

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA
EN POBLACIONES HUMANAS NORMALES Y PATOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

ROSARIO DE LA TORRE BINIMELIS

Madrid, octubre 1994

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología y Genética Molecular Humana del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Las muestras de sangre analizadas fueron facilitadas por las siguientes Instituciones:

- Instituto Nacional de Hematología y Hemoterapia de Madrid.
- Centro de Vacunación de Hepatitis B del Servicio Regional de Salud de la Comunidad Autónoma de Madrid.
- Laboratorios de Bioquímica y Hematología del Hospital Niño Jesús de Madrid.
- Hospital Materno-Infantil 12 de Octubre de Madrid.
- Laboratorio de Análisis del Ambulatorio de la Seguridad Social de Orcasitas (Madrid).
- Servicios de Hematología y Bioquímica del Hospital de la Cruz Roja de Madrid.
- Servicios de Radiocirugía y Radiodiagnóstico del Hospital San Francisco de Asís de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi mas sincero agradecimiento a la Dra. Angela Casado, directora de esta Tesis Doctoral. Durante estos años ha sido como una segunda madre y sin su ayuda y apoyo esta Tesis no hubiera sido posible.

Mi agradecimiento también al Dr. Ángel Giménez-Solves por su asesoramiento.

Asimismo, también quiero expresar mi agradecimiento a M^a Encarnación López-Fernández, por su paciencia y consejos; y a Diana Carrascosa, por su amistad y su ayuda desinteresada.

También quiero agradecer la ayuda prestada por la Dra. Vega Ramírez, Julia Sáez y todo el personal del Instituto Nacional de Hematología y Hemoterapia y del Centro de Vacunación de Hepatitis B del Servicio Regional de Salud de la Comunidad de Madrid; por el Dr. José Baeza y el personal de los laboratorios de Bioquímica y Hematología del Hospital Niño Jesús de Madrid; por la Dra. Florinda Gilsanz, M^a Teresa Cabrera y todas las matronas del Hospital Materno-Infantil 12 de Octubre; por la Dra. M^a Ángeles Losa y el personal del Laboratorio de Análisis del Ambulatorio de la Seguridad Social de Orcasitas; por los Dres. M^a Luisa Martínez y Francisco Redondo de los Servicios de Bioquímica y Hematología del Hospital de la Cruz Roja de Madrid; y por los Dres. Manuel Santos y David Ortiz de Urbina del Servicio de Radiocirugía y Radiodiagnóstico del Hospital San Francisco de Asís de Madrid. A todos ellos, mi agradecimiento por su colaboración en la obtención de las muestras.

Gracias también a M^a Carmen y Olvido Partearroyo por su excelente asistencia técnica. Y a todos mis compañeros del Centro de Investigaciones Biológicas, por su amistad y apoyo.

Muchas gracias a Llanos Galindo, por su disponibilidad en la búsqueda bibliográfica; y al Dr. Juan José Jiménez, por sus consejos y aclaraciones; y a los dos, sobre todo, por su amistad.

Mi agradecimiento a Ester Martínez, por su paciencia y cariño en la corrección ortográfica.

Finalmente, también quiero dar las gracias a mi familia, por su paciencia y apoyo inquebrantable.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. Estructura de Superóxido dismutasa	2
II. Función y Actividad de superóxido dismutasa	7
III: El radical superóxido: Toxicidad y Reactividad	8
IV. Concepto de equilibrio oxidante-antioxidante	11
V. Niveles Normales de actividad de superóxido dismutasa	14
VI. Teoría de los radicales libres y el envejecimiento	16
VII. Importancia de la actividad de SOD en diferentes patologías	18
A. Patologías del Sistema Nervioso	18
B. Procesos Tumorales	20
C. Diabetes	22
D. Cataratas	23
E. Síndrome de Down	24
F. Otras Patologías	24
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS DOCTORAL	26
MATERIALES Y MÉTODOS	30
A) Descripción de la muestra analizada	31
B) Determinación de la actividad de superóxido dismutasa	33
REACTIVOS	35
PROCEDIMIENTO A SEGUIR	36
CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA	37
RESULTADOS	38
A. POBLACIÓN SANA	39
A. 1. Población adulta	39
A. 2. Población infantil y adolescente	48
A. 3. Población mayor de 50 años	52
RESUMEN	58
B. POBLACIÓN CON PATOLOGÍAS PROPIAS DEL ENVEJECIMIENTO	59
B. 1. Accidente cerebral vascular agudo	59

B. 2. Sistema cardiovascular	60
B. 3. Cataratas	61
B. 4. Demencia	62
B. 5. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	63
B. 6. Miomas	64
B. 7. Osteoporosis	65
B. 8. Patología prostática	66
B. 9. Patología osteoarticular	67
B. 10. Otras patologías	68
RESUMEN	69
C. POBLACIÓN CON PROCESOS CANCEROSOS	70
C. 1. Cáncer de cabeza y cuello	70
C. 2. Cáncer digestivo	71
C. 3. Linfomas	72
C. 4. Cáncer de mama	73
C. 5. Mielomas	74
C. 6. Cáncer de ovario y útero	75
C. 7. Cáncer de pulmón	76
C. 8. Cáncer de sistema nervioso central	77
C. 9. Cáncer urológico	78
C. 10. Otros tumores	79
RESUMEN	80
D. POBLACIÓN CON DIABETES	81
D. 1. Diabetes Mellitus insulín-dependiente	83
D. 2. Diabetes Mellitus no insulín-dependiente	86
E. POBLACIÓN CON SÍNDROME DE DOWN	88
DISCUSIÓN	91
A. Población sana	92
B. Población con patologías propias del envejecimiento	96

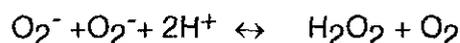
C. Población con procesos tumorales	99
D. Población con Diabetes	100
E. Población con síndrome de Down	100
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFÍA	106

INTRODUCCIÓN

I. Estructura de superóxido dismutasa

Las enzimas normalmente se descubren y se aíslan sobre la base de sus actividades catalíticas. En el caso de las superóxido dismutasas (SODs) se invirtió esta secuencia. David Keilin (1) se dedicó al aislamiento de la anhidrasa carbónica, de la que se sospechaba que podía contener cobre. En todas las fracciones proteicas obtenidas del hemolizado se estudiaba tanto la catálisis de la hidratación del CO₂ como el contenido de Cu. Dado que la anhidrasa carbónica contiene zinc y no cobre, era inevitable que el Cu y la actividad catalítica se separaran. La proteína de Cu que se encontró durante este fraccionamiento se aisló en función de su riqueza en Cu. Puesto que no tenía actividad conocida, se la llamó hemocupreína y se le asignó la función de almacenamiento de Cu. Se fueron aislando proteínas prácticamente idénticas en varios tipos de células y se les dio nombres que reflejaran su tejido de origen y su contenido en Cu. De ahí los nombres de eritrocupreína, hepatocupreína, cerebrocupreína, citocupreína, etc.

Estudios independientes sobre las propiedades peculiares oxígeno dependientes de la xantina oxidasa de la leche dieron lugar a la observación de que esta enzima produce O₂⁻ y H₂O₂. Teniendo una fuente enzimática de O₂⁻, se llegó rápidamente al descubrimiento de la actividad SOD y esta actividad llevó al aislamiento de esta enzima por McCord y Fridovich (2) en eritrocitos bovinos. Una vez que se obtuvo la enzima, eran obvias las similitudes fisicoquímicas entre las diferentes cupreínas. También se formuló la reacción que estas catalizaban:



La disponibilidad de un ensayo espectrofotométrico para la actividad de SOD y de una tinción aplicable a geles de poliacrilamida facilitó el aislamiento de SOD de una gran variedad de células. Así, se aisló rápidamente una SOD de manganeso en *Escherichia coli* (3) y en mitocondrias hepáticas de pollo (4). También en *E. coli* se aisló una SOD de hierro (5). Todas estas SODs son abundantes, estables y están ampliamente distribuidas.

Por tanto, se puede considerar que todas las SODs son metaloenzimas que contienen un ión metálico de transición (cobre, hierro o manganeso) en su sitio activo. Parece que existen dos genes ancestrales diferentes, no relacionados, que codifican a las diferentes SODs, los cuales han dado lugar a las cuatro grandes familias de SODs presentes hoy día. Un gen ancestral ha dado lugar a las SOD que contienen manganeso o hierro. La progeie de este gen esta ampliamente extendida entre todos los organismos aerobios, desde las bacterias a las plantas y al hombre. El otro gen ancestral dió lugar a las SODs que contienen Cu y Zn y su progeie se encuentra casi exclusivamente entre organismos eucarioticos y cuya localización es extramitocondrial. En la Tabla 1 se pueden observar resumidas algunas de las características principales de las cuatro grandes familias de SODs que se consideran hoy en día.

Tabla 1: Algunas características de las SODs (6)

Tipo	Peso Molecular	Estructura	Localización	Distribución
Cu/Zn-SOD	32000	Dímero	Citosol	Todos los eucariontes, algunos procariontes
EC-SOD (Cu/Zn)	150000	Tetrámero	Extracelular unida a la membrana	Mamíferos, pájaros y peces
Mn-SOD	40000 ó 80000	Dímero o Tetrámero	Citosol o matriz mitocondrial	Todos los aerobios
Fe-SOD	40000 ó 80000	Dímero o Tetrámero	Citosol, cloroplastos o mitocondrias	Procariontes, algunos eucariontes

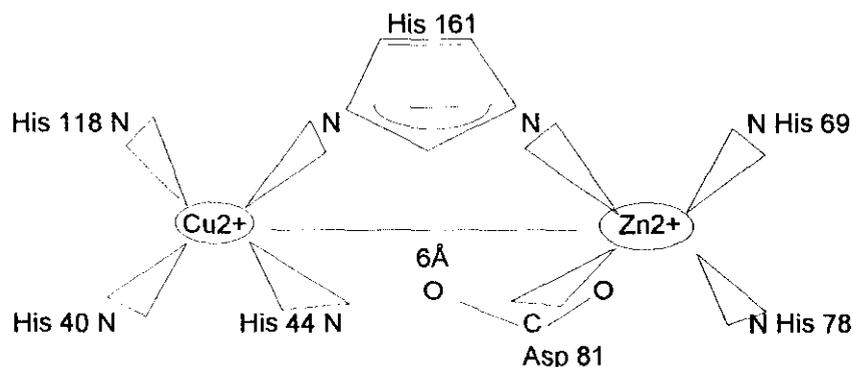
Referente a la SOD de Cu y Zn citosólica, se sabe que ésta se encuentra ampliamente distribuida en el citosol y en núcleo de las células, lo que está de acuerdo con su condición de proteína citosólica soluble (7), y es en general, una enzima bastante estable, como se deduce de los procedimientos utilizados para su aislamiento. Así, en la

purificación de la hepatocupreína se utilizó la precipitación con acetona y acetato de plomo, así como el tratamiento con calor a 70°C (8). McCord y Fridovich (2), en la purificación de la enzima a partir de eritrocitos de bovidos, eliminaron la hemoglobina del lisado de glóbulos rojos mediante tratamiento con mezcla de cloroformo y etanol, obteniendo la enzima en la fase orgánica sin pérdidas sensibles de actividad.

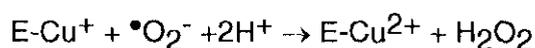
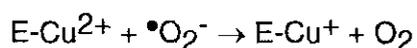
Como se observa en la Tabla 1, la SOD citosólica es una proteína con dos dímeros idénticos, cada uno con un cobre y un zinc, fuertemente unidos a la cadena polipeptídica. Cada una de estas cadenas tiene un puente disulfuro intracatenario, un grupo sulfhidrilo y un resto amino terminal acetilado (9). La característica estructural dominante de cada subunidad es un cilindro con estructura β , también denominada de barril β . Las dos subunidades están unidas por interacciones no covalentes, predominantemente hidrófobas, entre los barriles β , encontrándose los centros activos en los lados opuestos de la molécula. El centro activo está constituido por un ion Cu (II), rodeado por cuatro restos de histidina con una configuración cuadrado plana distorsionada. Uno de los restos de histidina es un ligando puente, con uno de sus nitógenos unido al cobre y otro al Zn (II) contiguo, que presenta una configuración tetraédrica. El zinc está unido también a dos restos adicionales de histidina y a un resto de ácido aspártico (10).

El cobre está relativamente expuesto al medio, mientras que el zinc está mas enterrado en la estructura proteica. Esto era de esperar puesto que si la transferencia directa de electrones entre el O_2^- y el Cu^{2+} ha de tener lugar, este ha de ser accesible al medio (11)

La estructura del sitio activo se ha podido determinar por difracción de rayos X y se muestra en la siguiente figura (12).



Las reacciones catalizadas por SOD tienen lugar por un mecanismo de oxidación-reducción cíclica de un cofactor metálico y se describen en las siguientes reacciones:



Esta reacción es extremadamente rápida, con una constante bimolecular para cada paso del orden de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en el rango de las reacciones típicas controladas por difusión. Los potenciales que corresponden a los pares redox implicados son los siguientes:

<u>Reacción</u>	<u>E° (V)</u>
$\text{O}_2 + 1\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^-$	-0,36
$\text{E-Cu}^{2+} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{E-Cu}^+$	0,42
$\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ + 1\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0,90

Para calcular el potencial electrostático se asignan cargas a los residuos de aminoácidos y a los ligandos metálicos. Se asignan cargas de $+1\text{e}^-$ a los restos de lisinas y argininas y de -1e^- a los residuos de glutamato y aspartato. El grupo carboxílico terminal tiene una carga de -1e^- mientras que el grupo amino terminal es neutro por estar acetilado. A la histidina 41 se le asigna una carga de $+1\text{e}^-$ debido a su papel como donante de un

protón en dos puentes de hidrógeno y la histidina 61 tiene una carga de $-1e^-$ porque está ligada tanto al ión de cobre como al de Zn. Todas las otras histidinas son neutras. A los ligandos de cobre y zinc se les asignan cargas de $+2e^-$. Estas 76 cargas asignadas al dímero de SOD dan al enzima una carga neta de $-4e^-$ (13).

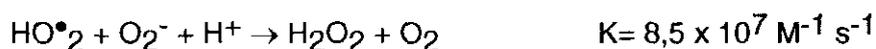
Se ha sugerido que tanto la extensa región de potencial negativo que rodea al dímero de SOD como los residuos específicamente aniónicos tienen la función de dirigir al radical superóxido lejos de la superficie de la enzima y dentro del lugar activo. Si esto fuera el caso, alteraciones puntuales de carga que alteren o incrementen esta función deberían tener efectos opuestos a aquellas alteraciones que afectan al potencial positivo del sitio activo. Sin embargo, no se observa ninguna mejora en el mecanismo de dirección al añadir cargas negativas ni al suprimir cargas positivas. No se ha encontrado todavía ninguna función general o específica para los residuos aniónicos en la facilitación electrostática de la difusión del radical superóxido hacia el lugar activo de SOD en condiciones de equilibrio. El alto gradiente de potencial electrostático debido a la presencia de residuos aniónicos podría, de todos modos, acelerar que se alcanzase el nivel de equilibrio, y esto es importante para la funcionalidad de SOD *in vivo* donde los niveles de radical superóxido pueden fluctuar rápidamente. Otra posible función para estas cargas negativas de superficie puede ser mantener la estructura y prevenir el choque del radical superóxido con puntos delicados de la superficie de SOD.

Debido a que SOD presenta una actividad catalítica controlada por difusión, los esfuerzos realizados para diseñar una enzima mas eficiente se han dirigido hacia la mejora del mecanismo de dirección, por medio de mutaciones puntuales que afectan a los residuos con carga electrostática. Sin embargo, las modificaciones en la distribución de la carga realizadas hasta el momento, solo han producido efectos moderados en la velocidad de reacción. Parece que el único enfoque práctico para mejorar la actividad de SOD sería producir sustituciones múltiples en los residuos cargados .

Tanto el Cu^{2+} como el Zn^{2+} pueden ser eliminados reversiblemente de la SOD. Sin embargo, la apoenzima es mucho más lábil que la holoenzima, y esta inestabilidad puede conducir en determinadas condiciones a una inactivación irreversible. Esto ha dado lugar a resultados conflictivos por lo que se refiere a la resolución reversible de la Cu/Zn-SOD. Forman y Fridovich (14) han estudiado los efectos de los metales sobre la actividad de la SOD bovina y, posteriormente, Beern y col. (15) llevaron a cabo una investigación más detallada de la resolución reversible de esta enzima, utilizando la actividad enzimática, la movilidad electroforética y los espectros ópticos y de RPE para estudiar el estado de la enzima. Estos últimos autores han demostrado que tanto el Cu^{2+} como el Zn^{2+} pueden ser eliminados reversiblemente, y que Co^{2+} , el Hg^{2+} o el Cd^{2+} pueden reemplazar al Zn en su función de reforzamiento de la estabilidad enzimática, mientras que ningún metal puede reemplazar al cobre en su función catalítica. También se ha demostrado que el Cu^{2+} puede restaurar por sí solo hasta un 80% de la actividad catalítica de la proteína nativa, y que el sitio del zinc ha de estar ocupado para que tenga lugar la recuperación total de las propiedades nativas de la enzima.

II. Función y actividad de superóxido dismutasa

Como ya se ha indicado, la función de SOD consiste en eliminar al radical superóxido. Este radical no se acumula en medio acuoso ya que fácilmente se dismuta. El radical superóxido es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperóxido, cuyo pKa es de 4,18. La dependencia de la dismutación espontánea en el pH se puede explicar en base a este pKa y a las siguientes reacciones (11):

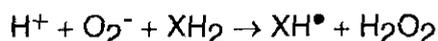
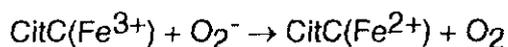


A pH 7,4 la constante de velocidad para la reacción de dismutación espontánea es de aproximadamente $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dado el valor de esta constante, puede resultar sorprendente, a primera vista, la necesidad de una enzima para catalizar una reacción tan extraordinariamente rápida. Sin embargo, hay que considerar que, a pesar de esta elevada constante de velocidad, la reacción es de segundo orden en O_2^- y la primera vida media es, por tanto, función del nivel de O_2^- en estado estacionario. Así, a la concentración de superóxido de $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, la reacción sería lenta. Por el contrario, la reacción entre el O_2^- y la SOD es de primer orden en superóxido y enzima. Además, la enzima está presente en la mayor parte de los tejidos a una concentración de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ (16). A niveles de O_2^- de $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, la dismutación catalizada por la enzima sería 10^5 veces más rápida que la reacción espontánea. De hecho, a pH fisiológico, la constante de la reacción enzimática ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es aproximadamente 10^4 veces mayor que en la reacción espontánea. El incremento neto de la tasa de dismutación del O_2^- , causado por niveles intracelulares de SOD a una concentración estacionaria de 0,1 mM, es, así, de 10^4 veces, y la ventaja proporcionada por la enzima sería todavía mayor a los niveles inferiores estacionarios de O_2^- que son de esperar en una célula.

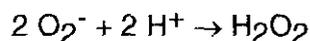
Se puede decir, por tanto, que la SOD es realmente efectiva manteniendo bajo control los niveles de radical superóxido. Sin embargo ¿es el radical superóxido tan tóxico que exija la presencia de SOD en la célula?

III. El radical superóxido: Toxicidad y Reactividad

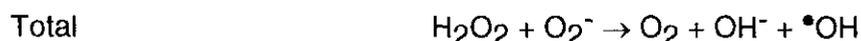
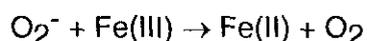
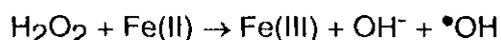
El radical superóxido puede actuar como un agente reductor, cediendo su electrón extra, o como un agente oxidante, reduciéndose a H_2O_2 . Por ejemplo, reduce al citocromo C y oxida a la adrenalina (16).



También descarboxila cetoácidos y reacciona con ciertos fenoles (17). Sin embargo, en comparación con otros radicales de oxígeno, el radical superóxido es poco reactivo, con un tiempo de vida media de milisegundos a valores de pH fisiológicos. Pero el radical superóxido puede reaccionar consigo mismo según la reacción:

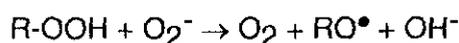


El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con otro radical superóxido produciendo el radical hidroxilo en la reacción de Haber-Weiss, reacción que está catalizada por metales de transición, como el Hierro y el Cobre:



El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) se encuentra entre los oxidantes mas potentes conocidos. Puede atacar a prácticamente todas las moléculas presentes en la célula. Por ejemplo, puede hidroxilar las bases púricas y pirimidínicas del DNA., dando lugar a mutaciones (17).

Según Kellog y Fridovich (18,19), la molécula de oxígeno que se produce en la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido no es el oxígeno fundamental en estado triplete, sino el oxígeno singlete excitado (ΔgO_2), debido a que su producción sería termodinámicamente mas favorable. Este oxígeno singlete es un oxidante de extrema actividad, pudiendo oxidar a muchas biomoléculas; por ejemplo, puede atacar a las uniones olefinicas, iniciando así la peroxidación de los lípidos, peroxidación que también podrían producir los radicales hidroxilo y superóxido:



Esta reacción permitiría al radical superóxido iniciar las reacciones en cadena de la peroxidación de los lípidos, cuyos productos son autocatalíticos e inactivadores de muchas

enzimas (20), causando severos daños a las membranas, de naturaleza lipídica, y, eventualmente, la pérdida de la integridad de las mismas.

Por tanto, se puede considerar que el radical superóxido y los productos que derivan de él, como son el radical hidroxilo, el oxígeno singlete excitado, los peróxidos, etc., todos ellos mas tóxicos que el radical superóxido, pueden iniciar una cadena de reacciones que pueden conducir a daños celulares tan importantes como el ataque al DNA, membranas lipídicas y otros componentes celulares esenciales. Por consiguiente, aunque el radical superóxido por si mismo no sea un radical tan tóxico, puede generar otros radicales que si son ciertamente peligrosos (21).

Por otra parte, el radical superóxido es un metabolito intermediario muy frecuente en el metabolismo de los organismos aerobios. Las enzimas xantino oxidasa, aldehido oxidasa, dihidroorótico deshidrogenasa, varias flavin deshidrogenasas, triptofano dioxigenasa, dopamina hidroxilasa, p-cumárico hidroxilasa, cistamina oxigenasa, 2-nitropropano oxigenasa y galactosa oxidasa, entre otras, utilizan y generan el radical superóxido. Numerosos compuestos de importancia biológica, tales como las hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas reducidas, etc., se oxidan espontáneamente y, al hacerlo, producen radical superóxido. La autooxidación de algunos de los componentes de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria también genera radical superóxido.

La hemoglobina y la mioglobina, en sus formas oxidadas liberan lentamente O_2^- cuando son convertidas en metahemoglobina y metamioglobina (22,23). La producción de metahemoglobina es lo suficientemente importante para que los eritrocitos contengan una metahemoglobina reductasa que lleva a cabo una reversión neta de este proceso (16). Igualmente se ha verificado la producción de superóxido en la reducción univalente de oxígeno molecular por los iones metálicos Fe^{2+} , Co^{2+} , ó Ni^{2+} , cuando estos iones están coordinados con ligandos específicos tales como oligopéptidos sencillos (24).

En los seres humanos se ha demostrado que la acción bactericida de los leucocitos fagocíticos es debida, en parte, a los radicales superóxido generados en el fagosoma de los leucocitos (25). Cuando los leucocitos polimorfonucleares engloban a las bacterias, liberan grandes cantidades de O_2^- y H_2O_2 al medio, aparentemente debido a la acción de una NAD(P)H oxidasa asociada a la membrana plasmática. Como las bacterias absorbidas están envueltas por una vesícula de la membrana plasmática del citoplasma leucocitario, están expuestas a un flujo acelerado de O_2^- y posiblemente también de oxígeno singlete y $^{\bullet}OH$ (17).

IV. Concepto de equilibrio oxidante-antioxidante.

Cuando se observó que los sistemas biológicos eran capaces de producir radicales libres y otros oxidantes potentes, la tendencia natural fue considerar a los oxidantes como perjudiciales y a los antioxidantes como beneficiosos. Sin embargo, normalmente, las cosas no son tan sencillas. Cada vez se tiende más a pensar que debe de existir un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Lo primero que indujo a considerar esa posibilidad fue la gran constancia que presentaba la actividad de SOD en prácticamente todos los organismos aerobios (26). Desde el descubrimiento de las SODs se ha intentado buscar un efecto terapéutico frente a algunas patologías, pensando que cuanto mayor cantidad de SOD exista, mejor. Sin embargo, si esto fuera verdad, probablemente a lo largo de la evolución algún organismo habría aumentado su actividad de SOD, cosa que no ha sucedido.

