante en el estudio del balance oxidación/antioxidación en humanos.

Los resultados obtenidos evidencian que no existe diferencia significativa en los valores de NO entre los grupos etarios estudiados, sin embargo, al realizar la comparación entre sexos se pudo observar que las mujeres exhiben un aumento significativo que podría deberse a las diferencias hormonales durante el ciclo menstrual que incrementan la producción de NO como respuesta compensatoria a estados de mayor presión arterial.

La determinación sérica de NO es de suma importancia debido a que bajo condiciones de estrés oxidativo e hipercolesterolemia, frecuentemente asociados a la hipertensión arterial, diabetes mellitus y en especial la aterosclerosis⁽¹⁹⁾, se observa un incremento en su síntesis por inducción de la NO sintetasa, pudiendo éste actuar como scavenger radicales libres y evitado que se produzca un ataque directo a los ácidos grasos

poliinsaturados; por otra parte, el NO puede unirse al hierro inactivando las enzimas celulares dependientes de este mineral^(7,20).

El estudio realizado, también reveló que los niveles de vitamina C y glutatión séricos de los grupos estudiados se encuentran dentro de los parámetros normales y al igual que los de MDA y NO tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos etarios estudiados ni con relación al sexo.

En condiciones normales el organismo cuenta con un importante sistema antioxidante, integrado por la vitamina C de naturaleza hidrosoluble, la vitamina E liposoluble y una molécula muy importante que permite la reducción de estas sustancias como lo es el glutatión reducido, el cual permite además, asegurar la actividad de la glutatión reductasa y de otras enzimas dependientes de él⁽²¹⁾. Es importante recalcar que todos estos sistemas actúan de manera sinérgica, a fin de mantener un adecuado balance oxidación/antioxidación en nuestro organismo.

Estudios realizados por Pansarasa, et al⁽²²⁾, en músculo esquelético humano concuerdan con los resultados aquí reportados, revelando que los niveles de glutatión total así como de glutatión reducido no se alteran con la edad, no así, los niveles de glutatión oxidado que si se incrementan significativamente, después de la séptima década de la vida, al igual que los niveles de peroxidación lipídica⁽²²⁾.

En la investigación realizada se encontraron evidencias de valores de MDA, NO, vitamina C y glutatión, que no muestran alteraciones significativas durante el período de 13 a 38 años, en personas sanas y perfil lipídico normal, esto obedece al hecho de que en éstas edades el sistema antioxidante responde eficientemente ante las agresiones oxidativas. Por esta razón los valores encontrados en esta investigación pueden utilizarse como punto de referencia de los niveles normales del balance oxidación/antioxidación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Betteridge DJ. What is oxidative stress. *Metabolism*. 2000; 49: 3-8.
2. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo*. 1999; 13: 295-309.
3. Santanam N, Ramachandran S, Parthasarathy S. Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16: 275-280.
4. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32: 157-170.
5. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*. 1993; 15: 353-363.

6. Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998; 16: 241-248.
7. Chiueh CC. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 890: 301-311.
8. Nies AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E: Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exerc Immunol Rev*. 1999; 31: 261-272.
9. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999; 31: 261-272.
10. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994; 97: 5S-13S.
11. Hughes DA. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proc Nutr Soc*. 1999; 58: 79-84.
12. Esteve JM, Mompo J, García de la Asunción J, Asensi M, Boix J, Vina JR, Vina J, Pallardo FV: Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J*. 1999; 13: 1055-1064.
13. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*. 1993; 7: 349-360.
14. Enrique Iovine. El laboratorio en la clínica. 2da edición. Editorial Panamericana. 1979; 274-280.
15. OXIS International, Inc. GHS-400 Assay™ GLUTATHIONE, 1997.
16. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*. 1999; 53: 169-180.
17. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J*. 1999; 138: 69-75.
18. Bermúdez VJ, Bracho V, Bermúdez-Arias FA, Medina MT, Núñez M, Amell A, Cano C.. Comportamiento del malondialdehído y el oxido nítrico séricos en pacientes con infarto del miocardio. *Rev Esp Cardiol*. 2000; 53(4). En prensa.
19. Bakker SJ, Ijzerman RG, Teerlink T, westerhoff HV, Gans RO, Heine RJ. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure?. *Atherosclerosis*. 2000; 148: 17-21.

20. Wink DA, Vodovotz Y, Grisham MB, De Graff W, Cook JC, Pacelli R, Krishna M, Mitchell JB. Antioxidant effects of nitric oxide. *Methods Enzymol.* 1999; 301: 413-424.
21. Niwa Y. Oxidative injury and its defense system in vivo. *Rinsho Byori.* 1999; 47: 189-209.
22. Pansarasa O, Bertorelli L, Veccehiet S, Felzani G, Marzartico F. Age-dependent changes of antioxidants activities and markers of free radicals damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 616-622.