El estudio del síndrome de Down o trisomía 21 ha proporcionado algunos indicios con respecto al equilibrio entre oxidantes y antioxidantes. En los seres humanos, el gen que codifica a la SOD de cobre y zinc citosólica se encuentra en el cromosoma 21, región 21q22.1 (27) y las personas con trisomía 21 muestran un efecto de dosis, conteniendo sus células un 50% más de actividad de SOD, debido a la presencia de una tercera copia del gen. Sin embargo, en sus plaquetas hay un tercio menos de actividad de SOD de manganeso, enzima que se codifica en el cromosoma 6, segmento q21 (28). Esto sugiere

la existencia de un mecanismo de regulación que intenta controlar la concentración de SOD intracelular para mantener los niveles de radical superóxido a un nivel muy bajo pero no cero. Los pacientes con síndrome de Down tienen una serie de alteraciones metabólicas y fisiológicas entre las que se encuentran uniones neuromusculares anormales en la lengua, una mayor lipoperoxidación en los homogenados de cerebro y una incorporación disminuida de serotonina a las plaquetas. Debido al gran número de genes que están en el cromosoma extra (aunque se ha perfilado como región crítica del síndrome de Down las tres sub-bandas del segmento 21q22, que es donde se localiza el gen de SOD), no se vió ningún motivo para atribuir estas anomalías a un exceso de SOD hasta que se desarrollaron modelos específicos para estudiar el efecto de dosis génica.

Mediante técnicas de biología molecular, ha sido posible manipular los niveles de expresión génica y, así, se puede inducir a las bacterias para que produzcan enormes cantidades de SOD. Esto también se puede hacer en cultivos de células de mamífero, e incluso en ratones transgénicos enteros, donde es posible inducir una producción de SOD de hasta 6 veces por encima de la cantidad normal de SOD. Estas células superproductoras de SOD no han resultado ser las células tan "excepcionales" como algunos esperaban (29). En realidad, estas células presentan una serie de alteraciones tan interesantes como inesperadas. La tendencia a la peroxidación lipídica observada en tejidos de síndrome de Down también se observa en células HeLa humanas y en células L de ratón en las que se ha aumentado unas 6 veces su expresión de SOD (30). La captación de serotonina disminuida en las plaquetas se ha observado también en plaquetas de ratones transgénicos con una actividad de SOD aumentada (31). Finalmente, las uniones neuromusculares anormales de la lengua observadas en el síndrome de Down se reproducen en ratones transgénicos para la Cu,Zn-SOD (32). Esto ha sugerido que algunos de los síntomas del síndrome de Down serían un reflejo de la dosificación génica de SOD.

Todavía no se conoce muy bien el mecanismo por el cual demasiada cantidad y/o actividad de SOD puede ser tóxica para las células. Los enzimas que utilizan el radical superóxido, entre las que se encuentra la indolamina-2,3-dioxigenasa, compiten con la SOD por el radical superóxido disponible. Curiosamente, la indolamina-2,3-dioxigenasa degrada la serotonina, que es un neurotransmisor, y la dimetilriptamina, que es un metabolito normal alucinógeno. Michelson y col. (33) encontraron un nivel de actividad de SOD significativamente mas alto en una población de pacientes mentales adultos y en niños con psicosis evolutivas (34).

Omar y col. (6) han sugerido un mecanismo por el cual una baja concentración de radical superóxido, producido por un metabolismo normal y controlado por concentraciones normales de SOD, puede tener un papel importante para la célula al capturar a los radicales lipoperoxilos que propagan la lipoperoxidación. Después de todo, la única manera por la que un radical puede ser eliminado es por reacción con otro radical. El radical superóxido se produce de modo constante en el metabolismo normal y es un radical libre relativamente reactivo. Estas cualidades le hacen ser el candidato ideal para destruir otros radicales mas peligrosos.

Se puede concluir, por tanto, que el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes o, mas exactamente, entre el radical superóxido y la SOD, es un equilibrio muy sensible y delicado, que puede alterarse seriamente por la producción en exceso de radical superóxido, producción que puede estar causada por mecanismos patológicos o genéticos.

Ademas, el radical superóxido puede aumentar su concentración y toxicidad debido al efecto de factores exógenos que inducen la formación de radicales. Así, la inyección de fenilhidrazina causa daños a las membranas de los eritrocitos, porque la fenilhidrazina interacciona con la oxihemoglobina, incrementando la producción de radical superóxido (35). La inyección de 6-hidroxi-dopamina en animales causa degeneración nerviosa debido aparentemente a que en su autooxidación produce O_2^- (36). El alloxano produce degeneración de las células β del páncreas, produciendo diabetes, lo que puede ser

debido a que en su autooxidación produce O_2^- y OH^\bullet (37). El antibiótico estreptonigrina es bactericida porque incrementa la generación intracelular del radical superóxido (38). El radical superóxido también está implicado en el mecanismo de acción del tóxico hepático α -metil-dopa (39) y de los antibióticos adriamicina, daunorubicina y bleomicina, que son prometedores agentes antitumorales para el tratamiento clínico de neoplasmas (40,41). El carcinógeno benzopireno parece que se convierte en benzopirenodiol *in vivo*. Estos dioles se autooxidan rápidamente y generan O_2^- , que puede estar implicado en el daño causado al DNA por los benzopirenos (42). Los herbicidas bipyridilos, como el paraquat, se reducen en los pulmones por la cadena de transporte electrónico del retículo endoplásmico. Estos compuestos bipyridilos se autooxidan, produciendo radical superóxido (43). Los radicales ionizantes también producen radical superóxido, radical hidroxilo y oxígeno singlete, al producir la radiólisis del agua y del oxígeno (44). Las nitrosaminas específicas del tabaco y los radicales de oxígeno producen lesiones celulares graves que se explican por el incremento de la generación de radical superóxido que provoca la combinación de esos dos factores (45). En el metabolismo del alcohol se generan radicales superóxido e hidroxilo, por el sistema microsomal oxidante del etanol, lo que podría ser una de las causas de la enfermedad hepática alcohólica (46).

V. Niveles normales de actividad de superóxido dismutasa

Tras todo lo anteriormente expuesto sería comprensible el que la actividad de SOD se mantuviese como un valor relativamente constante a lo largo de la evolución. En un estudio muy amplio realizado en la población española, se valoró la actividad de SOD en 2397 individuos sanos de ambos sexos y de edades comprendidas entre los 18 y los 65 años y de distinta procedencia (medios rural y urbano). En dicho estudio (que constituyó mi Trabajo de Licenciatura) se observó que no había diferencias en la actividad de SOD entre ambos sexos, que los individuos del medio urbano presentaban una mayor actividad de SOD que los del medio rural, y que los jóvenes entre 18 y 26 años tenían una actividad de SOD mayor que el resto de la población de mas edad, manifestando después un valor

constante a partir de esa edad. Estudios realizados posteriormente por Guemouri y col. (47) en 1836 individuos sanos de edades comprendidas entre 5 y 97 años, mostraron que en los adultos no había diferencias respecto a la actividad de SOD entre sexos, y que la actividad de SOD era un valor bastante constante en adultos menores de 65 años. También observaron que esta actividad disminuía en un 16% en niñas de 10 a 16 años tras la menarquia. Otro dato importante de este trabajo fue la observación de que la actividad de SOD parecía disminuir a partir de los 65 años. Por otra parte, Michelson y col. (33) llevaron a cabo un muestreo de los niveles de actividad de SOD en eritrocitos de en un grupo reducido de personas sanas, no observando tampoco diferencias entre sexos. Analizando comparativamente poblaciones sanas, rurales y urbanas, observaron que estas últimas tenían una mayor actividad de SOD, lo que sugiere diferencias en el metabolismo del oxígeno entre poblaciones rurales y urbanas.

Se han publicado diferentes estudios que determinan la actividad de SOD en el embarazo, tanto en la madre como en el feto. Wisdom y col. (49) observaron que la actividad de SOD era menor en mujeres embarazadas que en mujeres no embarazadas. Esto podría ser reflejo de una producción enzimática reducida, lo que implicaría un menor estrés oxidativo intracelular, o de una mayor inactivación enzimática. Aliakbar y col. (50) encontraron que la actividad de SOD era menor en fetos que en recién nacidos, y que en estos era menor que en los adultos. Puesto que la tensión de oxígeno en la vida prenatal es cinco veces mas baja que tras el nacimiento, es de esperar que el contenido de SOD sea mas bajo en la sangre fetal que en neonatos y que los niveles de actividad de SOD aumenten posteriormente hasta alcanzar los valores del adulto. Huston y col. (51) también han observado que la actividad de SOD es menor en neonatos que en adultos. En un estudio comparativo realizado en mujeres que acababan de dar a luz y en sus hijos, Novak y col. (52) determinaron que las actividades de SOD que presentaban esos dos grupos eran similares, lo que se correspondería con la menor actividad de SOD observada en las mujeres embarazadas frente a las no embarazadas (49).

No obstante, existen pocos estudios poblacionales respecto a como evolucionan con la edad los niveles de actividad de SOD en los seres humanos. En la mayoría de los casos se trata, solo, de observaciones aisladas, salvo los trabajos ya citados de este autor y el de Guemouri y col. (47), que valora la actividad de SOD a partir de 5 años, y que no encontraron diferencias entre los distintos grupos de edades desde los 18 hasta los 65 años.

VI. Teoría de los radicales libres y el envejecimiento

Desde que, en 1956, Harman (53) propuso la teoría de los radicales libres y el envejecimiento, se ha producido una coincidencia casi general al considerar que un factor que contribuye al envejecimiento de los seres vivos es la acción nociva de una forma específica de la molécula de oxígeno, el radical superóxido, y de los demás radicales libres generados en el interior de las células. Algunos teóricos incluso consideran que este no es simplemente un factor mas, sino el mas importante del proceso degenerativo, Para ellos, el envejecimiento es en gran medida el resultado de una lucha desigual entre los radicales libres y toda una batería de sustancias que tratan de eliminarlos (entre los que se encuentra la SOD), en la que los primeros, a la larga, acaban venciendo. Desde entonces se han publicado un gran número de trabajos intentado confirmar o rebatir esta teoría. Puesto que los enzimas antioxidantes, entre los que se encuentra la SOD, son importantes para prevenir y minimizar el daño que los radicales libres de oxígeno pueden ocasionar a las células, cualquier modificación relacionada con la edad en la expresión de estos enzimas puede incrementar el daño producido por los radicales libres en células de organismos senescentes y, de esta forma, afectar al status fisiológico de la célula, y, por tanto, al organismo. Tolmasoff y col. (54) mostraron la importancia potencial de los enzimas antioxidantes en el envejecimiento al comparar la vida máxima potencial de diferentes especies, y encontrar una buena correlación entre la actividad de SOD y la vida máxima potencial, es decir, que aquellos mamíferos que tienen una mayor expectativa de vida tienen también una mayor actividad de SOD por nivel basal ("rate") metabólico.

Guemouri y col. (47) ya habían indicado que la actividad de SOD parecía disminuir con la edad. Esta disminución también fue observada por Perrin y col. (55) y por Sulkawa y col. (56). No obstante, también se han publicado trabajos en los que esta actividad no estaba alterada (57, 58, 59).

Los estudios realizados por Michelson y col. (33) en ancianos, muestran que estos presentaban una actividad de SOD normal si se encontraban en un buen estado de salud. Pero, cuando los ancianos se encontraban en malas condiciones físicas, necesitando cuidados clínicos los valores medios de actividad eran normales pero mostraban unas desviaciones 2,5 veces superiores a los valores normales, observándose una distribución bimodal. Por lo tanto, podría pensarse que tanto los valores altos como bajos de actividad de SOD se pueden asociar con síntomas de senilidad, algunos de los cuales podrían ser el resultado de una protección disminuida contra los procesos de envejecimiento causados por el radical superóxido y sus derivados. Esto sugiere que la longevidad no está necesariamente asociada con niveles alterados de actividad de SOD, pero si que los procesos de envejecimiento tienen lugar mas rápidamente bajo esas condiciones. Sin embargo, es igualmente posible que cualquier alteración en los niveles de actividad de SOD sea el efecto mas que la causa de los procesos de envejecimiento.

Una patología que se asocia tradicionalmente con el envejecimiento es la enfermedad de Alzheimer. Se ha propuesto que la formación incrementada de radicales libres derivados del oxígeno, tales como los radicales superóxido e hidroxilo, pueden ser responsables de la degeneración neuronal progresiva en la demencia del tipo Alzheimer. Diversos procesos incrementan la formación de radicales libres y alguno de ellos (trauma cerebral, envejecimiento) son factores de riesgo para este tipo de demencia. Existen evidencias del aumento en la formación de radicales libres en el Síndrome de Down, que se asocian con el desarrollo de la patología de la enfermedad de Alzheimer. Una de las posibles explicaciones del deterioro cognitivo de los pacientes con demencia del tipo Alzheimer, sería una alteración en la actividad de enzimas que protegen al cerebro de la

acción nociva de los radicales libres. Sin embargo, la literatura publicada hasta el momento no ha podido confirmar este hecho, ya que mientras algunos autores (56, 57, 58, 60) no han detectado variaciones en la actividad de SOD en individuos con demencia tipo Alzheimer, otros autores sí han observado un incremento en la actividad de esta enzima (55, 61).

VII. Importancia de la actividad de SOD en diferentes patologías

Los radicales libres son los últimos patógenos que han surgido en el panorama médico. El creciente interés que la literatura médica le está dedicando a los radicales libres traduce la sospecha de que estas especies químicas son dañinas para la salud humana, y que una actuación sobre los oxidantes o los sistemas antioxidantes del organismo pueden abrir nuevas y revolucionarias formas de tratar o prevenir muchas enfermedades. Aunque con toda probabilidad intervienen, al menos en parte, en la patogenia de un buen número de procesos patológicos, la verdad es que solo en unos pocos se ha podido demostrar a ciencia cierta que los radicales libres tengan un papel crucial. Mientras que ha sido posible demostrar la generación de radicales libres en prácticamente todos los órganos, todavía no esta muy definida la capacidad de SOD para proteger a estos órganos es determinadas situaciones.

A. Patologías del Sistema nervioso

El cerebro tiene ciertos atributos que lo hacen especialmente vulnerable al ataque de los radicales libres. Es un órgano altamente oxigenado, responsable del consumo de casi una quinta parte del oxígeno total consumido por el organismo. Se ha investigado *intensamente el papel de los radicales libres de oxígeno en la patogénesis del infarto y el edema cerebral que siguen a la isquemia cerebral*. Debido a las dificultades técnicas para la determinación de radicales libres en tejido cerebral, todavía no se conoce muy bien el papel que dichos radicales juegan en la patogenia de la isquemia cerebral. Kontos y Col. (62) han demostrado la generación de radical superóxido durante procesos de reperfusión

en el cerebro, produciéndose sobre todo en las meninges, en células endoteliales y de músculo vascular liso y en el espacio extracelular. El papel tan relevante que el anión superóxido parece tener en la génesis de la isquemia podría deberse a un descenso de la actividad de SOD en la fase temprana de la misma. Algunos autores han observado una disminución de productos de peroxidación lipídica y de la actividad de diferentes enzimas antioxidantes, entre los que se encuentra SOD, en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con diversos tipos de daños vasculares cerebrales (63). Esta disminución tiende a normalizarse a los 14-15 días y el grado de estas alteraciones se corresponde con la severidad de los daños. Sin embargo, en aquellos procesos en los que tras la isquemia se produce reperusión, la actividad de SOD aumenta, debido probablemente a una mayor concentración de radicales libres de oxígeno (64). Aunque la isquemia focal es completa en el foco, existe un área perifocal de penumbra con un grado más moderado de isquemia. Este área es inicialmente viable, pero con una baja reperusión se produce la muerte celular, necrosis glial e infarto. En un trabajo realizado con ratones transgénicos con una actividad de SOD endógena 3,1 veces superior a la normal se observó que en el área de penumbra no se desencadenaba infarto cerebral, mientras que en ratones no transgénicos a los que también se había provocado una isquemia focal cerebral si se produce infarto (65). Esta observación sugiere que una mayor actividad de SOD endógena protege al área de penumbra del daño isquémico, tanto por capturar directamente al radical superóxido como por reducir el estrés oxidativo al modular otros niveles antioxidantes.

El metabolismo de catecolaminas está probablemente asociado con la formación de radicales libres ya que las catecolaminas pueden oxidarse para formar quinonas y semiquinonas, lo que puede generar radicales libres. La presencia de una gran cantidad de metales de transición como el hierro y el cobre puede estar asociada con un incremento de la producción de radicales libres al catalizar la reacción de Haber-Weiss. De las diferentes regiones del cerebro, el ganglio basal es el que presenta mayor riesgo de sufrir lesión a través de los radicales libres, por contener gran cantidad de hierro y catecolaminas.

Una de las primeras enfermedades del cerebro que se pensó que podían estar asociadas con la producción de radicales libres es la enfermedad de Parkinson. Las neuronas dopaminérgicas principalmente afectadas en la enfermedad de Parkinson son las neuronas melanizadas de la parte compacta de la sustancia nigra. Aunque la causa de la muerte de la células nigra es aún desconocida, se ha implicado a los radicales libres de oxígeno como un mecanismo citotóxico potencial. Esto se debe a que en el metabolismo de las catecolaminas reguladas por MAO se produce la autooxidación de la dopamina y de otras catecolaminas. También se ha observado que existen deficiencias en el sistema protector frente a los radicales libres, al aumentar los niveles de metales de transición y producirse un descenso en la ferritina, y al observarse una mayor lipoperoxidación y una mayor actividad de SOD en la sustancia nigra en la enfermedad de Parkinson (66). Otros autores han observado este incremento de la actividad de SOD en la corteza frontal y el putamen (67) y en el núcleo basal (68). Un incremento en la actividad de SOD daría lugar a la producción de una gran cantidad de peróxido de hidrógeno que, en presencia de Fe(II) generaría radical hidroxilo. Puesto que no se conoce ningún mecanismo de defensa frente a estos radicales, se produciría daño oxidativo en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Parkinson (69).

Se han observado también alteraciones en la actividad de SOD en otras patologías del cerebro, como es la esquizofrenia, en la que algunos autores han observado una actividad de SOD aumentada (70, 71).

B. Procesos Tumorales

En un proceso de carcinogénesis se pueden distinguir dos fases (72): La primera, o de iniciación, puede considerarse como la activación o generación de un "oncogen". Este paso puede darse por la integración de un retrovirus, por una mutación, o bien por una transposición inducida por daño en el DNA. Sin embargo, esta fase, aunque necesaria, no es suficiente para que se produzca la transformación de la célula, a no ser que la célula se encuentre en estado de crecimiento. Este estado de crecimiento puede ser activado de

varias maneras, y a los agentes que producen esta activación se les conoce con el nombre de promotores. Así, para que tenga lugar un proceso canceroso, se requieren dos elementos: a) la activación de un "oncogen"; y b) la activación de un estado proliferativo. Algunos tipos de daños en el DNA, tales como roturas de las cadenas pueden actuar de las dos maneras (72).

La hipótesis de que los radicales libres están implicados en los procesos de carcinogénesis no es nueva, aunque es difícil encontrar una prueba definitiva debido a la gran cantidad de resultados contradictorios obtenidos. Los radicales libres pueden estar implicados en procesos de iniciación y promoción de los procesos tumorales, ya que atacan al DNA produciendo roturas de cadenas sencillas y dobles, uniones cruzadas entre cadenas de DNA y aberraciones cromosómicas, iniciando así un proceso de carcinogénesis. Por otra parte, la evidencia indirecta de que los sistemas antioxidantes protegen a las células de la promoción de los procesos tumorales indica que los radicales libres están implicados en este proceso. Así, se ha observado que células de tumor de mama con una mayor actividad de SOD eran mas resistentes a la toxicidad del oxígeno que aquellas que tenían menos actividad (73). Otro dato importante es la mayor protección frente a la radiación que presentan células con mayor actividad de SOD (74).

La actividad de SOD parece estar alterada en un gran número de tumores. Así, se ha encontrado que esta está disminuida en cáncer de estomago (75), cáncer hepático (76), en tumores cerebrales (77) y en cáncer de mama (78). Por otra parte, parece estar aumentada en pacientes con leucemia mieloblástica y linfoblástica, en la enfermedad de Hodking, en el linfosarcoma (79) y en cáncer de colon (80). La mayoría de estos datos corresponden a observaciones aisladas. De ahí el interés de obtener datos de grupos con mayor número de pacientes.

C. Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad heterogénea caracterizada por una deficiencia, absoluta o relativa, de insulina y resistencia a insulina. Las manifestaciones clínicas son: hiperglucemia, glucosuria, metabolismos alterados de proteínas, grasas y glúcidos, y patologías micro y macro vasculares (81). Se distinguen dos tipos principales de diabetes: Tipo I o diabetes mellitus insulín dependiente, menos frecuente y que afecta a personas jóvenes; y Tipo II o diabetes mellitus no insulín dependiente, mucho más frecuente, menos expresiva en síntomas, relativamente bien tolerada y que afecta a personas en la madurez, con incidencia creciente en las últimas etapas de la vida. Se han publicado diversos estudios que indican que SOD es susceptible a la glicosilación por medio de la reacción de Maillard y, por tanto, su expresión puede estar disminuida en los eritrocitos de pacientes con diabetes. Así, Sakurai y col. (82) han observado que al incubar SOD purificada con altas concentraciones de glucosa se produce tanto glicosilación de los restos de lisina como pérdida de actividad enzimática. Por otra parte, el páncreas es un órgano relativamente bajo en enzimas antioxidantes por lo que es más sensible al ataque oxidativo. De hecho, se ha sugerido que parte de la lesión que tiene lugar en las células β del páncreas es debida al ataque por diferentes radicales libres como lipoperóxidos y peróxido de hidrógeno (83). La acción combinada de los radicales libres y la hiperglucemia puede tener efectos importantes sobre el nivel de expresión de SOD en los eritrocitos de pacientes con diabetes. Estudios llevados a cabo en individuos con diabetes han mostrado que la actividad de SOD se encuentra disminuida en pacientes con diabetes insulín dependiente (84, 85), debido probablemente a que SOD se encuentra glicosilada en una gran proporción. Igualmente se ha observado que está aumentada en madres con diabetes gestacional (86) y no se detectan alteraciones en poblaciones cuando los dos tipos de diabetes (tipo I y tipo II) están incluidas en la muestra analizada (81, 87, 88). Un mayor conocimiento sobre los niveles de actividad de SOD en los pacientes con diabetes (tipos I y II) podría tener valor pronóstico.

D. Cataratas

Las cataratas son la patología mas frecuente del cristalino y es una de las causas mas importantes de ceguera reversible. Aproximadamente el 60% de las personas de 60 años presentan indicios del comienzo de esta patología. Por encima de los 65 años aparece en el 95% de la población, de ahí que las cataratas se puedan considerar como un proceso propio del envejecimiento, que afecta a personas de edad avanzada. Se ha propuesto que varias especies activadas de oxígeno, como el anión superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo pueden estar implicados en la cataractogénesis (89, 90). Sin embargo, no se conoce con detalle como estas especies activadas de oxígeno y sus reacciones pueden iniciar la formación de cataratas. Se ha observado una mayor concentración de peróxido de hidrogeno en ojos con cataratas. Además, se ha observado que los radicales libres de oxígeno se generan en cantidad excesiva en varias cataratas experimentales y en cataratas seniles humanas como consecuencia de la fotooxidación del cristalino, de una mayor peroxidación lipídica y de un descenso en las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas de los cristalinos con cataratas (91). El cristalino está bien equipado con sistemas protectores enzimáticos (como SOD, catalasa y glutatión peroxidasa) y con captadores de radicales libres endógenos (como el glutatión y el ácido ascórbico), que se encuentran en cantidades superiores a las normales en el organismo, ejerciendo en el cristalino una protección natural frente a la fotooxidación. Se produce la paradoja de que, a pesar de la alta concentración de antioxidantes que existen en el cristalino, se producen alteraciones oxidativas en el ojo. Esto es debido a que tanto el glutatión como el ácido ascórbico pueden sufrir una activación prooxidante debido al efecto de metales de transición, como el hierro y el cobre, o de fotosensibilizadores endógenos, como la riboflavina (92). De ahí la gran importancia de los enzimas antioxidantes, como la SOD, en el mantenimiento del equilibrio de oxido-reducción en el cristalino ya que se ha encontrado que SOD disminuye tanto en cristalinos que envejecen normalmente como en aquellos que muestran opacidades (93)

E. Síndrome de Down

Otra patología en la que la actividad de SOD se encuentra alterada es el síndrome de Down. Como ya se ha indicado, el gen que codifica la SOD ha sido localizado en el cromosoma 21, concretamente en la región 21q22.1 (94). Se ha determinado en muchos casos de trisomía 21 la actividad de SOD, observándose un efecto de dosis, es decir, los pacientes afectados de trisomía 21 mostraban un 50% más de actividad de SOD. Se ha estudiado esta actividad en monosomías 21 parciales y en trisomías 21 parciales y completas, encontrándose que la actividad de SOD está incrementada en un 50% en los casos en los que la trisomía afecta a la banda 21q22.1 (95). Se ha observado también un efecto de dosis de SOD en casos de traslocaciones y mosaicismos del cromosoma 21 (96), y una disminución del 50% del valor normal de actividad enzimática en un caso de monosomía 21q- (97, 98). Se ha detectado, también, en los linfocitos de pacientes afectados por el síndrome de Down, una mayor protección frente a las radiaciones y una mayor estabilidad de las cadenas de DNA. frente al ataque del radical superóxido (99).

F. Otras patologías

En todas estas patologías se ha descrito el papel primordial desempeñado por SOD, sin embargo, no son las únicas ya que existen también otra serie de patologías en las que la actividad de SOD puede estar alterada. Así, por ejemplo, se ha detectado que la actividad de esta enzima parece disminuir al aumentar patológicamente la tensión arterial (100). También se ha encontrado un incremento en la actividad de SOD en la sangre de niños y adolescentes con fallo renal crónico (101). Por otra parte, también se ha encontrado que la actividad de SOD se encontraba disminuida en pacientes con anemia falciforme (102), artritis reumatoide (103), psoriasis (104), en pacientes con paraplejía traumática (105), con infecciones respiratorias (106) y en individuos con Lupus Eritomatoso Sistémico (107). También se ha observado que la actividad de SOD era menor en individuos con enfermedades hepáticas (108) , con anemia de Fanconi (109) y con bocio

(110). El problema es que en la mayoría de estas patologías se trata de observaciones aisladas y sería necesario realizar estudios mas amplios para confirmas estas alteraciones.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS
DOCTORAL

Son varias las razones que me han inducido a realizar este trabajo. Por una parte, la ausencia de datos sobre la actividad de SOD en todas las etapas de la vida. Bien es verdad, que en mi Trabajo de Licenciatura, ya quedó reflejado lo que ocurría en la población española con edades comprendidas entre los 18 y los 65 años; pero, faltaban dos etapas muy importantes: por un lado la etapa que va desde el nacimiento hasta la adolescencia, que podríamos considerar como etapa infantil; y la que abarca o comprende la última etapa de la vida, esto es, la ancianidad. Ambas etapas son indudablemente muy importantes por los cambios fisiológicos de desarrollo, hormonales, de adaptación, etc. que se producen. Estos datos nos permitirían determinar la evolución o variación de la actividad de SOD en el transcurso de la vida, diferenciando las variaciones producidas por el estado de desarrollo del individuo de aquellas otras asociadas con patologías y enfermedades.

Por otra parte, se han relacionado muchas patologías con alteraciones en los niveles de SOD (tan perjudicial puede ser un descenso como un incremento en la actividad de SOD, al alterarse el equilibrio que existe entre los diferentes sistemas antioxidantes), pero hay que reconocer que en la mayoría de los casos se trata de observaciones aisladas y que no permiten establecer conclusiones definitivas sobre el papel que desempeña la SOD en patologías tales como el cáncer, la diabetes, las demencias seniles, las cataratas, por citar algunas de ellas. Y, finalmente, debido a la enorme controversia que existe con el "boom" de los radicales libres, a los que además de asociarlos con múltiples trastornos, se les considera responsables del envejecimiento, esta Tesis Doctoral pretende aportar nuevos datos que permitan esclarecer el complejo equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes, así como la influencia que los radicales libres puedan ejercer tanto sobre diferentes procesos patológicos como en el envejecimiento humano.

Por todo ello, los objetivos que se plantean en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Valorar la actividad de SOD en la población española sana, desde el nacimiento hasta la etapa final de la vida, lo que permitiría diferenciar las variaciones producidas por el estado del desarrollo del individuo de otras asociadas con patologías y enfermedades.
2. Determinar en que medida ciertas características del individuo tales como sexo, edad, medio ambiente, lugar de procedencia, etc., influyen sobre los niveles de actividad de SOD.
3. Observar si se producen modificaciones en la actividad de SOD en la última etapa de la vida, y, de este modo, realizar nuevas aportaciones a la teoría de los radicales libres y el envejecimiento humano.
4. Determinar la actividad de SOD en determinadas patologías consideradas como propias del paso de los años tales como las cataratas, la osteoporosis, los accidentes cerebrovasculares, los adenomas de próstata, los miomas, las patologías osteoarticulares, cardiovasculares, del sistema respiratorio, etc. Esto permitirá diferenciar los cambios fisiológicos normales propios del envejecimiento de aquellos relacionados con los diferentes procesos patológicos que afectan a los individuos en la última etapa de su vida.
5. Analizar la actividad de SOD en pacientes afectados de diferentes procesos tumorales para poder así establecer si la actividad de SOD se encuentra alterada y en que grado. Este conocimiento facilitaría una mayor comprensión del modo de actuación de los radicales libres de oxígeno en los procesos de carcinogénesis, así como la búsqueda de nuevas estrategias en la lucha contra el cáncer.
6. Estudiar la actividad de SOD en pacientes afectados de Diabetes Mellitus, tanto insulín dependientes como no insulín dependientes, para poder cuantificar en que medida una mayor o menor actividad de SOD afecta a esta patología. De

esta forma, se aportarían nuevos datos al conocimiento de los diferentes factores desencadenantes de esta patología, de gran importancia tanto clínica como socialmente

7. Valorar la actividad de SOD en una población de individuos afectados de síndrome de Down. De este modo, podría confirmarse el efecto de dosis ya observado aisladamente lo que permitiría un mejor estudio y diagnóstico de cualquier alteración del cromosoma 21, así como disponer de un nuevo método de valor diagnóstico en aquellos casos, tales como mosaicismos y traslocaciones parciales, en los que la sintomatología clínica es más confusa y poco definida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han analizado un total de 4.760 individuos de ambos sexos, de edades comprendidas desde el nacimiento hasta los 93 años, sanos o con determinadas patologías que se detallaran posteriormente. Las muestras de sangre, que proceden de diversos centros hospitalarios y asistenciales de la Comunidad de Madrid, fueron recogidas con heparina o EDTA (K₃), para evitar su coagulación. Los 4.760 individuos analizados se distribuyen según los siguientes grupos poblacionales:

A) Descripción de la muestra analizada

A.1. Población adulta:

Esta constituida por 2.397 individuos sanos, de ambos sexos, de edades comprendidas entre los 18 y los 65 años, siendo todos ellos donantes altruistas de sangre. Las muestras de sangre se obtuvieron por medio del Instituto Nacional de Hematología y Hemoterapia en Madrid, que realiza extracciones de sangre en gran parte del territorio nacional. Se eligió este colectivo debido a que permitía tener un buen número de muestras de sangre de personas sanas, de las cuales se sabía que no tenían ningún tipo de alteración que pudiera inducir a error en la elaboración de un patrón de actividad de SOD.

A.2. Población Infantil y adolescente

Integrada por un total de 1.051 niños, de ambos sexos, de edades comprendidas desde el nacimiento hasta los 18 años.

Las muestras de sangre de niños recién nacidos fueron obtenidas de sangre de *cordón umbilical que fue extraída por el Servicio de Maternidad del Hospital Materno-Infantil 12 de Octubre de Madrid*. Todas las muestras procedían de niños nacidos a término, de peso normal, sin presentar ninguna patología y en un parto sin incidencias.

Las muestras de sangre de niños entre 0 y 18 años fueron obtenidas a través de los Servicios de Hematología de los Hospitales de la Cruz Roja e Infantil del Niño Jesús, del

Servicio Regional de Salud de la Comunidad Autónoma de Madrid, y del Laboratorio de Análisis del Ambulatorio de la Seguridad Social de Orcasitas de Madrid. Todas las muestras procedían de niños sanos.

A.3. Población mayor de 50 años

Compuesta por un total de 126 individuos de edades comprendidas entre los 50 y los 96 años, de ambos sexos y en buen estado de salud. Se analizaron también 374 individuos que presentaban las siguientes patologías: 14 con accidente cerebrovascular agudo, 67 con enfermedades del sistema cardiovascular, 22 individuos afectados de cataratas, 6 con demencias, 21 con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, 36 con miomas, 9 con osteoporosis, 50 con patología prostática, 97 con patologías del sistema osteo-articular, y 52 con otras patologías. Los individuos analizados no presentaban otras patologías además de las ya descritas y fueron diagnosticados por los correspondientes servicios del Hospital de la Cruz Roja de Madrid. Las muestras de sangre se obtuvieron a través del Servicio de Hematología del Hospital de la Cruz Roja de Madrid.

A.4. Población con diferentes tipos de procesos cancerosos.

Se analizaron un total de 183 individuos de ambos sexos, de edades comprendidas entre los 2 y los 80 años, y con diferentes tipos de tumores: 8, cáncer de cabeza y cuello; 20, cáncer de aparato digestivo; 28, linfomas; 15, cáncer de mama; 13, mielomas; 7, cáncer de ovario y útero; 12, cáncer de próstata; 34, cáncer de pulmón; 30 presentaban tumores de tejido glial del Sistema Nervioso Central; y 16, otros tipos de tumores. Todos ellos fueron diagnosticados por el Servicio de Radiocirugía y Radiodiagnóstico del Sanatorio San Francisco de Asís de Madrid, por el Servicio de Oncohematología Infantil del Hospital Gregorio Marañón de Madrid, y por los Servicios de Hematología de los Hospitales 12 de Octubre y Cruz Roja de Madrid, que nos facilitaron las muestras.

A.5. Población con diabetes.

Se estudió un total de 369 individuos de ambos sexos, de edades comprendidas entre los 4 y los 85 años. 183 presentaban una Diabetes Mellitus tipo I o insulín dependiente y 186 presentaban una Diabetes Mellitus tipo II o no insulín dependiente. Las muestras fueron proporcionadas por el Servicio de Bioquímica del Hospital de la Cruz Roja de Madrid.

A.6. Población con Síndrome de Down.

Se analizaron un total de 260 individuos de ambos sexos, de edades comprendidas entre los 2 y los 45 años. Todos ellos habían sido diagnosticados de Síndrome de Down, y el 42% había sido cariotipado, presentando un 53%, una trisomía 21 completa; y un 47% presentaban trisomías 21 parciales, traslocaciones y mosaicismos que afectaban al cromosoma 21. Las muestras de sangre fueron obtenidas a través del Servicio Regional de Salud de la Comunidad de Madrid.

B) Determinación de la actividad de superóxido dismutasa

La medida de la actividad de SOD presenta un gran problema, poco frecuente en ensayos enzimáticos habituales, derivado de la inestabilidad intrínseca en medios acuosos de su sustrato, el radical superóxido. Se consiguió determinar directamente la actividad de SOD observando la desaparición catalizada por esta enzima, del radical superóxido libre, generado por un pulso de electrones sobre una escala de milisegundos, pero este ensayo no resulta asequible para la mayoría de los laboratorios ya que es necesaria la presencia de un acelerador lineal de electrones. Debido a ello, las determinaciones de la actividad de SOD se han tenido que apoyar en variaciones de concentraciones constantes de radical superóxido, catalizadas por la enzima. Así, todos los métodos diseñados más comúnmente utilizados precisan de dos componentes: un generador de radical superóxido y un detector del mismo (111).

En este método se mide, por tanto, la inhibición de la reducción del NBT, inhibición medible espectrofotométricamente. Esta inhibición se mide frente a un control en el que no existe SOD. Se considera como una unidad de actividad de SOD a la actividad de esta enzima que produciría un 50% de la máxima inhibición causada por esta enzima sobre la reducción del NBT, según la definición de McCord y Fridovich (2).

De entre los distintos métodos descritos en la bibliografía se eligió el de Minami y Yoshikawa debido a que se adaptaba muy bien para realizar estudios poblacionales, ya que es un método rápido y no excesivamente laborioso. Así mismo, presentaba un alto grado de reproductibilidad, observándose un coeficiente de variación del 5,1%. Además, presentaba la ventaja de requerir una escasa cantidad de sangre (0,1 ml) para la correcta extracción de la enzima, lo que le convertía en el método de elección a la hora de estudiar una población infantil o enferma.

REACTIVOS

Se preparan las siguientes soluciones

1. Buffer Tris-cacodílico a pH=8,2: Se disuelven 5 g de cacodilato sódico y 0,8 mmoles (0,31 g) de ácido dietilentriamino pentaácetico en 425 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 8,2 con tris (hidroximetil) amino metano 1M (6,05 g/50 ml de agua destilada) y se completa el volumen hasta 500 ml con agua destilada. Esta disolución se conserva en frío(4-10°C), siendo conveniente comprobar el pH cada semana y desechar la solución en el caso de que este hubiera descendido.

2. Solución de Pirogalol: Se prepara una disolución stock 1,8 mM, disolviendo 11,35 mg de pirogalol en 50 ml de HCl 1M, y se guarda en frío (4-10°C) hasta el momento de su uso. Para la determinación de la actividad de SOD se diluye esta solución hasta 0,9 mM con agua destilada.

3. Solución de Triton X-100 al 16%: Se mezclan 16 ml de Triton X-100 hasta 100 ml con agua destilada. Esta disolución se conserva en frío (4-10°C).

4. Solución NBT 0,98 mM: Se disuelven 40,1 mg de NBT en 50 ml de agua destilada. Esta disolución se conserva protegida de la luz y en frío (4-10°C).

5. Solución "stopper": Se prepara un buffer fórmico 2 M, a pH=3,5, con Triton X-100 al 16%. Para ello, se disuelven 4,035 ml de ácido fórmico al 85% de pureza y 4,55 ml de Triton X-100 al 16% con agua destilada hasta obtener 50 ml de disolución. Se ajusta el pH a 3,5. Esta disolución se conserva en frío (4-10°C).

PROCEDIMIENTO A SEGUIR

A 0,1 ml de sangre venosa entera se le añaden 0,9 ml de agua destilada fría (0-4°C) para producir la hemólisis. Se desnaturaliza la hemoglobina añadiendo 0,25 ml de cloroformo y 0,5 ml de etanol y agitando fuertemente durante 2,5 minutos, siendo el grado de agitación muy importante para la correcta extracción de la enzima. Esta mezcla se centrifuga a 18.000 x g durante 1 hora, retirándose el sobrenadante para la determinación de la actividad de SOD. Se desechan los extractos que muestren turbidez o coloración. Los extractos se mantienen a -25 °C sin perder actividad de SOD durante 3 meses, a partir de los cuales se va perdiendo actividad.

Para la determinación de la actividad de SOD se preparan dos tubos:

- Tubo Control: 0,5 ml de buffer Tris-cacodílico a pH=8,2; 0,1 ml de Triton X-100 al 16%;
0,25 ml de agua destilada y 0,25 ml de NBT 0,98 mM.

- Tubo Problema: 0,5 ml de buffer Tris-cacodílico a pH=8,2; 0,1 ml de Triton X-100 al 16%;
0,25 ml de extracto de SOD y 0,25 ml de NBT 0,98 mM.

Para comenzar la reacción se añade a los dos tubos 10 µl de pirogalol 0,9 mM realizando una primera lectura en el espectrofotómetro a 540 nm. A continuación se incuban

estos tubos en baño María a 37 °C durante 5 minutos y, pasados estos, se les añade 0,1 ml de la solución "stopper" para detener la reacción. Tras esto, se procede a la lectura del incremento de absorbancia en cada tubo.

CALCULO DE LA ACTIVIDAD DE SOD

Se determina el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT por la SOD según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta A \text{ tubo control/minuto} - \Delta A \text{ tubo problema/minuto}}{\Delta A \text{ tubo control/ minuto}} \times 100$$

Y las unidades de actividad de SOD se calculan según la fórmula:

$$\text{Unids SOD/ ml de sangre} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50 \times \text{Vol. Sol. Enzimática}} \times \text{factor de dilución} \times 10$$

RESULTADOS

A. POBLACIÓN SANA

A. 1. Población adulta

En la Tabla 2 figuran los resultados obtenidos para la población adulta que, como puede observarse fue de $4,16 \pm 0,89$ unidades de actividad de SOD/ml de sangre. En la misma tabla se puede observar también el valor de actividad de SOD en dicha población según su sexo.

Tabla 2. Valores de actividad de SOD en la población adulta española distribuida por sexos.

	Individuos totales	Varones	Mujeres
Nº de individuos analizados	2.397	1.539	858
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	4,16	4,2	4,09
Desviación standard	0,89	0,97	1,01

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los dos grupos.

En la gráfica 1 se observa la distribución de la actividad de SOD en la población adulta española, agrupada según su sexo.

Con objeto de determinar la influencia del medio ambiente sobre los niveles de actividad de SOD se distribuyó a la población adulta, según su procedencia en rurales y urbanos, obteniéndose los resultados descritos en las Tabla 3.

Tabla 3: Valores de actividad de SOD en la población adulta española distribuida según su procedencia.

	Individuos totales	Urbanos	Rurales
Nº de individuos analizados	2.397	2.049	348
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,16	4,22**	3,81**
Desviación standard	0,89	0,97	0,9

**Se realizó una prueba "t" de student, encontrándose diferencias muy significativas ($p < 0,001$) entre los dos grupos.

La distribución de la actividad de SOD en la población española adulta clasificada por su procedencia se ha consignado en la gráfica 2.

Otro factor que puede influir en la actividad de SOD es la edad. Por esto, se distribuyó a la población adulta en intervalos, elegidos aleatoriamente, de 10 en 10 años, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de actividad de SOD en la población adulta española clasificada según su edad

	Individuos totales	18-27 años	28-37 años	38-47 años	48-57 años	58-65 años
Nº individuos analizados	2.397	836	537	541	399	94
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,16	4,40**	4,01	4,03	4,06	4,04
Desviación standard	0,89	0,91	1,02	0,94	0,91	0,83

**Se realizó una prueba "t" de student entre los diferentes grupos de edades, encontrándose que los niveles de actividad de SOD eran significativamente distintos ($p < 0,001$) en la población comprendida entre los 18 y los 27 años, del resto de la población.

En la gráfica 3 puede verse la distribución de la actividad de SOD en la población adulta española clasificada según su edad

Puesto que los individuos de edades comprendidas entre los 18 y los 27 años presentaban una actividad de SOD significativamente más elevada que el resto de la población, se procedió a un estudio más detallado de este intervalo, encontrándose que la actividad de SOD es mas alta hasta los 26 años, como puede observarse en la Tabla 5.

Tabla 5: Valores de actividad de SOD en la población española comprendida entre los 18 y 27 años.

	18 años	19 años	20 años	21 años	22 años	23 años	24 años	25 años	26 años	27 años
Nº individuos analizados	6	88	123	118	93	107	83	80	79	59
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,2	4,48	4,55	4,61	4,46	4,44	4,55	4,23	4,45	4,06
Desviación standard	0,33	0,93	0,98	0,98	0,89	0,83	1,06	1,2	0,98	0,88

La distribución de la actividad de SOD en la población española adulta clasificada por su edad se muestra en la gráfica 3.

Debido a que tanto la procedencia como la edad son factores que parecen influir sobre la actividad de SOD, se consideró conveniente realizar un análisis multifactorial de la varianza, con objeto de observar el grado de influencia de cada uno de estos factores sobre dicha actividad. Los resultados pueden observarse en la Tabla 6.

Tabla 6: Tabla de análisis multifactorial de la varianza de la actividad de SOD en la población hispana, considerando los factores de sexo, edad y procedencia.

Factor	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Significación de F (p<....)
Interacciones de 1^{er} orden					
Sexo	0,874	1	0,874	1,515	n.s.
Edad	55,203	4	13,801	14,609	0,001***
Procedencia	31,539	1	31,539	6,867	0,01**
Interacciones de 2^{do} orden					
Sexo x edad	2,307	4	0,557	0,610	n.s.
Sexo x Procedencia	1,052	1	1,052	1,114	n.s.
Edad x Procedencia	18,370	4	4,593	4,862	0,001***
Residual	2241,673	2373	0,945		
Total	2351,018	2388	0,984		

***= muy significativo; **= significativo; n.s.= no significativo

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis de la varianza se procedió a separar a la población española adulta según su procedencia y analizar separadamente la influencia de la edad en la actividad de SOD, encontrándose que dicha actividad se encuentra aumentada en los individuos de 18 a 27 años de procedencia urbana y no en los individuos de esa edad de procedencia rural, como puede verse en las Tablas 7, 8 y 9, y en la gráfica 4.

Tabla 7: Valores de actividad de SOD en la población española adulta rural, clasificada por edades.

	Individuos totales	18-27 años	28-37 años	38-47 años	48-57 años	58-65 años
Nº de individuos analizados	348	81	79	94	67	25
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	3,81	3,79	3,61	3,89	4,05	3,59
Desviación standard	0,9	0,87	0,96	0,82	0,91	0,84

Se realizó un estudio de la "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes grupos de edades.

Tabla 8: Valores de actividad de SOD en la población española adulta urbana, clasificada por edades.

	Individuos totales	18-27 años	28-37 años	38-47 años	48-57 años	58-65 años
Nº de individuos analizados	2.047	756	457	446	321	70
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	4,22	4,49***	4,07	4,07	4,05	4,20
Desviación standard	0,9	0,92	1,01	0,88	0,94	0,89

Se realizó un estudio de la "t" de student, encontrándose diferencias muy significativas ($p < 0,001$) entre el grupo de edades comprendidas entre los 18 y los 27 años y los otros grupos.

Tabla 9: Valores de actividad de SOD en la población española adulta clasificada por edad y procedencia.

		Nº de Individuos analizados	Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	Desviación standard	t	p<.....
18-27 años	rurales	81	3,79	0,87	6,159	0,001***
	urbanos	756	4,49	0,92		
28-37 años	rurales	79	3,61	0,96	3,883	0,001***
	urbanos	457	4,07	1,01		
38-47 años	rurales	94	3,89	0,82	1,63	0,2(n.s.)
	urbanos	446	4,07	0,88		
48-57 años	rurales	67	4,05	0,91	0,073	n.s.
	urbanos	321	4,05	0,94		
58-65 años	rurales	25	3,59	0,84	2,693	0,01**
	urbanos	70	4,2	0,89		

***= diferencias muy significativas; **= diferencias significativas; n.s.= diferencias no significativas.

Gráfico 1: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población española adulta agrupada por sexos

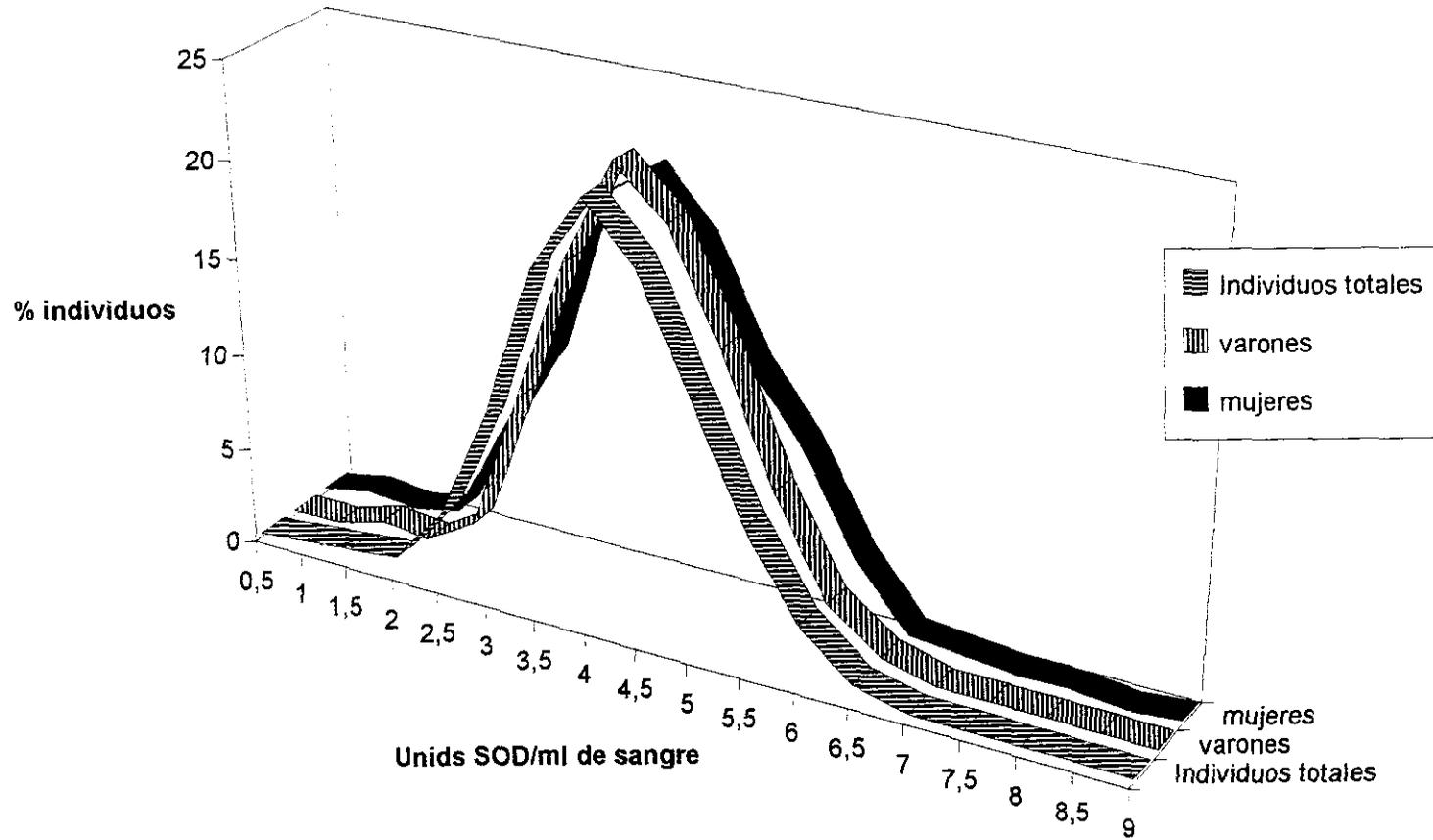
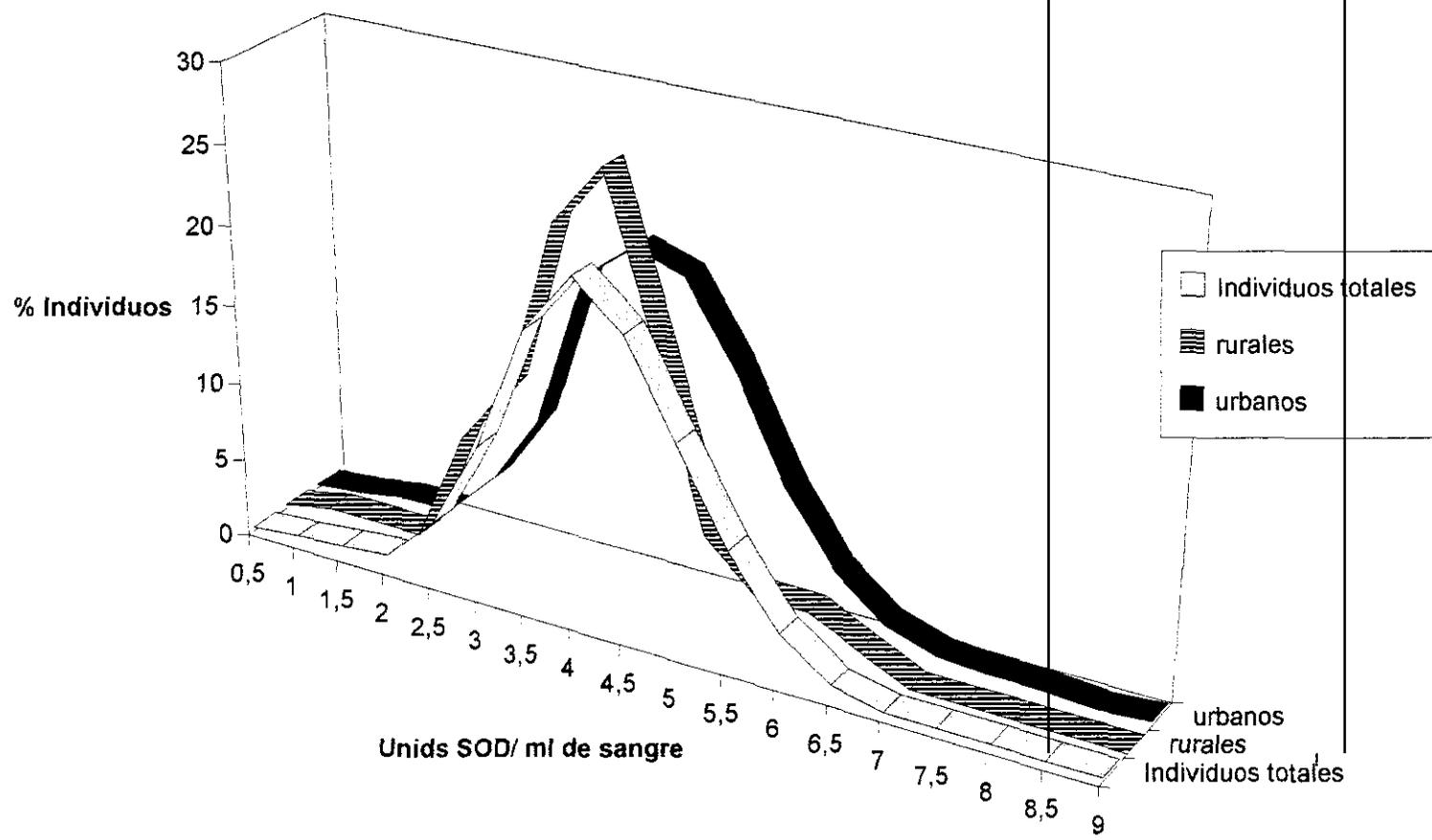


Gráfico 2: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población española adulta clasificada según su procedencia



Gráfica 3: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población española adulta agrupada por edades

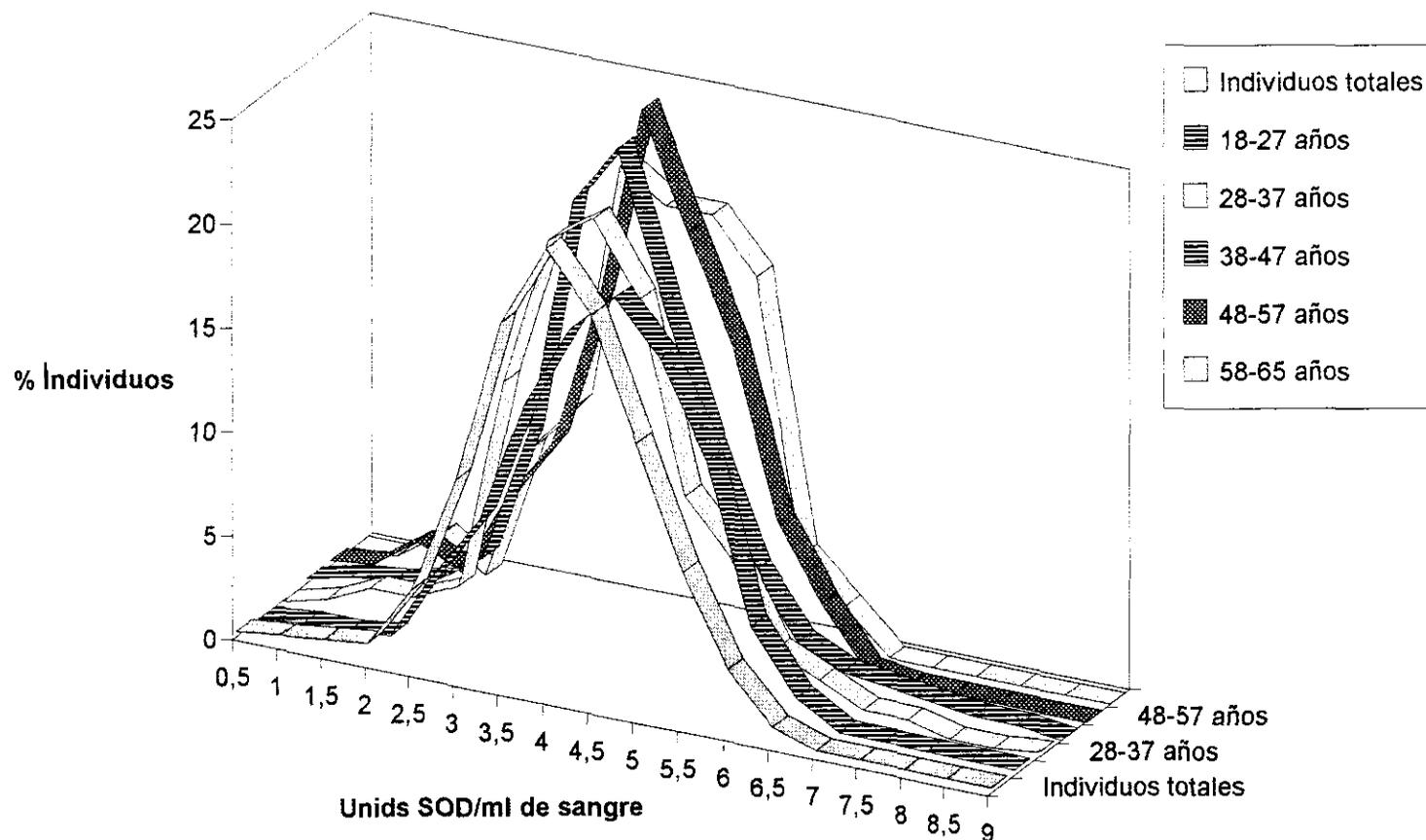
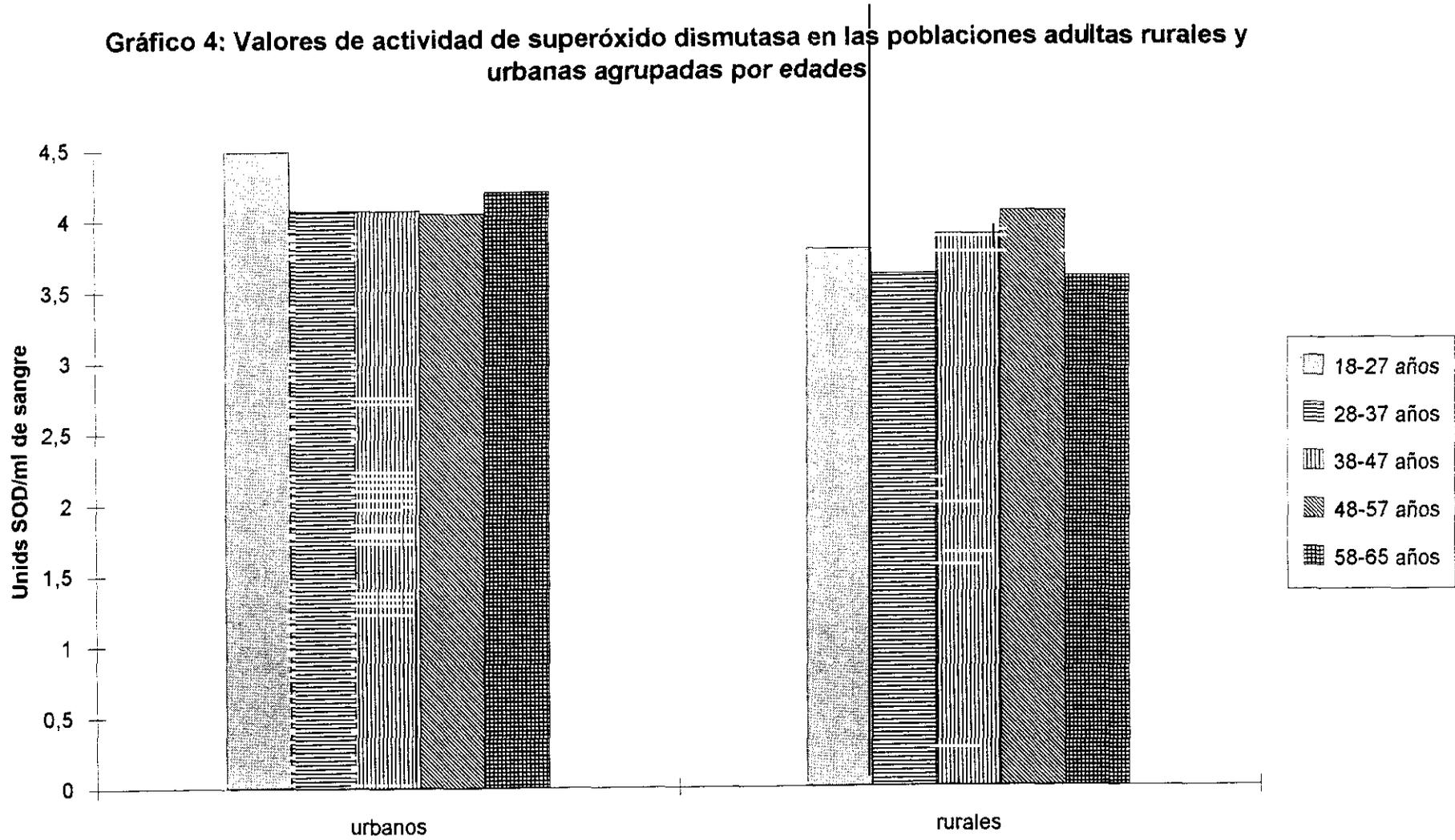


Gráfico 4: Valores de actividad de superóxido dismutasa en las poblaciones adultas rurales y urbanas agrupadas por edades



A. 2. Población infantil y adolescente

Como puede verse en la Tabla 10, la actividad media de SOD en la población infantil y adolescente (desde el nacimiento hasta los 18 años), fue de $4,64 \pm 1,09$ unidades/ml de sangre. En esta tabla puede observarse también que, a diferencia de los adultos, existen diferencias significativas entre sexos.

Tabla 10: Valores de actividad de SOD en la población infantil y adolescente española distribuida según su sexo

	Individuos totales	Varones	Mujeres
Nº de individuos analizados	1051	587	464
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,65	4,57*	4,73*
Desviación standard	1,09	1,09	1,08

*Se realizó una prueba "t" de student, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos.

Con objeto de observar la variación de la actividad de SOD con la edad se procedió a separar a los niños por su edad, encontrándose los resultados que se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Valores de actividad de SOD en la población infantil y adolescente española clasificada por su edad.

	Individuos totales	Recién nacidos	0-1 año	2-5 años	6-9 años	10-14 años	15-18 años
Nº de Individuos analizados	1051	94	31	255	206	96	369
Actividad media de SOD(unids/ml de sangre)	4,64	4,67	5,46**	5,14**	4,78	4,66	4,14**
Desviación standard	1,09	1,18	1,44	1,08	1,01	1,13	0,79

**Se realizó una prueba "t" de student entre los diferentes grupos de edades, encontrándose que los niveles de actividad de SOD eran significativamente mas altos entre 0 y 5 años ($p < 0,001$) y significativamente mas bajos entre 15 y 18 años ($p < 0,001$), siendo a esta edad semejantes a los de los adultos..

La distribución de la actividad de SOD en la población infantil y adolescente agrupada por edades puede verse en el gráfico 5.

Con objeto de observar si la diferencia en la actividad de SOD entre sexos se presentaba a cualquier edad se procedió a analizar conjuntamente los factores de edad y sexo, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 12 y en el gráfico 6.

Tabla 12: Valores de actividad de SOD en la población infantil y adolescente clasificada por su edad y su sexo.

		Nº de individuos analizados	Actividad media de SOD (Unids/ ml de sangre)	Desviación standard	p<....
Recién nacidos	Varones	51	4,68	1,19	n.s.
	Mujeres	43	4,85	1,18	
0-1 año	Varones	21	5,50	1,60	n.s.
	Mujeres	10	5,40	1,1	
2-5 años	Varones	136	5,09	1,01	n.s.
	Mujeres	119	5,20	0,14	
6-9 años	Varones	110	4,71	1,05	n.s.
	Mujeres	96	4,87	0,97	
10-14 años	Varones	56	4,60	1,03	n.s.
	Mujeres	40	4,74	1,27	
15-18 años	Varones	213	4,25	0,80	0,05*
	Mujeres	156	4,07	0,78	

*= diferencias significativas; n.s.= diferencias no significativas.

Gráfico 5: Distribución de la actividad de SOD en la población infantil y adolescente agrupada por edades

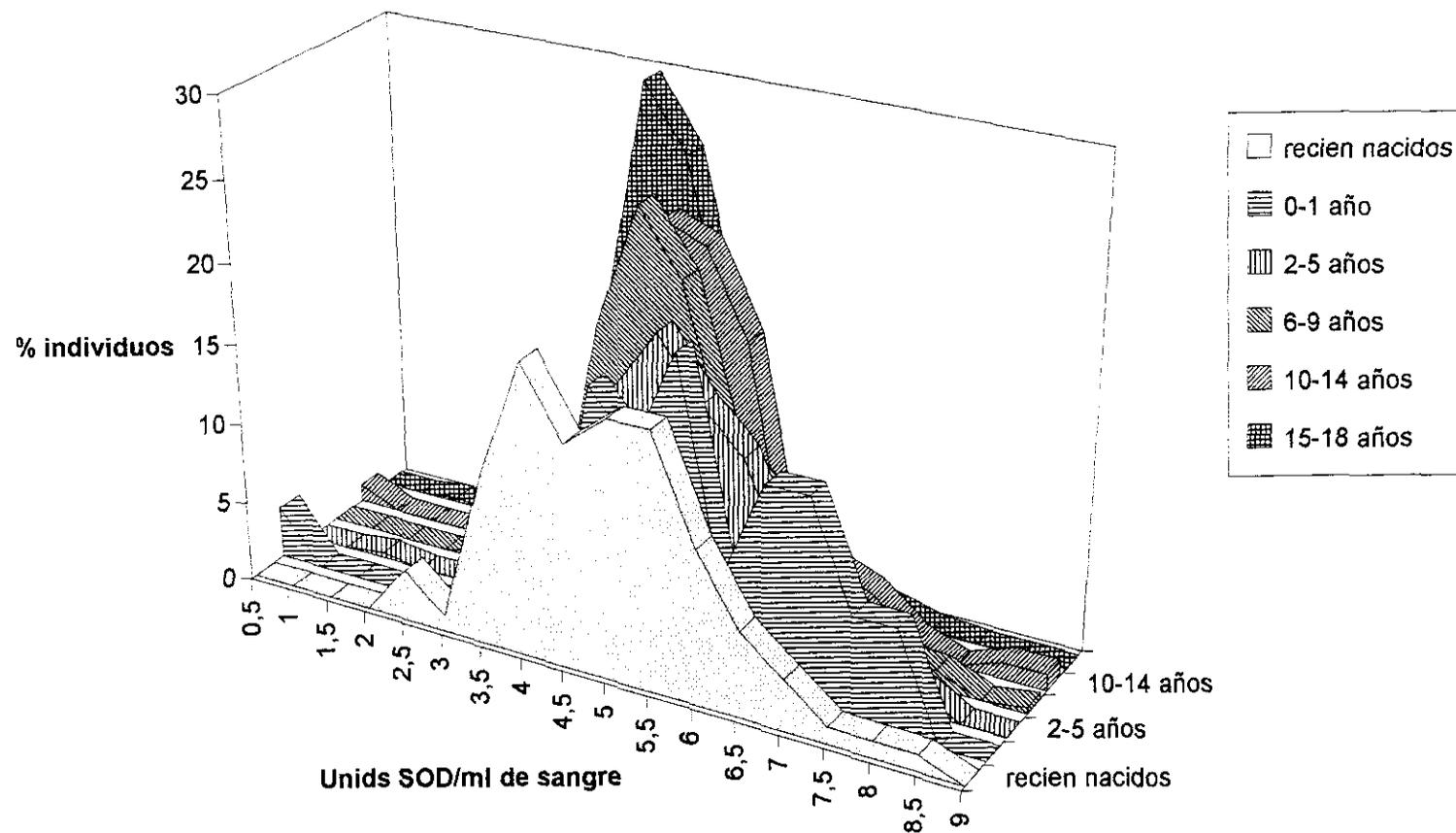
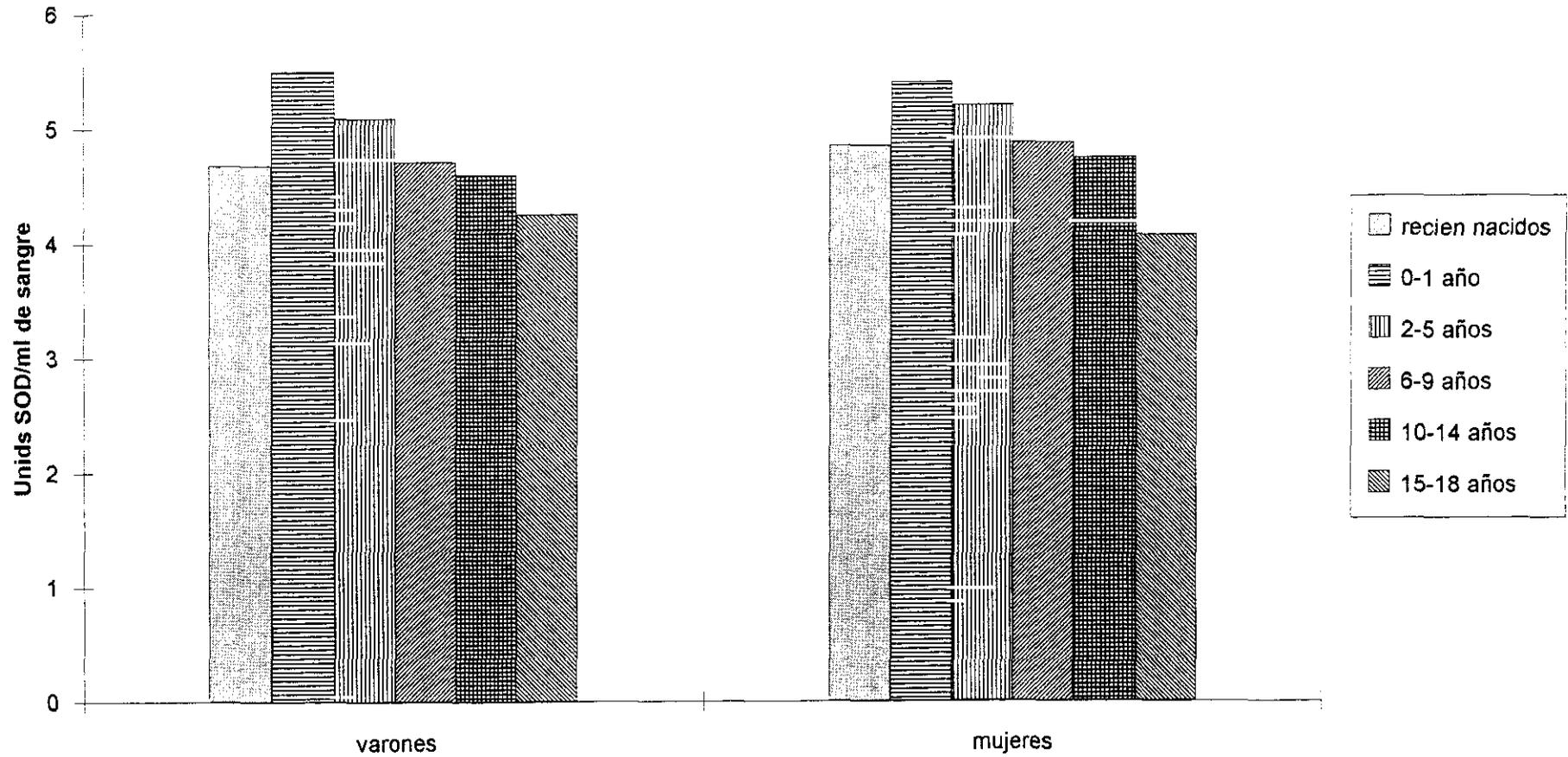


Gráfico 6: Valores de actividad de superóxido dismutasa en la población infantil y adolescente agrupada por sexo y edad



A. 3. Población mayor de 50 años

La actividad de SOD observada en esta población (entre 50 y 93 años) fue de $4,37 \pm 0,99$ unids/ml de sangre, como se muestra en la Tabla 13. En dicha tabla también se observa la actividad de SOD en esta población según su sexo.

Tabla 13: Valores de actividad de SOD en la población española mayor de 50 años distribuida según su sexo

	Individuos totales	Varones	Mujeres
Nº de individuos analizados	126	61	65
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,37	4,16*	4,57*
Desviación standard	0,99	0,89	1,05

*Se realizó una prueba "t" de student, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos.

Con objeto de observar la influencia de la actividad de SOD en el envejecimiento se procedió a estudiar dicha actividad según la edad del individuo, como puede verse en la Tabla 14.

Tabla 14: Valores de actividad de SOD en la población española mayor de 50 años clasificada según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	126	23	48	33	16	6
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,37	4,42	4,32	4,29	4,40	4,91
Desviación standard	0,99	0,87	0,93	1,03	1,17	1,40

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

La distribución de la actividad de SOD en la población de edades superiores a 50 años clasificada por su sexo puede observarse en el gráfico 7; y clasificada por su edad, en el gráfico 8.

En la Tabla 15 y en el gráfico 9 se presentan los datos de actividad de SOD en la población mayor de 50 años considerando los factores de edad y sexo.

Tabla 15: Valores de actividad de SOD en la población mayor de 50 años clasificada por su edad y su sexo.

		Nº de individuos analizados	Actividad media de SOD (Unids/ ml de sangre)	Desviación standard	p<....
50-57 años	Varones	11	4,47	0,85	n.s.
	Mujeres	12	4,38	0,92	
58-67 años	Varones	20	4,34	0,88	n.s.
	Mujeres	28	4,32	0,99	
68-77 años	Varones	21	3,86	0,90	0,001*
	Mujeres	12	5,03	0,81	
78-87 años	Varones	7	3,84	0,74	0,001*
	Mujeres	9	4,84	1,30	
88-93 años	Varones	2	5,04	0,87	n.s.
	Mujeres	4	4,85	1,74	

*= diferencias muy significativas; n.s.= diferencias no significativas.

Gráfico 7: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población española mayor de 50 años clasificada por sexos.

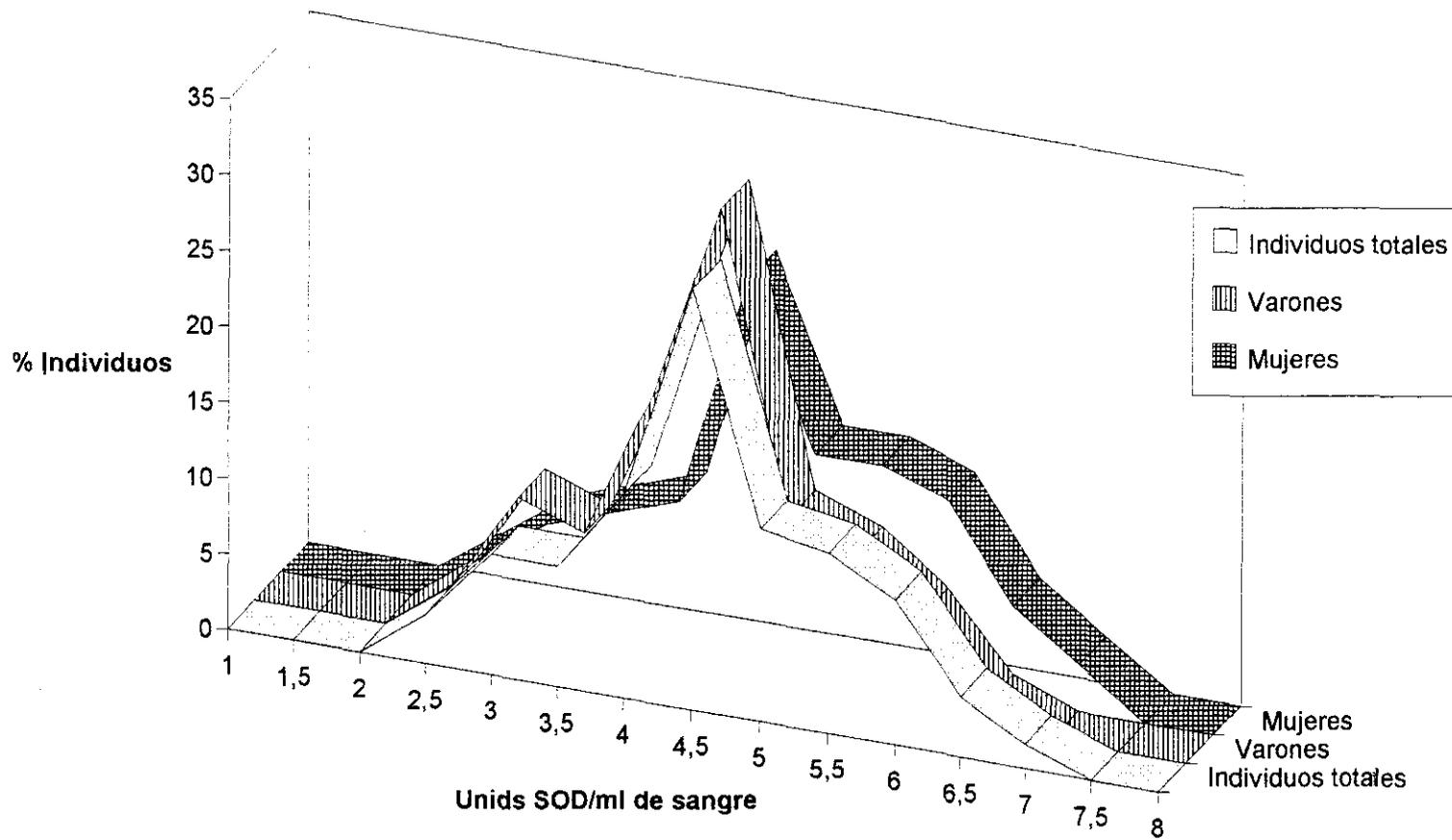


Gráfico 8: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población mayor de 50 años agrupada por edades

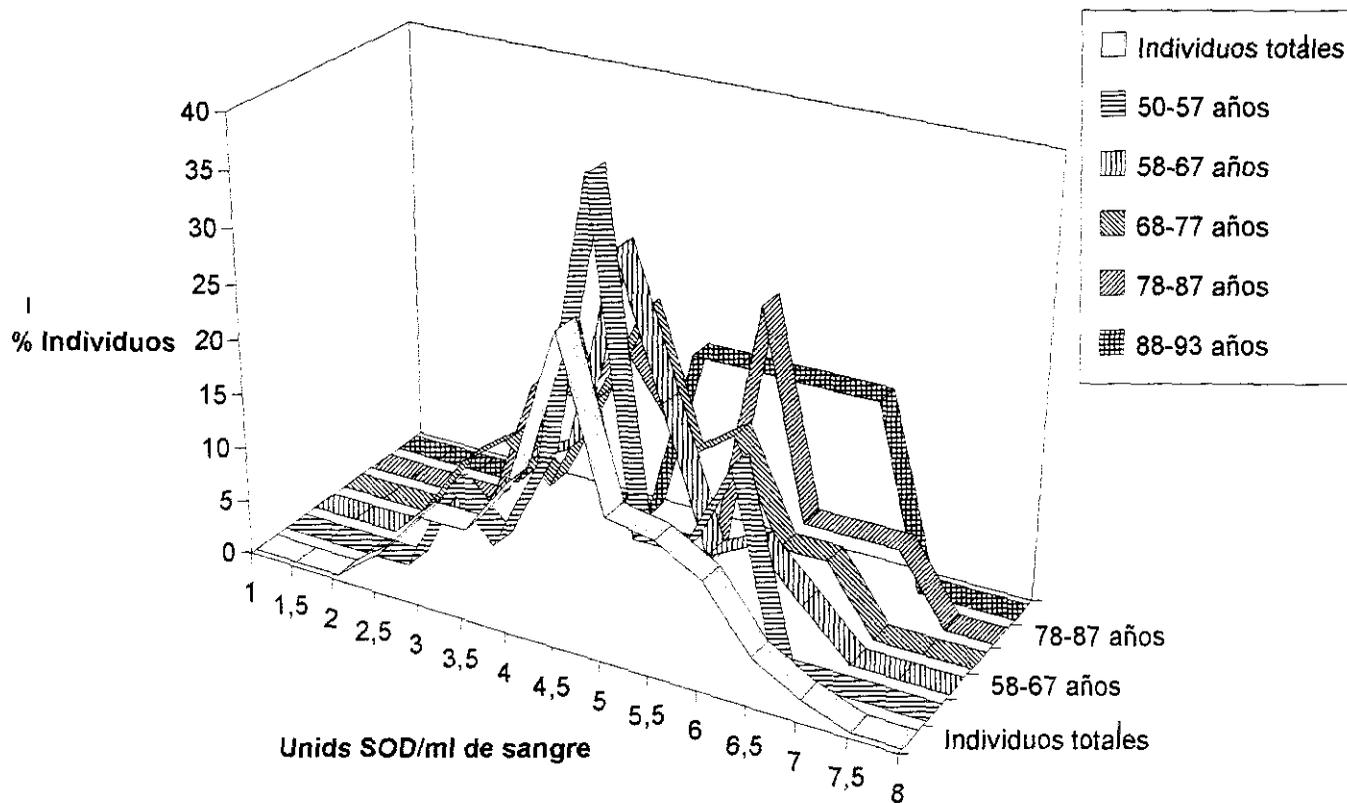
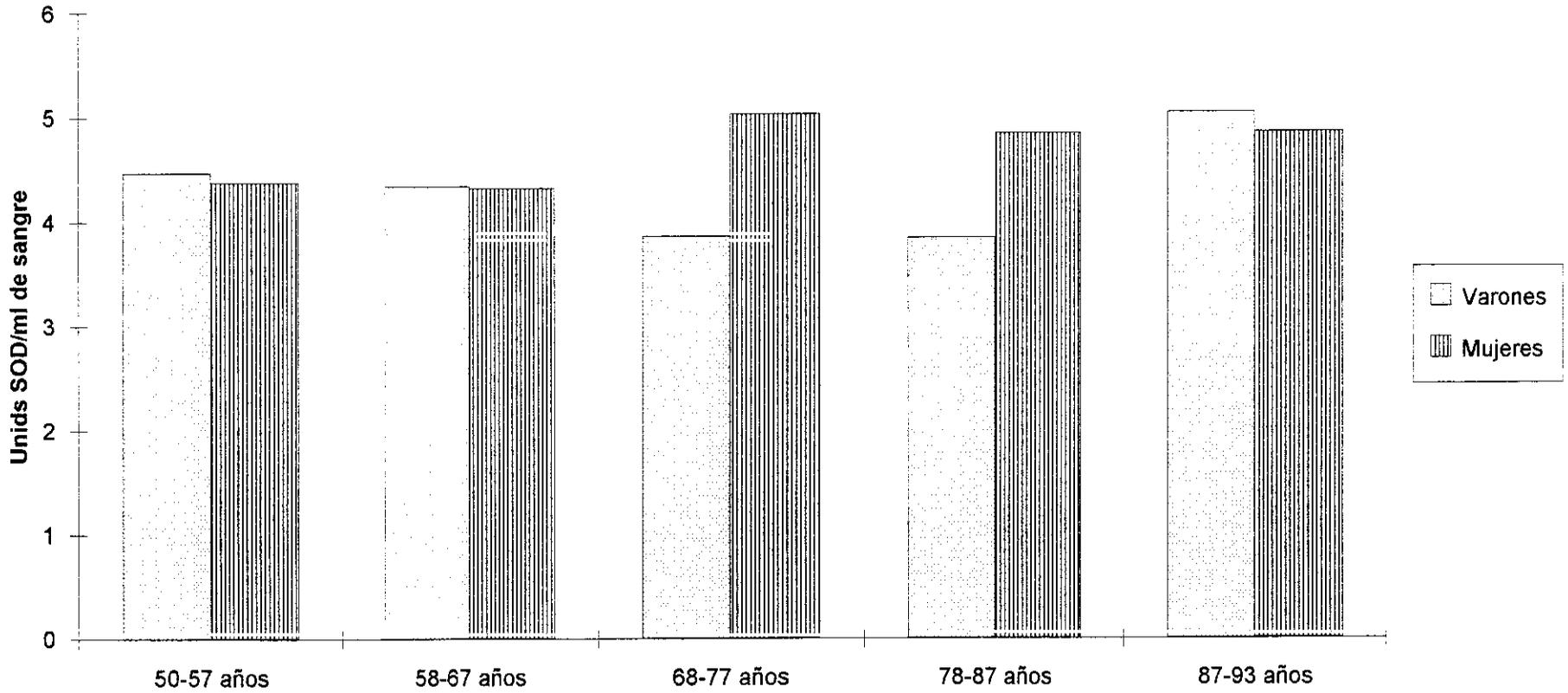


Gráfico 9: Valores de actividad de superóxido dismutasa en la población mayor de 50 años agrupada por sexo y edad



RESUMEN DEL COMPORTAMIENTO DE LA ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA POBLACIÓN SANA

El patrón de actividad de SOD obtenido en la población española sana desde el nacimiento hasta los 93 años figura en los gráficos 10 y 11.

Gráfico 10: Actividad de superóxido dismutasa en los varones españoles sanos desde el nacimiento hasta los 93 años

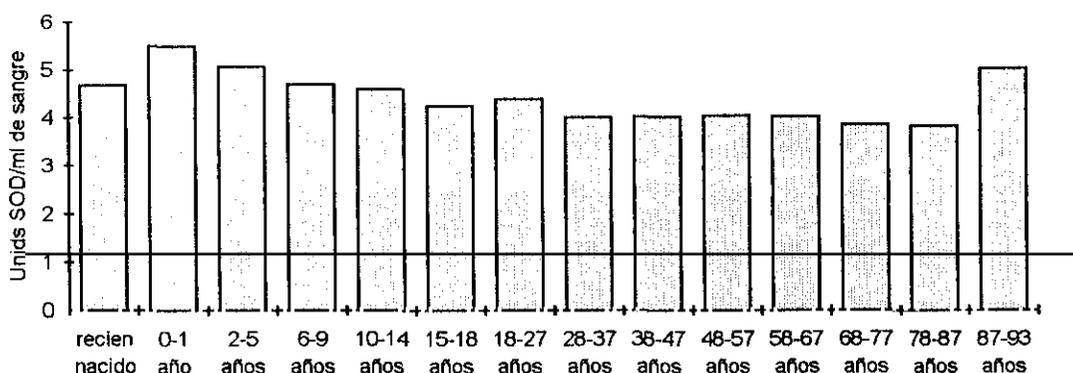
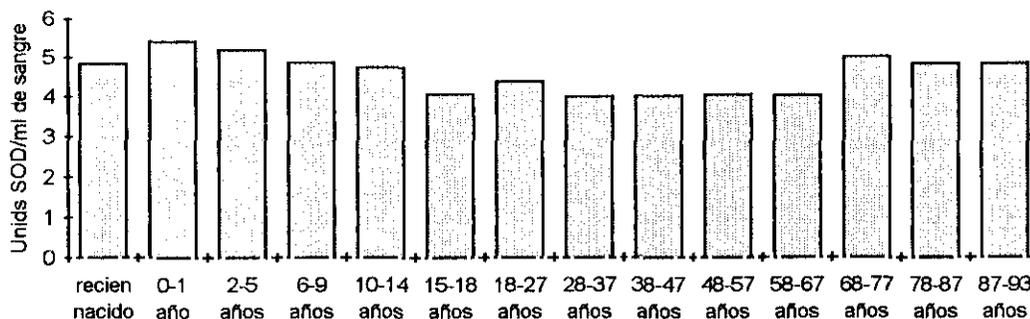


Gráfico 11: Actividad de superóxido dismutasa en las mujeres españolas sanas desde el nacimiento hasta los 93 años



B. POBLACIÓN CON PATOLOGÍAS PROPIAS DEL ENVEJECIMIENTO

Se han analizado un total de 374 individuos afectados de diversas patologías que se consideran propias del envejecimiento. Los resultados obtenidos se describen a continuación detalladamente.

B. 1. Accidente Cerebral Vascular Agudo

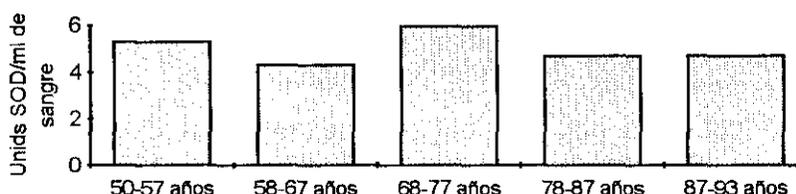
Se estudiaron 14 pacientes con accidente cerebral vascular agudo (13 mujeres y 1 varón), de edades comprendidas entre 50 y 93 años. Se obtuvo una actividad de SOD de $5,07 \pm 1,12$ Unids/ml de sangre. Esta actividad es significativamente mas alta ($p < 0,01$) que la obtenida en la población sana mayor de 50 años. No se encontraron diferencias significativas de actividad de SOD entre sexos ni entre los diferentes grupos de edad. En la Tabla 16 y en el gráfico 12 se muestra la actividad de SOD en estos pacientes según su edad.

Tabla 16: Valores de actividad de SOD en pacientes con accidente cerebral vascular agudo clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	14	1	1	4	6	2
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	5,07	5,3	4,3	5,95	4,70	4,71
Desviación standard	1,12	0	0	1,58	0,86	0,50

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 12: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con accidente cerebral vascular agudo



B. 2. Sistema cardiovascular

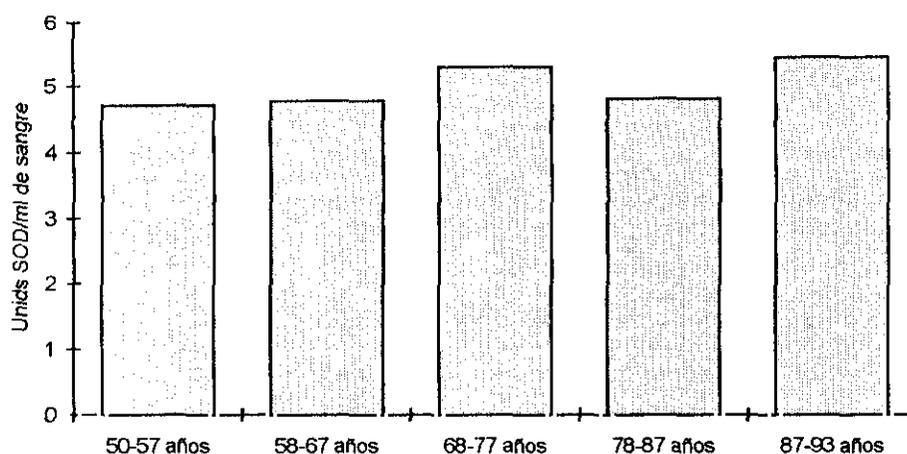
Se estudiaron 67 pacientes con diversas patologías del sistema cardiovascular (infartos, insuficiencias coronarias, hipertensión, etc.) (45 mujeres y 22 varones), de edades comprendidas entre los 50 y los 93 años. Se encontró una actividad de SOD de $4,96 \pm 1,00$ Unids/ml de sangre. Este valor es significativamente mas elevado ($p < 0,01$) que el observado en la población sana mayor de 50 años. No se observaron diferencias entre sexos ni entre los diferentes grupos de edad. En la Tabla 17 y en el gráfico 13 se observa la actividad de SOD en estos pacientes según su edad.

Tabla 17: Valores de actividad de SOD en pacientes con patologías del sistema cardiovascular clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	67	5	22	10	20	10
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,96	4,71	4,78	5,31	4,81	5,45
Desviación standard	1,00	0,94	0,72	1,27	1,06	1,11

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 13: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con patologías del sistema cardiovascular



B. 3. Cataratas

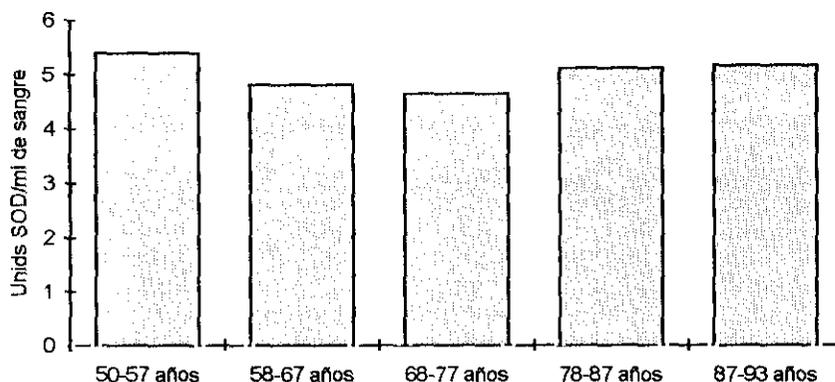
Se estudiaron 35 individuos con cataratas (19 mujeres y 16 varones) de edades comprendidas entre los 50 y los 93 años, encontrándose una actividad de SOD de $4,86 \pm 0,87$ Unids/ml de sangre. Este valor es significativamente diferente ($p < 0,01$) del observado en la población sana mayor de 50 años. No se encontraron diferencias entre sexos ni entre los diferentes grupos de edad. En la Tabla 18 y el gráfico 14 se indican los valores de actividad de SOD encontrada en estos individuos agrupados según su edad.

Tabla 18: Valores de actividad de SOD en pacientes con cataratas clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	35	4	14	11	5	1
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,86	5,4	4,81	4,65	5,13	5,18
Desviación standard	0,87	0,28	1,28	0,50	0,59	0

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 14: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cataratas



B. 4. Demencia

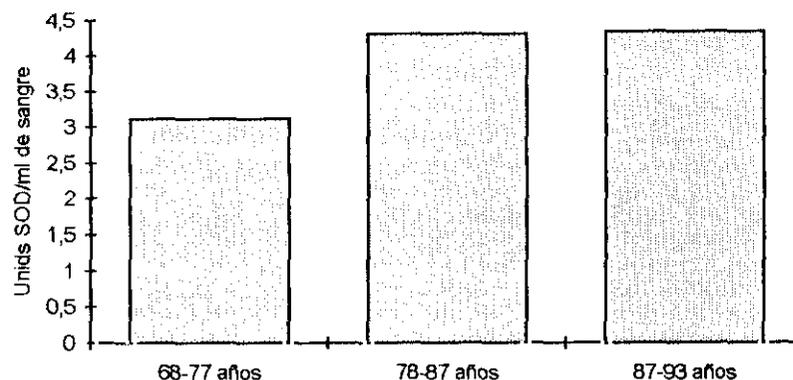
Se estudiaron 6 pacientes con demencia senil (3 mujeres y 3 varones), con edades comprendidas entre los 68 y los 93 años, encontrándose una actividad de SOD de $4,13 \pm 0,93$ Unids/ml de sangre. Esta actividad no era significativamente diferente a la observada en la población sana mayor de 68 años. No se observaron diferencias de actividad de SOD entre sexos ni por edades. En la tabla 19 y en la gráfica 15 se muestran los valores de actividad de SOD de estos pacientes.

Tabla 19: Valores de actividad de SOD en pacientes con demencia clasificados según su edad

	Individuos totales	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	6	1	3	2
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,13	3,11	4,32	4,35
Desviación standard	0,93	0	1,18	0,57

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 15: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con demencia



B. 5. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

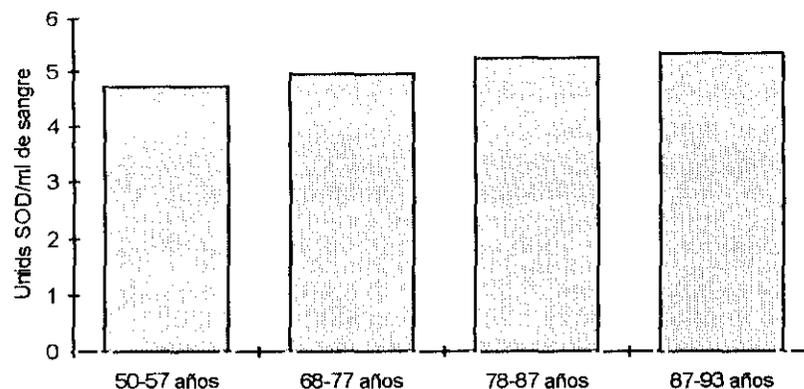
Se analizaron 21 individuos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (9 mujeres y 12 varones), de edades comprendidas entre los 50 y los 93 años. Se obtuvo una actividad de SOD de $5,13 \pm 1,16$ Unids/ml de sangre, actividad significativamente mayor ($p < 0,01$) a la observada en la población mayor de 50 años sana. No se observaron diferencias significativas entre sexos ni por edades. En la Tabla 20 y en el gráfico 16 se consigna la actividad de SOD en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Tabla 20: Valores de actividad de SOD en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	21	3	4	12	2
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	5,13	4,73	4,96	5,26	5,34
Desviación standard	1,16	0,45	0,86	1,41	1,33

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 16: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica



B. 6. Miomas

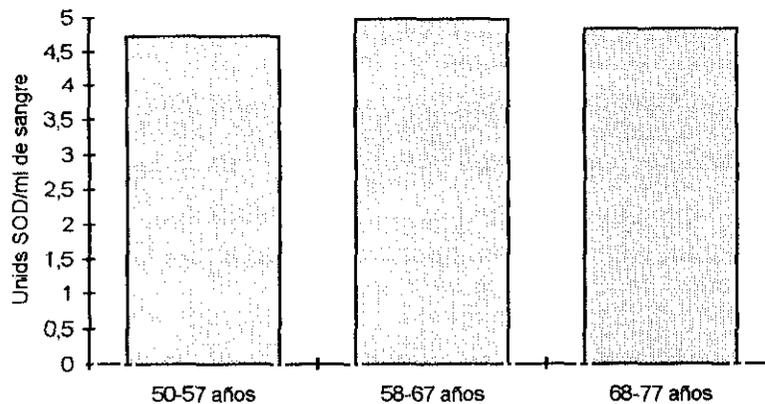
Se analizaron 36 mujeres de edades comprendidas entre los 50 y los 77 años que presentaban miomas, observándose una actividad de SOD de $4,84 \pm 0,97$ Unids/ml de sangre. Esta actividad es significativamente mayor ($p < 0,01$) a la observada en las mujeres sanas de 50 a 77 años. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de edad. En la tabla 21 y en el gráfico 17 se muestran estos valores de actividad de SOD.

Tabla 21: Valores de actividad de SOD en pacientes con miomas clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años
Nº individuos analizados	36	16	13	7
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,84	4,84	4,98	4,84
Desviación standard	0,97	1,00	0,81	1,26

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 17: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con miomas



B. 7. Osteoporosis

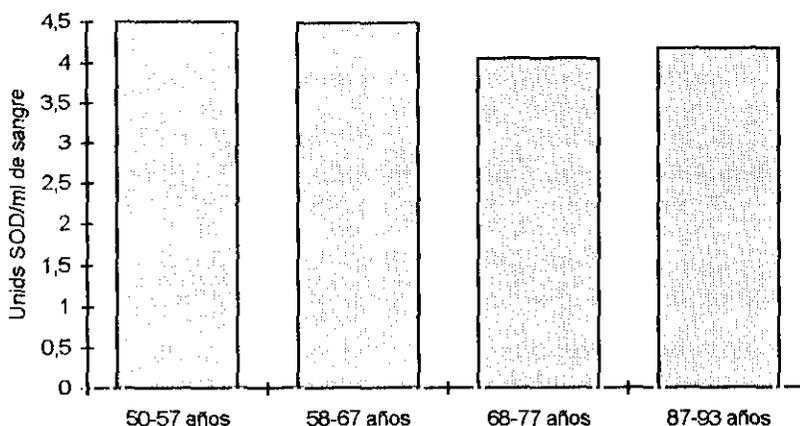
Se estudiaron 9 pacientes con osteoporosis (8 mujeres y 1 varón), de edades comprendidas entre los 50 y los 93 años, obteniéndose una actividad de SOD de $4,30 \pm 1,29$ Unids/ml de sangre, siendo esta actividad no significativamente diferente a la observada en la población sana mayor de 50 años. No se encontraron diferencias significativas entre sexos ni por edades. En la tabla 22 y el gráfico 18 se muestra la actividad de SOD en estos pacientes.

Tabla 22: Valores de actividad de SOD en pacientes con osteoporosis clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años	88-93 años
Nº individuos analizados	9	1	3	4	1
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,30	4,50	4,49	4,05	4,17
Desviación standard	1,29	0	1,93	1,28	0

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 18: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con osteoporosis



B. 8. Patología prostática

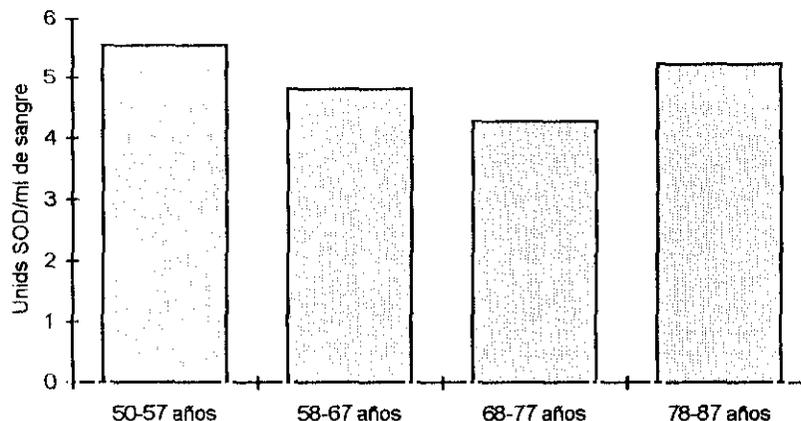
Se analizaron 50 varones de edades comprendidas entre los 50 y los 87 años que presentaban patología prostática, encontrándose una actividad de SOD de $4,68 \pm 1,27$ Unids/ml de sangre, actividad no significativamente diferente a la observada en la población sana mayor de 50 años. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de edades. En la tabla 23 y en el gráfico 19 puede observarse la actividad de SOD de esta población agrupada por edades.

Tabla 23: Valores de actividad de SOD en pacientes con patología prostática clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años	78-87 años
Nº individuos analizados	50	2	19	21	8
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,68	5,55	4,81	4,28	5,24
Desviación standard	1,27	0,5	1,05	1,45	1,17

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 19: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con patología prostática



B. 9. Sistema Osteoarticular

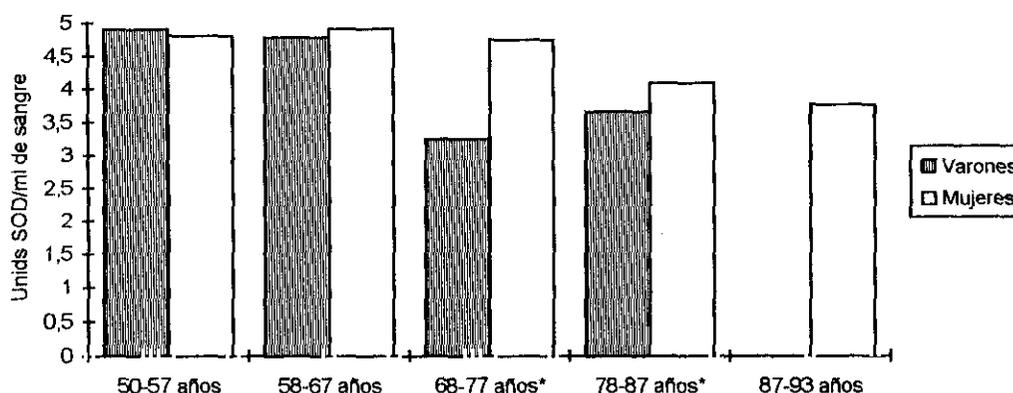
Se estudiaron 97 individuos que presentaban patologías del sistema osteoarticular (artritis, poliartralgias, etc.) (72 mujeres y 25 varones), de edades comprendidas entre los 50 y los 93 años. Se obtuvo una actividad de SOD de $4,67 \pm 1,05$ unids/ml de sangre, actividad no significativamente diferente de la actividad de SOD encontrada en la población sana mayor de 50 años. No se encontraron diferencias significativas entre sexos, aunque si por edades, disminuyendo la actividad de SOD con la edad. En la tabla 24 y en el gráfico 20 puede observarse la actividad de SOD en esta población agrupada por edades y sexo.

Tabla 24: Valores de actividad de SOD en pacientes con patología del sistema osteoarticular clasificados según su edad

	Individuos totales	50-57 años	58-67 años	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	97	22	45	22	6	2
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,67	4,81*	4,86*	4,41	3,95*	3,77*
Desviación standard	1,05	0,87	0,97	1,29	0,93	0,48

*Se realizó una prueba "t" de student, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos.

Gráfico 20: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con patología osteoarticular



*La diferencia que se observa en la actividad de SOD entre varones y mujeres de edades comprendidas entre 68 y 87 años no es significativa.

B. 10. Otras patologías

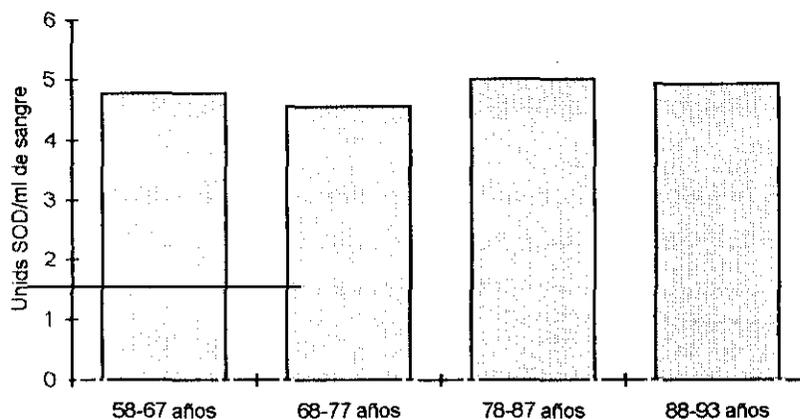
Se analizó la actividad de SOD en 52 pacientes (33 mujeres y 19 varones), con edades comprendidas entre los 58 y los 93 años, con diversas patologías (hepatopatías, astenias, nefropatías, etc.), obteniéndose una actividad de $4,77 \pm 1,13$ Unids de SOD/ml de sangre. Esta actividad no era significativamente diferente de la observada en la población sana mayor de 58 años. No se observaron diferencias significativas de actividad de SOD entre sexos ni por edades. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 25 y el gráfico 21.

Tabla 25: Valores de actividad de SOD en pacientes con diversas patologías clasificados según su edad

	Individuos totales	58-67 años	68-77 años	78-87 años	88-93 años
Nº individuos analizados	52	7	21	18	6
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,77	4,78	4,56	5,01	4,93
Desviación standard	1,13	0,5	0,89	0,99	1,40

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

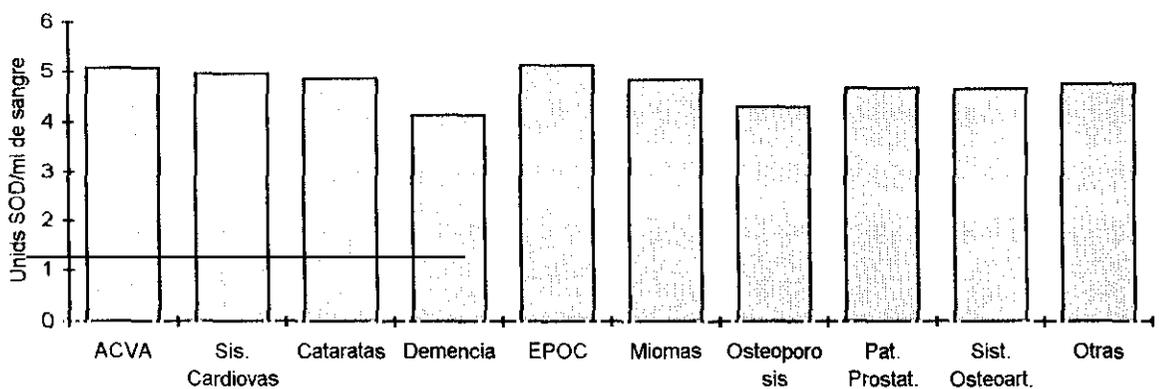
Gráfico 21: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con diversas patologías



RESUMEN DE LA ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA POBLACIÓN CON PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL ENVEJECIMIENTO

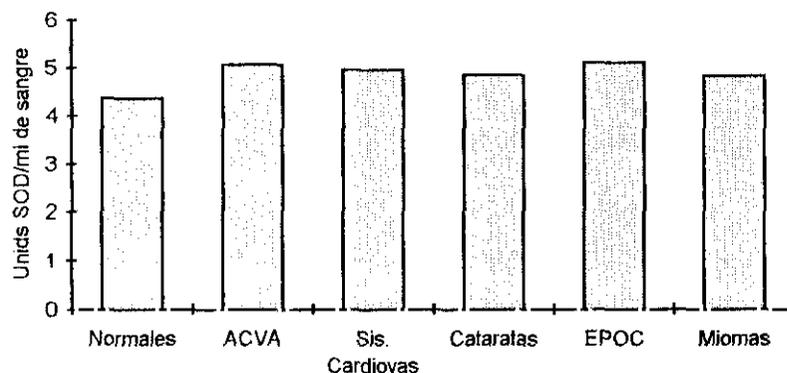
En el gráfico 22 se muestran los valores de actividad de superóxido dismutasa de todas las patologías asociadas al envejecimiento que se han considerado en esta Tesis Doctoral.

Gráfico 22: Valores de actividad de superóxido dismutasa en las patologías asociadas al envejecimiento



En el gráfico 23 pueden observarse los valores de actividad de SOD de aquellas patológicas asociadas al envejecimiento en las que se observan diferencias significativas con respecto a la actividad de SOD de la población española sana mayor de 50 años.

Gráfico 23: Valores de actividad de superóxido dismutasa en patologías asociadas al envejecimiento frente a valores normales



C. POBLACIÓN CON PROCESOS CANCEROSOS

Se han analizado 183 pacientes con diferentes tipos de procesos tumorales, que se detallan a continuación.

C. 1. Cáncer de cabeza y cuello

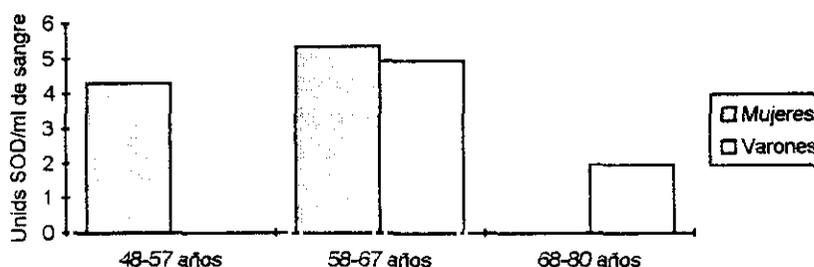
Se estudió la actividad de SOD en 8 individuos que padecían cáncer de cabeza y cuello (6 mujeres y 2 varones), de edades comprendidas entre los 48 y los 80 años obteniéndose una actividad de $4,5 \pm 1,24$ Unids SOD/ml de sangre, siendo esta actividad no significativamente diferente de la encontrada en la población sana de edades comprendidas entre los 48 y los 93 años. No se encontraron diferencias significativas entre sexos ni por edades. En el grupo de edades comprendidas entre los 68 y los 80 años la actividad de SOD es muy baja, pero debido al escaso número de pacientes de este grupo no se pueden establecer conclusiones estadísticas. En la tabla 26 y en el gráfico 24 puede observarse los valores de actividad de SOD encontrados en estos pacientes.

Tabla 26: Valores de actividad de SOD en pacientes con cáncer de cabeza y cuello clasificados según su edad

	Individuos totales	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº individuos analizados	8	3	4	1
Actividad media de SOD (unids/ml de sangre)	4,5	4,31	5,27	1,97
Desviación standard	1,24	0,71	0,53	0

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 24: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cancer de cabeza y cuello



C. 2. Cáncer digestivo

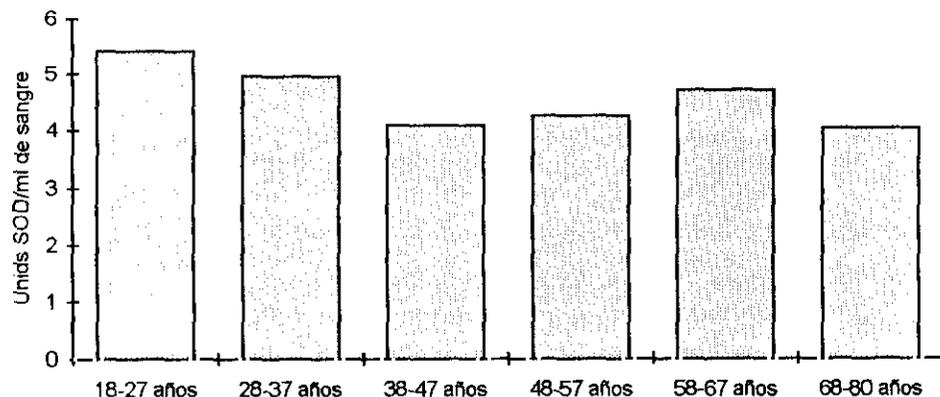
Se determinó la actividad de SOD en 20 pacientes que presentaban cáncer del aparato digestivo (4 mujeres y 16 varones), de edades comprendidas entre 18 y 80 años, encontrándose una actividad de $4,04 \pm 1,20$ Unids SOD/ml de sangre. Esta actividad no era significativamente diferente de la observada en la población sana, y no se encontraron diferencias de actividad entre sexos ni por edades. En el grupo de edades comprendidas entre los 58 y los 80 años la actividad de SOD es muy baja, pero debido al escaso número de pacientes, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados pueden observarse en la tabla 27 y el gráfico 25.

Tabla 27: Valores de actividad de SOD en pacientes con cáncer digestivo clasificados según su edad

	Individuos totales	18-27 años	28-37 años	38-47 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	20	1	1	2	7	3	6
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	4,04	5,41	4,96	4,09	4,27	4,72	4,05
Desviación standard	1,2	0	0	0,47	0,61	0,30	1,81

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 25: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cancer digestivo



C. 3. Linfomas

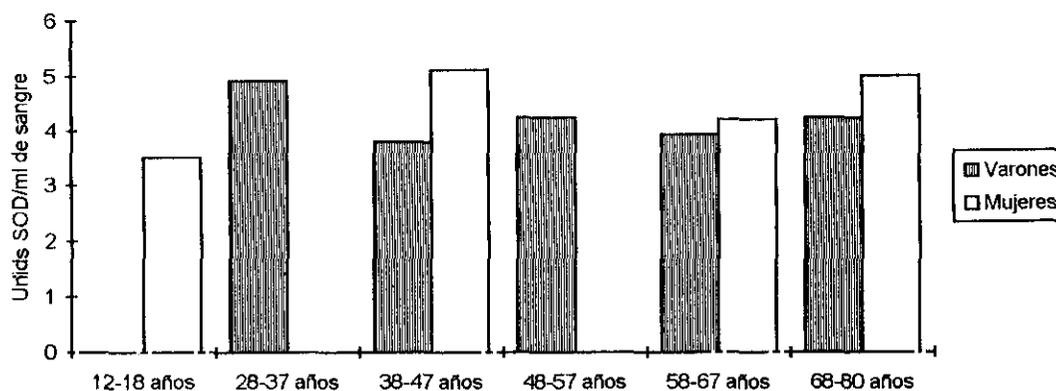
Se estudió la actividad de SOD en 28 pacientes con linfomas (13 mujeres y 15 varones), de edades comprendidas entre los 12 y los 80 años. Se encontró una actividad de SOD de $4,21 \pm 0,95$ Unids SOD/ml de sangre, no siendo esta actividad significativamente diferente de la observada en la población sana. No se observaron diferencias significativas entre sexos ni por edades. En la tabla 28 y en el gráfico 26 puede observarse la actividad de SOD en estos pacientes agrupados por edades.

Tabla 28: Valores de actividad de SOD en pacientes con linfomas clasificados según su edad

	Individuos totales	12-18 años	28-37 años	38-47 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	28	3	1	6	6	7	4
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	4,21	3,96	4,93	4,24	4,25	4,10	4,84
Desviación standard	0,95	0,47	0	1,00	1,01	0,52	1,44

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 26: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con linfomas



C. 4. Cáncer de mama

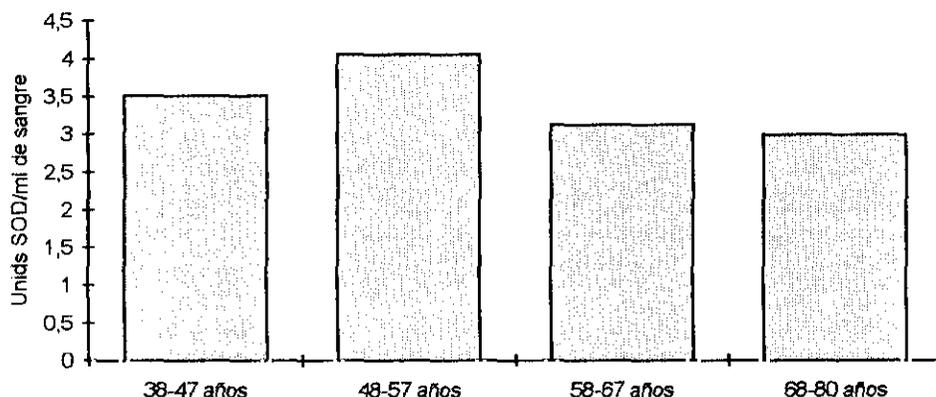
Se estudiaron 15 mujeres de edades comprendidas entre los 38 y 80 años que padecían cáncer de mama, observándose una actividad de SOD de $3,65 \pm 1,18$ Unids/ml de sangre. Esta actividad es significativamente menor ($p < 0,01$) de la observada en la población sana. No se encontraron diferencias significativas de actividad entre los diferentes grupos de edades. En la tabla 29 y el gráfico 27 pueden observarse los valores de actividad de SOD en las pacientes con cáncer de mama.

Tabla 29: Valores de actividad de SOD en pacientes con cáncer de mama clasificados según su edad

	Individuos totales	38-47 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	15	6	6	2	1
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	3,65	3,52	4,07	3,13	3,00
Desviación standard	1,24	1,19	1,22	1,62	0

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 27: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cancer de mama



C. 5. Mielomas

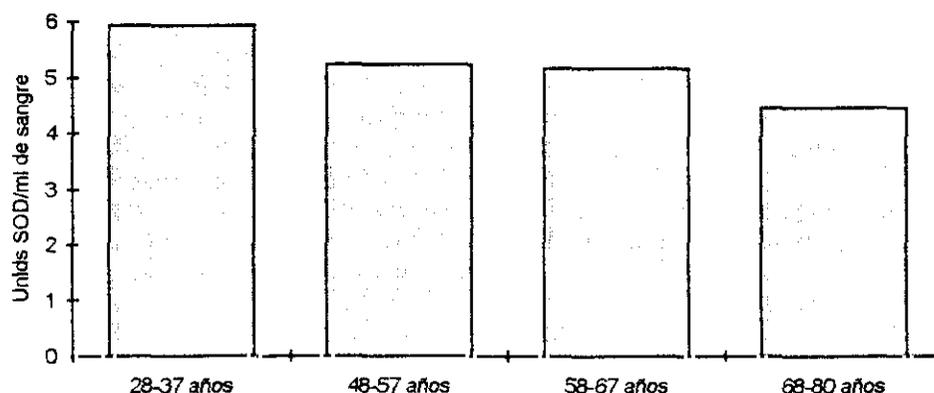
Se estudiaron 13 individuos que presentaban mielomas (5 mujeres y 8 varones) de edades comprendidas entre los 28 y 80 años, observándose una actividad de SOD de $5,09 \pm 1,15$ Unids/ml de sangre. Esta actividad está significativamente aumentada ($p < 0,01$) frente a la observada en la población sana. No se encontraron diferencias significativas de actividad por sexo ni entre los diferentes grupos de edades. En la tabla 30 y el gráfico 28 pueden observarse los valores de actividad de SOD en las pacientes con mieloma.

Tabla 30: Valores de actividad de SOD en pacientes con mielomas clasificados según su edad

	Individuos totales	28-37 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	13	1	2	7	3
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	5,09	5,94	5,25	5,17	4,46
Desviación standard	1,15	0	1,78	1,22	0,98

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 28: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con mieloma



C. 6. Cáncer de ovario y útero

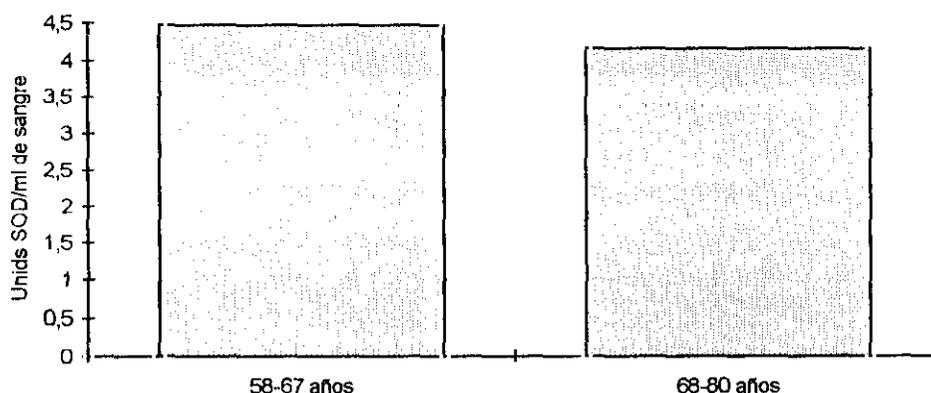
Se determinó la actividad de SOD en 7 mujeres con cáncer de ovario y útero, de edades entre los 58 y los 80 años, encontrándose una actividad de $4,35 \pm 1,43$ Unids SOD/ml de sangre, Esta actividad no es significativamente diferente de la encontrada en la población sana. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de edades. En la tabla 31 y en el gráfico 29 se consignan los resultados obtenidos.

Tabla 31: Valores de actividad de SOD en pacientes con cáncer de ovario y útero clasificados según su edad

	Individuos totales	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	7	4	3
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	4,35	4,48	4,17
Desviación standard	1,43	1,45	1,70

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 29: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cancer de ovario y útero



C. 7. Cáncer de pulmón

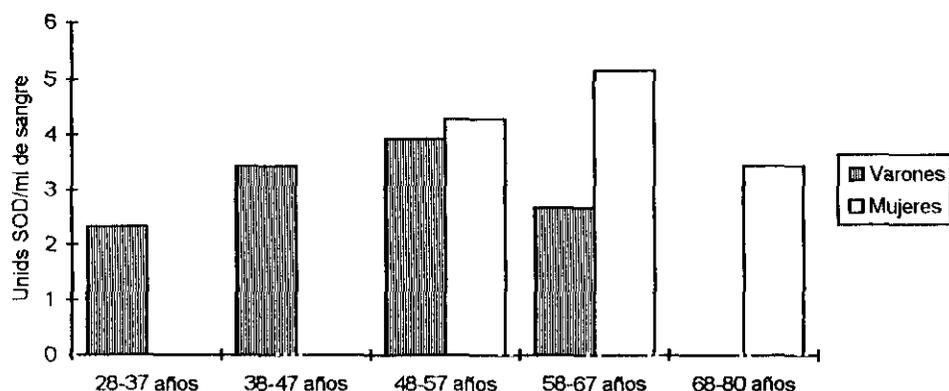
Se estudió la actividad de SOD en 34 pacientes con cáncer de pulmón (9 mujeres y 25 varones), de edades comprendidas entre los 28 y los 80 años. Se encontró una actividad de SOD de $3,67 \pm 1,19$ Unids SOD/ml de sangre, siendo esta actividad significativamente diferente ($p < 0,05$) entre mujeres y varones ($4,39 \pm 1,32$ Unids SOD/ml de sangre vs. $3,41 \pm 1,05$ Unids SOD/ml de sangre), como puede verse en el gráfico 30. No se encontraron diferencias significativas por grupos de edades. En la tabla 32 puede observarse la actividad de SOD en estos pacientes agrupados por edades.

Tabla 32: Valores de actividad de SOD en pacientes con cáncer de pulmón clasificados según su edad

	Individuos totales	28-37 años	38-47 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	34	2	7	15	8	2
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	3,67	2,32	3,43	4,03	3,6	3,43
Desviación standard	1,19	0,60	1,16	0,88	1,74	0,02

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 30: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cancer de pulmón



C. 8. Cáncer de sistema nervioso central

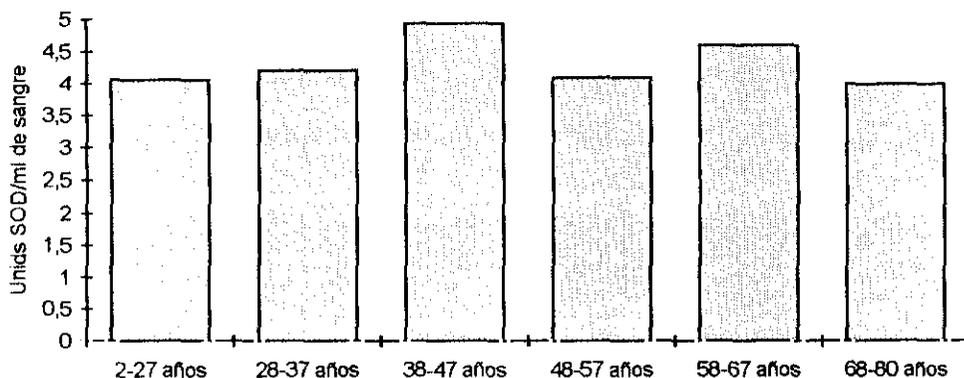
Se determinó la actividad de SOD en 30 pacientes que presentaban tumores de tejido glial del sistema nervioso central (19 mujeres y 11 varones), de edades entre 2 y 80 años) encontrándose una actividad de $4,21 \pm 1,25$ Unids SOD/ml de sangre. Esta actividad no era significativamente mayor de la observada en la población sana, y no se encontraron diferencias entre sexos ni por edades. Estos resultados pueden observarse en la tabla 33 y el gráfico 31.

Tabla 33: Valores de actividad de SOD en pacientes con cáncer de sistema nervioso central clasificados según su edad

	Individuos totales	2-27 años	28-37 años	38-47 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	30	5	13	1	6	3	2
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	4,21	4,06	4,21	4,94	4,10	4,61	4,00
Desviación standard	1,25	0,57	1,48	0	1,19	2,2	0,26

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 31: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cancer de sistema nervioso central



C. 9. Cáncer urológico

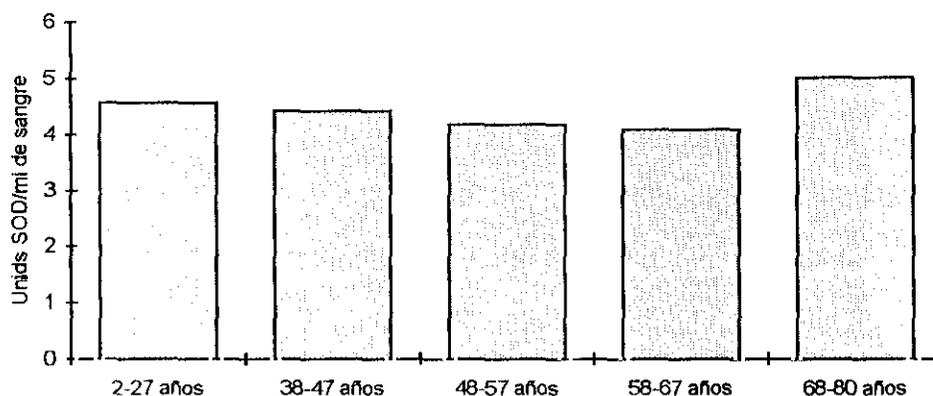
Se analizó la actividad de SOD en 12 varones que presentaban cáncer del sistema urológico, de edades comprendidas entre los 2 y los 80 años, encontrándose una actividad de $4,55 \pm 0,98$ Unids SOD/ml de sangre, actividad semejante a la observada en los varones sanos. No se encontraron tampoco diferencias de actividad entre los diferentes grupos de edades. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 34 y el gráfico 32.

Tabla 34: Valores de actividad de SOD en pacientes con cáncer urológico clasificados según su edad

	Individuos totales	2-27 años	38-47 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	12	2	2	1	3	4
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	4,55	4,57	4,43	4,19	4,1	5,02
Desviación standard	0,98	1,31	0,86	0	0,75	1,34

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Gráfico 32: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con cancer urológico



C. 10. Otros tumores

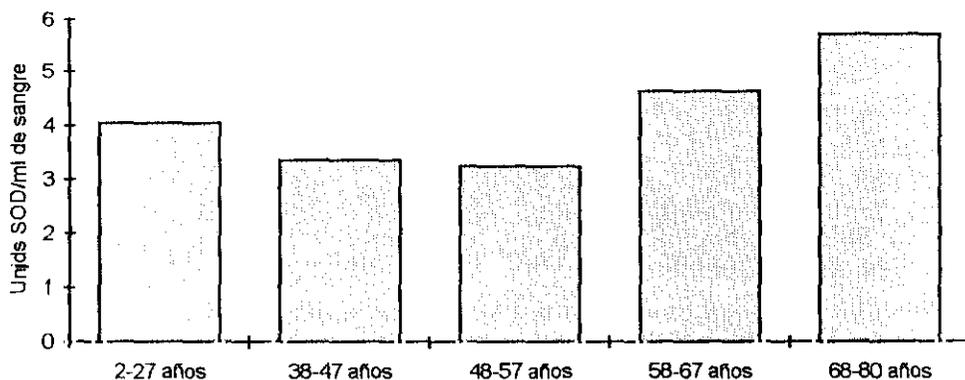
Se determinó la actividad de SOD en 16 pacientes que presentaban otros tipos de tumores, (melanomas, hepatomas, leucemias, etc.) (10 mujeres y 6 varones), de edades comprendidas entre 2 y 80 años, encontrándose una actividad de $4,04 \pm 1,04$ Unids SOD/ml de sangre, Esta actividad no era significativamente diferente de la observada en la población sana, y no se encontraron diferencias entre sexos, ni por edades. Estos resultados pueden observarse en la tabla 35 y el gráfico 33.

Tabla 35: Valores de actividad de SOD en pacientes con otros tumores clasificados según su edad

	Individuos totales	2-27 años	38-47 años	48-57 años	58-67 años	68-80 años
Nº Individuos analizados	16	5	3	3	4	1
Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	4,04	4,05	3,37	3,25	4,69	5,74
Desviación standard	1,04	0,81	0,04	1,08	1,1	0

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

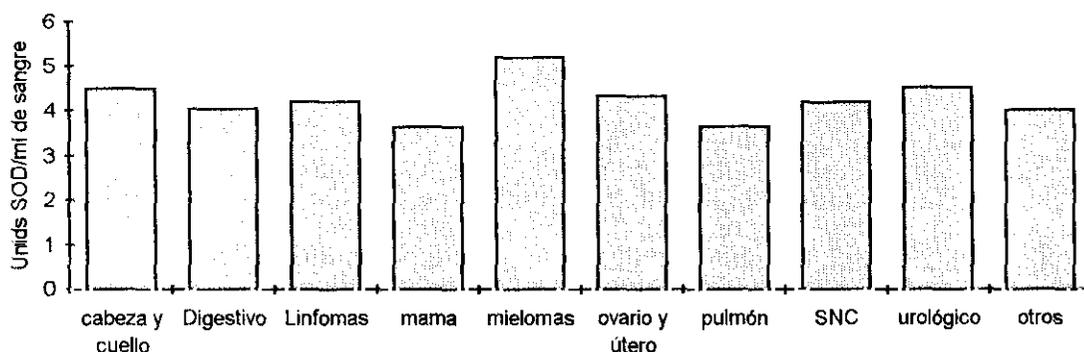
Gráfico 33: Actividad de superóxido dismutasa en pacientes con otros tumores



RESUMEN DE LA ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA POBLACIÓN CON PROCESOS CANCEROSOS

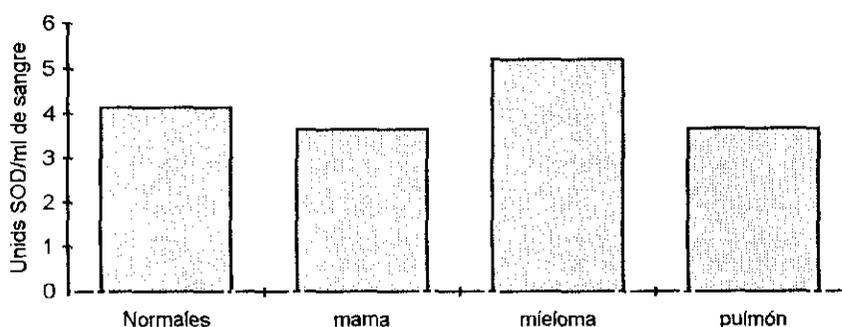
En el gráfico 34 se presentan los valores de actividad de SOD obtenidos en la población con diferentes procesos tumorales.

Gráfico 34: Valores de actividad de superóxido dismutasa en la población con procesos tumorales



En el gráfico 35 se muestran los valores de actividad de SOD en los procesos cancerosos en los que se observan diferencias significativas con respecto a la actividad de SOD de la población sana.

Gráfico 35: Valores de actividad de superóxido dismutasa en pacientes con diferentes procesos cancerosos frente a valores normales



D. POBLACIÓN CON DIABETES

Se estudió un total de 369 individuos de ambos sexos (193 mujeres y 176 varones), de edades comprendidas entre los 4 y los 85 años, que presentaban Diabetes Mellitus tanto tipo I o insulín dependiente (DMID), como tipo II o no insulín-dependiente (DMNID). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 36.

Tabla 36: Valores de actividad de SOD en la población con diabetes, clasificada según el tipo de la diabetes.

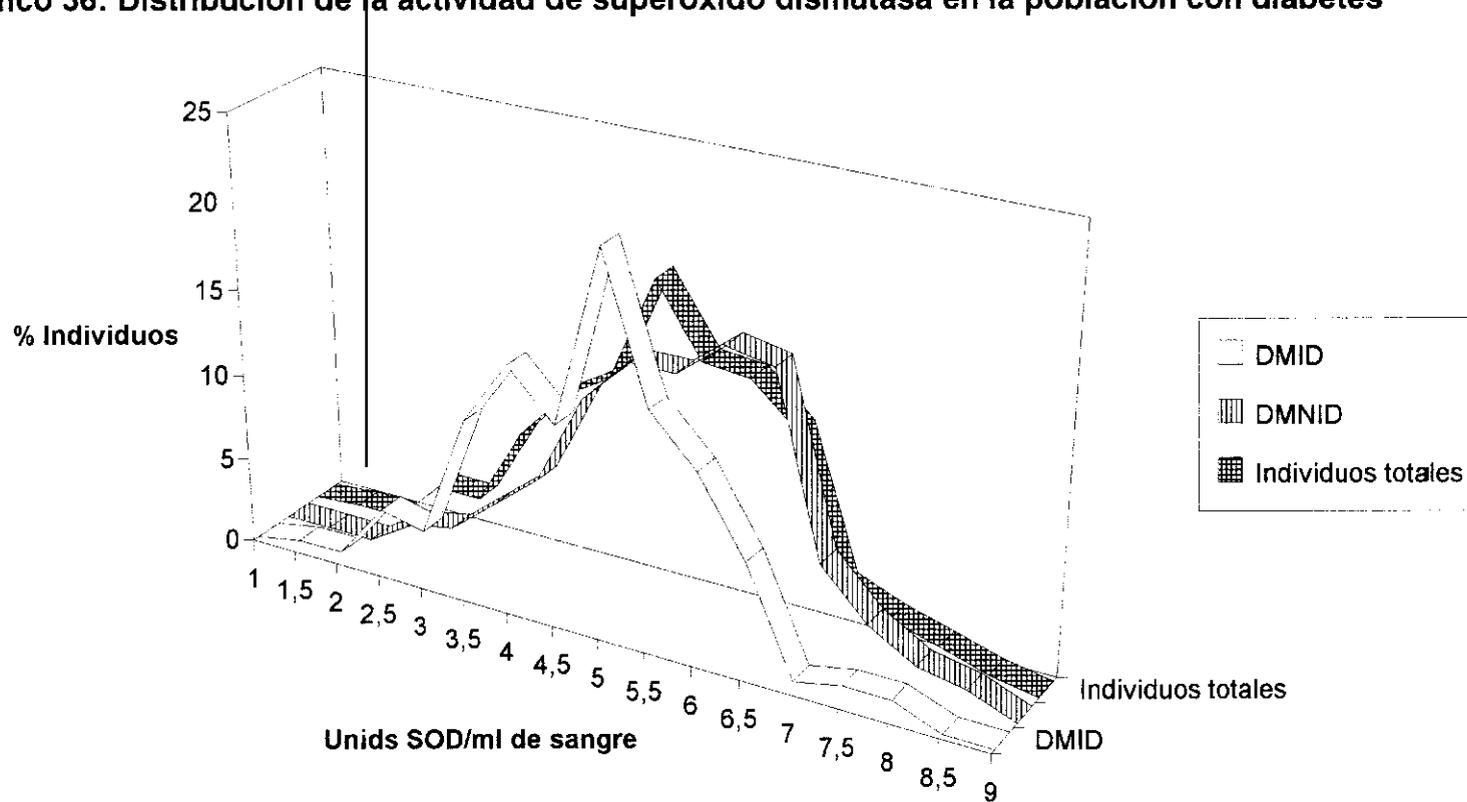
	Individuos totales	DMID	DMNID
nº de individuos analizados	369	183	186
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	4,89	4,53**	5,23**
Desviación standard	1,2	1,13	1,17

**Se realizó una prueba "t" de student, encontrándose diferencias muy significativas ($p < 0,001$) entre los dos grupos.

En el gráfico 36 puede verse la distribución de la actividad de SOD en la población con diabetes clasificada según el tipo de diabetes.

Se procedió a considerar a esta población como dos tipos de poblaciones independientes: la población de individuos con Diabetes Mellitus insulín-dependiente; y la población de individuos con Diabetes Mellitus no insulín-dependiente.

Gráfico 36: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población con diabetes



D. 1. Población con Diabetes Mellitus insulín-dependiente

Se analizaron un total de 183 individuos, 93 mujeres y 90 varones, de edades comprendidas entre los 4 y los 69 años, que presentaban Diabetes Mellitus insulín-dependiente, encontrándose una actividad de SOD de $4,53 \pm 1,13$ Unids/ml de sangre, que no es significativamente diferente de la observada en la población española sana con la misma edad. No se observaron diferencias significativas entre sexos, ni entre los diferentes grupos de edades. En la tabla 37 pueden observarse estos niveles de actividad en esta población clasificada por grupos de edad.

Tabla 37: Valores de actividad de SOD en la población con Diabetes Mellitus insulín-dependiente.

	Individuos totales	4-9 años	10-19 años	20-29 años	30-39 años	40-49 años	50-59 años	60-69 años
Nº de individuos analizados	183	13	43	38	28	13	38	12
Actividad Media de SOD (unids SOD/ml de sangre)	4,53	4,67	4,49	4,29	5,02	4,47	4,46	4,48
Desviación standard	1,13	1,51	1,19	1,02	1,19	1,11	0,99	1,01

Se realizó una prueba "t" de student, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

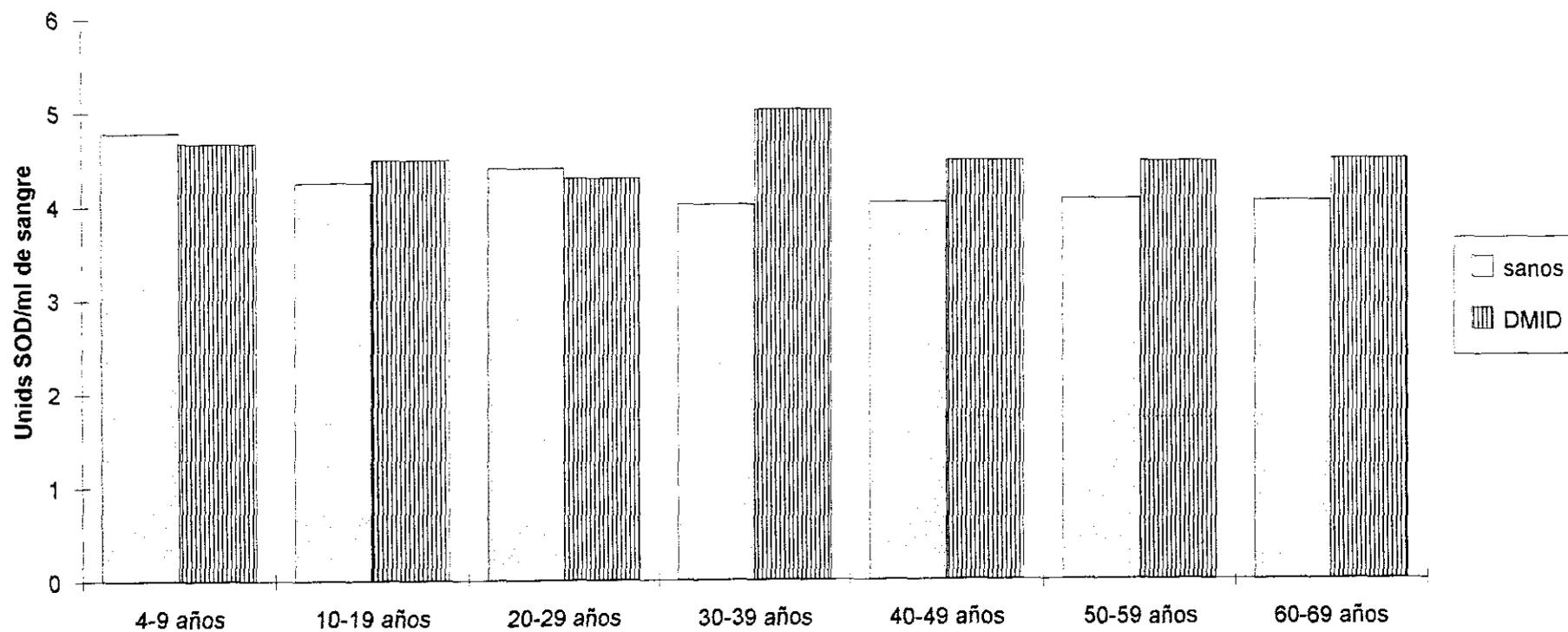
Aunque la actividad media de SOD en esta población no es significativamente diferente a la de la población sana, si se observan diferencias significativas entre estas dos poblaciones (sana y con Diabetes Mellitus insulín-dependiente) según los grupos de edades, como puede verse en la tabla 38 y en el gráfico 37.

Tabla 38: Tabla comparativa entre los valores de actividad de SOD en la población sana y la población con Diabetes Mellitus insulín-dependiente

		Nº de Individuos analizados	Actividad media de SOD (Unids SOD/ml de sangre)	Desviación standard	p<.....
6-9 años	sanos	206	4,78	1,01	n.s.
4-9 años	DMID	13	4,67	1,54	
10-18 años	sanos	465	4,25	1,25	n.s.
10-19 años	DMID	43	4,49	1,19	
18-27 años	sanos	836	4,4	0,91	n.s.
20-29 años	DMID	38	4,29	1,02	
28-37 años	sanos	537	4,01	1,02	0,01*
30-39 años	DMID	28	5,02	1,19	
38-47 años	sanos	541	4,03	0,94	0,01*
40-49 años	DMID	13	4,47	1,11	
48-57 años	sanos	399	4,06	0,91	0,01*
50-59 años	DMID	38	4,46	0,99	
58-65 años	sanos	94	4,04	0,83	0,01*
60-69 años	DMID	12	4,48	1,01	

*= diferencias significativas; n.s.= diferencias no significativas

Gráfico 37: valores de actividad de superóxido dismutasa en poblaciones sanas y con DMID clasificadas por edades



D. 2. Población con Diabetes Mellitus no insulín-dependiente

Se determinó la actividad de SOD en un total de 186 individuos que presentaban Diabetes Mellitus no insulín-dependiente (100 mujeres y 86 varones), de edades comprendidas entre los 50 y los 85 años, observándose una actividad de $5,26 \pm 1,17$ Unids SOD/ml de sangre. Esta actividad es significativamente más elevada ($p < 0,001$) que la observada en la población sana de la misma edad. No se encontraron diferencias significativas entre sexos, aunque sí diferencias significativas entre edades, como se muestra en la tabla 39.

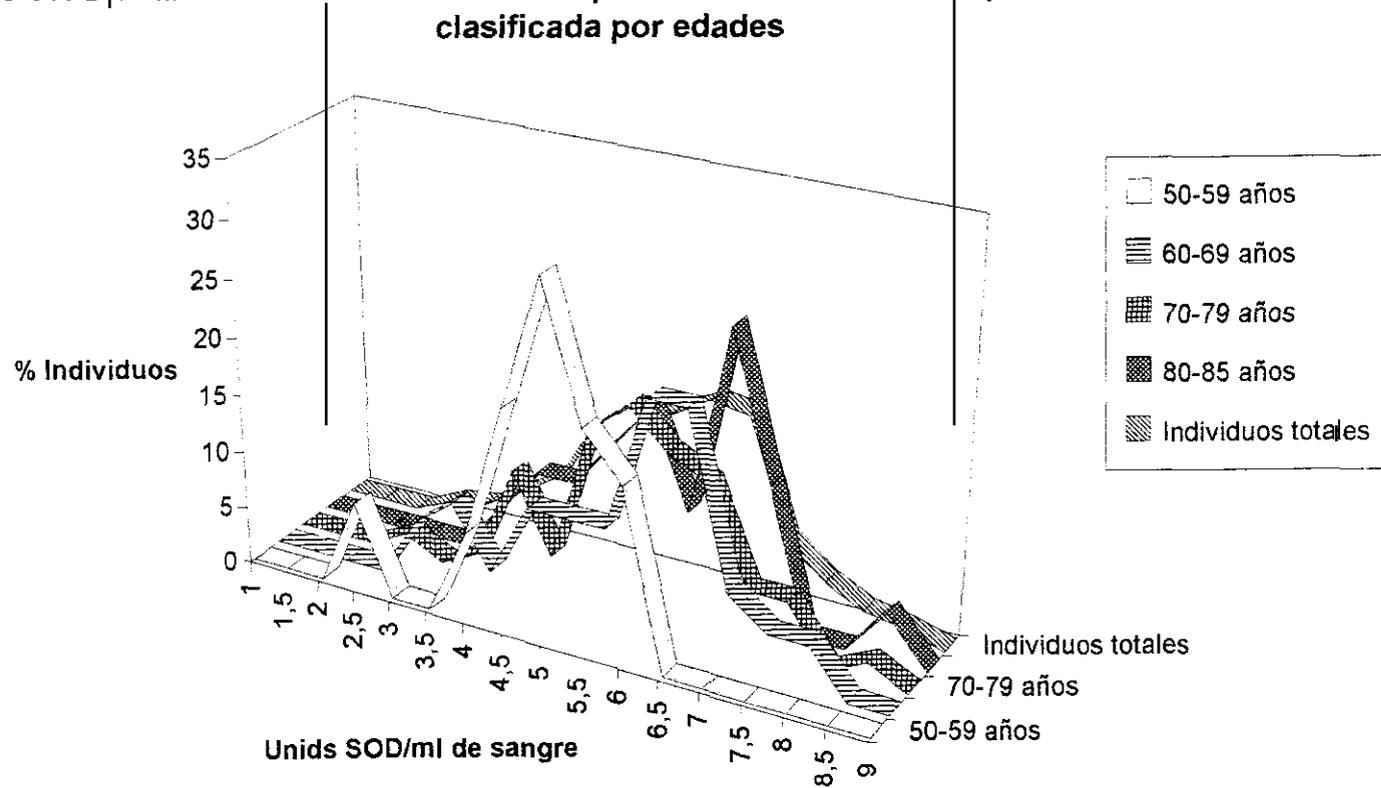
Tabla 39: Valores de actividad de SOD en la población con Diabetes Mellitus no insulín-dependiente agrupada por edades.

	Individuos totales	50-59 años	60-69 años	70-79 años	80-85 años
Nº de individuos analizados	186	26	76	60	24
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	5,26	4,61**	5,38	5,27	5,5
Desviación standard	1,17	0,87	1,27	1,08	1,18

**= diferencia muy significativa ($p < 0,001$)

La distribución de la actividad de SOD en la población con Diabetes Mellitus no insulín dependiente clasificada por edades puede verse en el gráfico 38.

Gráfico 38: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población con DMNID clasificada por edades



E. POBLACIÓN CON SÍNDROME DE DOWN

Se analizaron un total de 260 individuos de ambos sexos (123 mujeres y 137 varones), de edades comprendidas entre los 2 y los 45 años y que habían sido diagnosticados de Síndrome de Down. Un 42% (108 individuos) había sido cariotipado, presentando un 53% (57 individuos), una trisomía 21 completa; y un 47 % (51 individuos) presentaban: trisomías 21 parciales, traslocaciones y mosaicismos que afectaban al cromosoma 21. El 58 % restante (152 individuos) de la población analizada con síndrome de Down no había sido cariotipada, estando solo diagnosticada de síndrome de Down. En la población con trisomía 21 completa se obtuvo una actividad de SOD de $6,38 \pm 0,76$ Unids/ml de sangre. En la población que incluía trisomías parciales, traslocaciones y mosaicismos se observó una actividad de SOD de $5,01 \pm 1,20$ Unids/ml de sangre. En la población sin cariotipar se obtuvo una actividad de SOD de $5,75 \pm 1,04$ Unids/ml de sangre. No se encontraron diferencias significativas entre sexos ni entre edades en ninguno de los grupos. Los resultados obtenidos pueden observarse en las tablas 40, 41 y 42.

Tabla 40: Valores de actividad de SOD en la población con Trisomía 21 completa, clasificados por edades.

	Individuos Totales	2-4 años	5-9 años	10-14 años
Nº Individuos analizados	57	6	13	38
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	6,38	6,68	6,29	6,37
Desviación standard	0,76	1,18	0,92	0,63

Se realizó una prueba "t" de student no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 41: Valores de actividad de SOD en la población con Trisomía 21 parcial, traslocaciones y mosaicismos, clasificados por edades.

	Individuos Totales	2-4 años	5-9 años	10-14 años
Nº Individuos analizados	51	7	16	28
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	5,08	5,53	4,87	5,1
Desviación standard	1,20	2,13	0,64	1,16

Se realizó una prueba "t" de student no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 42: Valores de actividad de SOD en la población con síndrome de Down, sin cariotipar, clasificados por edades.

	Individuos Totales	15-19 años	20-29 años	30-45 años
Nº Individuos analizados	152	76	53	23
Actividad media de SOD (Unids/ml de sangre)	5,75	5,84	5,63	5,76
Desviación standard	1,04	1,12	0,88	1,10

Se realizó una prueba "t" de student no encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

En el gráfico 39 se muestra la distribución de los valores de actividad de superóxido dismutasa en la población con síndrome de Down,

En el gráfico 40 se presentan los valores comparativos de actividad de SOD entre las poblaciones sana y con síndrome de Down.

Gráfico 39: Distribución de la actividad de superóxido dismutasa en la población con síndrome de Down

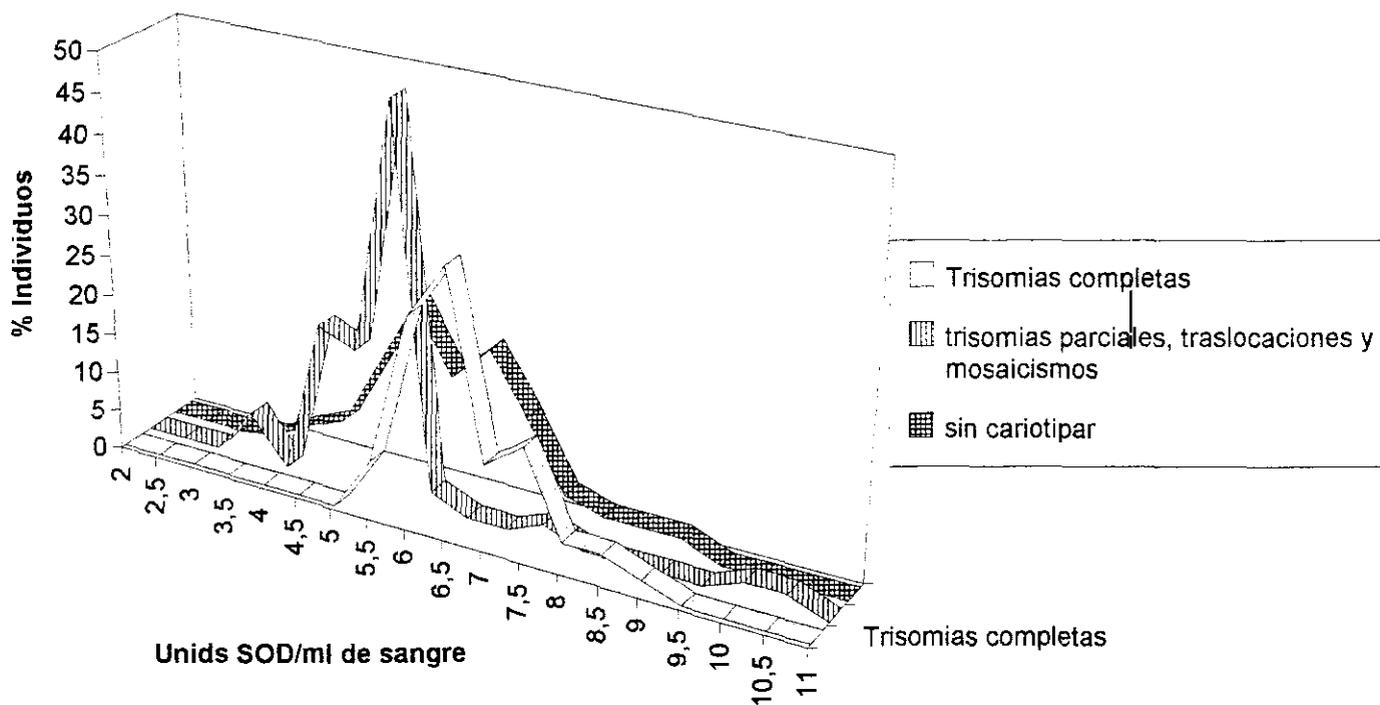
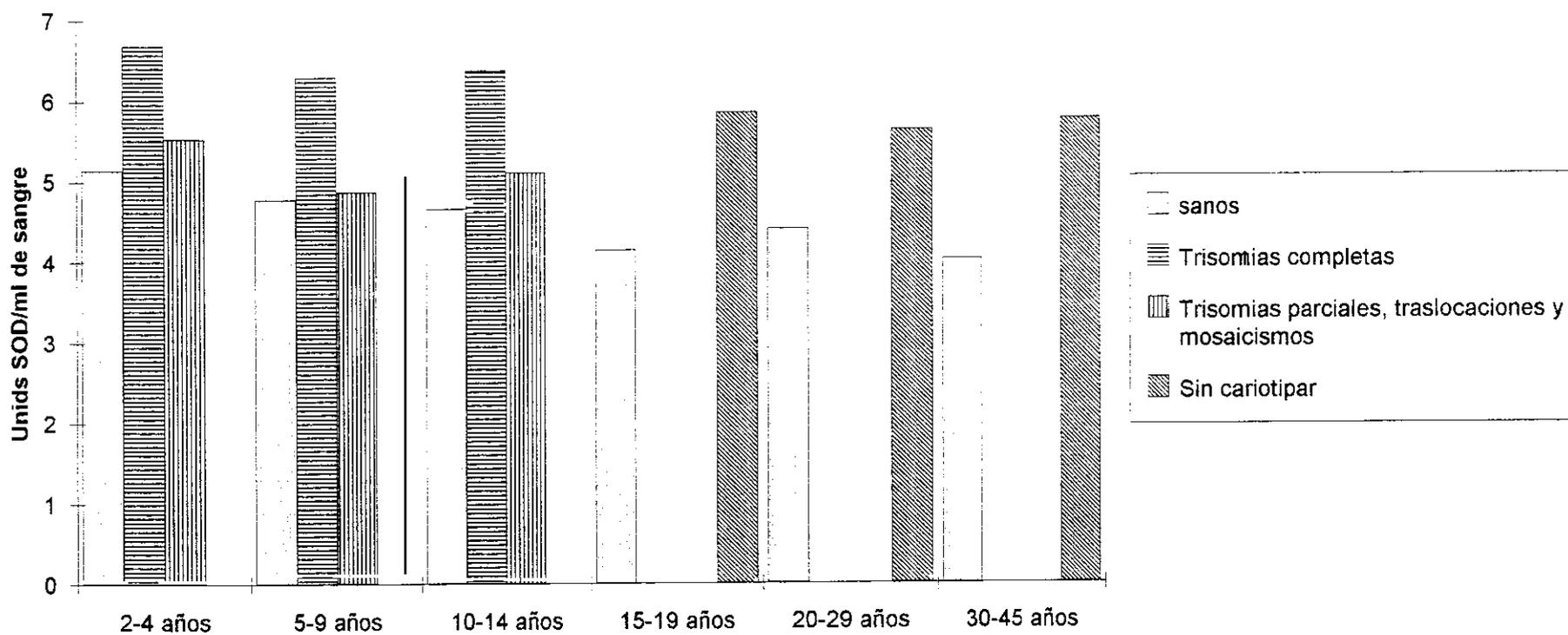


Gráfico 40: Valores de actividad de superóxido dismutasa en la población con síndrome de Down frente a valores normales de actividad



DISCUSIÓN

A. POBLACIÓN SANA

Se ha determinado la actividad de superóxido dismutasa en 3.575 individuos sanos de ambos sexos, con edades comprendidas desde el nacimiento hasta los 93 años, obteniéndose una actividad media de $4,32 \pm 1,02$ Unids SOD/ml de sangre. Esta actividad varía con la edad, siendo de $4,65 \pm 1,09$ Unids SOD/ml de sangre en el momento del nacimiento, subiendo hasta ser de $5,46$ Unids SOD/ml de sangre al año de vida, para descender posteriormente hasta alcanzar los valores de la población adulta, que es de $4,16 \pm 0,89$ Unids SOD/ml de sangre. Esta actividad de SOD se mantiene constante en los varones, pero aumenta en las mujeres de más de 68 años, alcanzando valores de $5,03 \pm 0,81$ Unids SOD/ml de sangre.

Los valores de actividad de SOD en la población sana entre 18 y 65 años concuerdan con los obtenidos por Minami y Yoshikawa (109) que encontraron una actividad media de $4,40 \pm 1,41$ unids SOD/ml de sangre al estudiar una muestra de 45 varones japoneses sanos (en ambos trabajos estudios se ha empleado el mismo método). Esta semejanza entre dos poblaciones tan dispares antropológicamente como la japonesa y la española puede ser indicativa del alto grado de estabilidad que presentan los valores de actividad de SOD. También Guemouri y col. (47) encontraron que la actividad de SOD era un valor constante entre los 20 y los 65 años. Esta estabilidad puede deberse al hecho de que tanto un exceso como un defecto de actividad de SOD es perjudicial para la célula y, por lo tanto, para el ser vivo.

Por otra parte, considerando que la población estudiada por Minami y Yoshikawa (109) estaba compuesta por trabajadores de 5 plantas químicas y que la muestra analizada en este estudio está compuesta en un 85% por personas de procedencia urbana, se puede plantear la hipótesis de que, más que los factores étnicos o raciales, son los factores ambientales, tales como la contaminación o el medio industrial, los responsables de los niveles de SOD en una población. Esta hipótesis fue planteada por primera vez por Michelson y col. (33) cuando, al realizar un estudio comparativo de diferentes grupos

poblacionales, observaron que una muestra compuesta por 7 tuaregs del Sahara presentaba una actividad de SOD semejante a la encontrada en un grupo de 39 individuos rurales franceses. Junto a esto, encontraron que una muestra integrada por 40 individuos de raza negra procedentes de África y residentes en París presentaba una actividad de SOD similar a la observada en un grupo de 20 individuos de raza blanca también residentes en París. Tanto los individuos tuaregs como los rurales franceses presentaban una actividad de SOD menor en un 30% a la observada en los individuos residentes en París, tanto blancos como negros. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en la que se analizaron un mayor número de individuos, apoyan esta hipótesis. Como puede verse en la tabla 3, la población rural española presenta una actividad de SOD de $3,81 \pm 0,9$ Unids/ml de sangre, un 10% inferior a lo encontrado en la población urbana española, que era de $4,22 \pm 0,97$ Unids/ml de sangre. Esta diferencia no es tan elevada como la observada por Michelson y col. (33), lo que podría deberse al hecho de que en este estudio se han analizado grupos muestrales de mayor tamaño, en los cuales, estadísticamente se acortan diferencias, obteniéndose poblaciones más homogéneas.

Todos estos datos sugieren la existencia de determinados factores en el medio urbano e industrial que hacen que los niveles de actividad de SOD se eleven. Teniendo en cuenta que es en el medio urbano donde se produce una mayor cantidad de radiaciones y donde existe un elevado índice de contaminación por hidrocarburos, presencia de metales pesados, óxido nítrico, etc. en la atmósfera, y que todos estos factores hacen aumentar los niveles de radical superóxido, es lógico pensar que este incremento de actividad de SOD es el resultado de la necesidad de una mayor protección frente a elevadas concentraciones de radical superóxido que de otro modo serían tóxicas.

En relación con el sexo, como puede verse en la tabla 2, no se han encontrado diferencias significativas entre la actividad de SOD de los varones españoles de 18 a 65 años y las mujeres españolas de la misma edad. Estos datos coinciden con los hallados por Guemouri y col. (47) y Michelson y col. (33).

Respecto a la influencia de la edad sobre la actividad de SOD, los resultados que se obtuvieron al agrupar a la población española adulta por grupos de edades mostraron que el grupo comprendido entre los 18 y los 26 años presentaba un incremento significativo de actividad de SOD. Dicho incremento era del 9% sobre el resto de la población adulta analizada (tablas 4 y 5). Estos datos no apoyan los obtenidos por Guemouri y col. (47) y por Michelson y col. (33), que no encontraron diferencias significativas en dicha actividad entre grupos de edades diferentes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la población analizada por Michelson y col. (33) era muy reducida y, además, exclusivamente rural, población que parece ser más conservadora para los niveles de actividad de SOD, mientras que la población considerada en este trabajo incluye tanto a individuos rurales como urbanos.

Tras considerar aisladamente los factores de procedencia, sexo y edad, se procedió a realizar un análisis de la varianza, con objeto de determinar el grado de influencia que cada uno de estos factores ejercía sobre los niveles de actividad de SOD. Como puede verse en la tabla 6, tanto la procedencia como la edad influyen significativamente en dichos niveles. Estos resultados llevaron a separar a la población adulta en rurales y urbanos y a observar en cada uno de ellos los niveles de actividad de SOD en su distribución por edades. De este modo se encontró que el incremento del 9% observado en la actividad de SOD en la población española de edades comprendidas entre los 18 y los 26 años se producía exclusivamente en la población urbana. Se desconoce la causa de este incremento, aunque podrían citarse como desencadenantes de este hecho factores sociosanitarios, como un mayor consumo de alcohol y tabaco, factores que influyen en los niveles de actividad de superóxido dismutasa (45,46),

Con respecto a la población rural española en su distribución por edades, se observó que existía una gran analogía con los resultados obtenidos por Michelson y col. (33) en la población rural francesa. Estos autores observaron que, si bien no existían diferencias significativas con respecto a la edad, el grupo de individuos de edades comprendidas entre

los 60 y los 69 años presentaban una actividad de SOD menor que el resto de la población. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan los datos de Michelson y col. (33) ya que tampoco se han encontrado diferencias significativas de actividad de SOD en la población rural entre los distintos grupos de edades. Además, de modo similar a lo observado por Michelson y col. (33), se encontró que la población rural de edades comprendidas entre los 58 y los 65 años mostraba una actividad de SOD de 3,59 Unids/ml de sangre, frente a las 3,83 Unids/ml de sangre que presenta el resto de la población analizada.

Considerando a la población infantil y adolescente, la actividad de SOD en el momento del nacimiento es ligeramente más elevada que la observada en la población adulta, como puede verse en la tabla 11. Esta actividad sube en el primer año de vida del individuo para, posteriormente, ir disminuyendo muy gradualmente hasta alcanzar los niveles del adulto entre los 15 y los 18 años. Estos datos no apoyan los observados por Aliakbar y col. (50) y Huston y col. (51), que encontraron que la actividad de SOD era menor en los neonatos frente al resto de la población. Sin embargo, Aliakbar y col. (50) analizaron un grupo muestral compuesto por 10 neonatos, y el grupo analizado por Huston y col. (51) estaba compuesto por 6 neonatos, por lo que se trata más de observaciones aisladas que de estudios poblacionales. Al igual que en la población adulta, no se observaron diferencias significativas en la actividad de SOD entre sexos, excepto en el periodo que va desde los 15 a los 18 años, en los que la actividad de SOD de las mujeres disminuye significativamente (tabla 12). Este descenso fue observado también por Guemouri y col. (47) en mujeres de entre 10 y 16 años, tras la menarquía. Hasta la fecha no se ha publicado ningún trabajo poblacional sobre la actividad de SOD, de ahí la gran importancia de estos resultados.

También en la población anciana de edades comprendidas entre 68 y 93 años se observan diferencias entre sexos en la actividad de SOD. Como se observa en la tabla 15, la actividad de SOD en los varones se mantiene constante o desciende ligeramente con la edad, de modo no significativo, mientras que, en las mujeres aumenta espectacularmente,

como se observa en el gráfico 9, a partir de los 68 años. Este incremento se observa solo en las mujeres "sanas" mayores de 68 años, y no en las que presentan patologías. Esto era de esperar, puesto que la mujer tiene una esperanza de vida superior a la del varón, y ya Tolmasoff y col. (54) encontraron correlación entre la actividad de SOD y la vida máxima potencial. Es posible, que junto a otros factores, sea la mayor actividad de SOD, una de las causas de la mayor longevidad de las mujeres. Estos resultados apoyan la teoría del envejecimiento de Harman (53) que afirma que los procesos de envejecimiento están causados por un incremento del efecto tóxico de los radicales libres del oxígeno y una disminución de los agentes antioxidantes. Sin embargo, la importancia de los resultados aquí presentados estriba en el hecho de que, por primera vez, se ha demostrado la relación entre incremento en la actividad de SOD y población longeva, ya que aunque existen evidencias claras de la importancia de los radicales libres en los procesos de envejecimiento, las observaciones referentes a la actividad de SOD eran contradictorias, lo que llevó a pensar que deberían ser otras enzimas antioxidantes, tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa los que ejercían este efecto protector frente al envejecimiento.

B. POBLACIÓN CON PATOLOGÍAS PROPIAS DEL ENVEJECIMIENTO

En ninguna de las patologías analizadas en esta Tesis Doctoral se han observado diferencias en la actividad de SOD entre varones y mujeres. En algunas de ellas esta actividad estaba aumentada y en otras no se observaba ninguna alteración.

En los pacientes que habían sufrido un accidente cerebral vascular agudo, la actividad de SOD se encontraba aumentada. En un estudio realizado en ratas por Michowiz y col. (64) se observó que la actividad de SOD no variaba en las áreas isquémicas ni cercanas al infarto durante las primeras 24 horas tras la lesión. Posteriormente, se produce una sobreoxigenación, que hace aumentar el nivel de radicales libres de oxígeno. Esto podría explicar porque también la actividad de SOD se encuentra aumentada. Sin embargo, este incremento también puede deberse a una mayor liberación de SOD a la sangre tras producirse roturas celulares tras la isquemia cerebral (63). El tiempo

transcurrido tras la isquemia es un factor muy importante a la hora de observar variaciones de actividad de SOD en los accidentes cerebrales vasculares agudos y estas variaciones pueden tener un gran valor pronóstico.

La actividad de SOD también se encuentra aumentada en los pacientes con patología cardiovascular analizados en esta Tesis Doctoral. En la mayoría de estas patológicas vasculares se producen fases isquémicas en las que los niveles de radicales libres disminuyen, para, tras la reperfusión, incrementarse. Una mayor actividad de SOD ejercería un efecto protector en esta fase permitiendo una mejor recuperación del paciente. Se ha observado que la administración exógena de SOD hace disminuir el daño isquémico, atenuando la mayoría de sus secuelas, como la arritmia, el área de infarto, y la zona de necrosis (6).

Se ha observado un incremento de la actividad de SOD en los pacientes con cataratas analizados en esta Tesis Doctoral. Estos datos no confirman los obtenidos por Jacques y col. (113) que no encontraron cambios significativos en la actividad de SOD en sangre de personas con y sin cataratas seniles. Ohrloff y col. (90) han observado una disminución de la actividad de SOD en cristalinios con cataratas, sin encontrar variación en cristalinios de individuos sanos de diferentes edades. Aunque sí se ha descrito un descenso de la actividad de SOD en los cristalinios con cataratas (91), esta no se ha traducido en un descenso similar en sangre, pese a que el desarrollo de las cataratas pueda estar ligado a una defensa antioxidante alterada en la sangre (114).

Existe gran controversia respecto al comportamiento de la actividad de SOD en pacientes con demencia, debido a que no está claro el papel de los radicales libres e esta patología. Los pacientes con demencia analizados en esta Tesis Doctoral no muestran variaciones respecto al patrón normal de actividad de SOD, lo que está en concordancia con los datos obtenidos por Sulkawa y col. (56) y Jaendel y col. (58), aunque Perrin y col. (55) y De Lustig y col. (61) han observado un incremento en la actividad de SOD. Es posible que exista un incremento de la actividad de SOD en la demencia, que será mas

pronunciada en aquellas regiones cerebrales típicamente asociadas a ella, pero es necesaria una mayor profundización en este estudio.

La actividad de SOD se encuentra también aumentada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Estos datos no apoyan los datos obtenidos por Umeki y col. (106), que observaron que la actividad de SOD estaba disminuida en pacientes con infecciones respiratorias. Sin embargo, en los pulmones, la producción de radicales libres de oxígeno es elevada y constante, ya que los pulmones de un adulto humano ventilan 3 Tm de aire en un año, lo que da idea de las elevadas posibilidades de formación de radicales libres en este tejido y su implicación en la etiopatogenia de diferentes enfermedades respiratorias. Por esto no es de extrañar este incremento detectado en la actividad de SOD de este tipo de pacientes.

En las pacientes con miomas también se ha observado un incremento de la actividad de SOD. Es, hasta el momento, el primer estudio realizado sobre la actividad de SOD en esta patología. Se ignoran las posibles causas de este fenómeno, aunque podría deberse a que se ha observado: una elevada concentración de radicales superóxido en el ovario; que el radical superóxido favorece la ovulación; y que un incremento de SOD la inhibe (115). Todo ello sugiere la necesidad de realizar estudios mas profundos sobre este patología y la actividad de SOD.

No se encontraron alteraciones de actividad de SOD en los pacientes analizados en esta Tesis Doctoral que sufrían de patología prostática, ni en los que presentaban osteoporosis. Esto era de esperar, puesto que no parece que existan en estas patologías factores que puedan alterar los niveles de actividad de SOD.

Como cabría esperar, la actividad de SOD está elevada en los pacientes analizados en esta Tesis Doctoral que presentan patologías del sistema osteoarticular debido en gran parte a que en la mayoría de estas patologías se producen procesos inflamatorios, y en estos procesos, los leucocitos generan una gran cantidad de radicales libres, lo que

induciría una mayor actividad de SOD, que puede llegar a actuar como agente antiinflamatorio endógeno. De ahí los grandes esfuerzos en la búsqueda de un forma farmacéutica capaz de vehicular a la SOD lo que permitiría la acción antiinflamatoria de esta enzima administrada exógenamente, ya que se trataría de un tratamiento inocuo y carente de toxicidad. Un dato interesante es el hecho de que la actividad de SOD en estos pacientes disminuye significativamente con la edad, lo que traería como consecuencia que el efecto protector que esta enzima ejerce sobre los procesos inflamatorios descienda.

C. POBLACIÓN CON PROCESOS TUMORALES

A pesar de que es un hecho aceptado que los radicales libres intervienen tanto en la iniciación como en la promoción de la carcinogénesis, la actividad de SOD de la población con procesos tumorales estudiada en esta Tesis Doctoral no es significativamente diferente de la observada en la población sana, excepto en los casos de tumores pulmonares y en cánceres de mama, en los que la actividad de SOD se encuentra disminuida. Esta disminución está en la misma línea de los datos publicados por Tang y col. (116) que observaron que la actividad de SOD estaba disminuida en 11 pacientes con cáncer de pulmón; y los datos presentados por Kumar y col. (78) que observaron una disminución de la actividad de SOD en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama. En esta Tesis Doctoral se ha observado también un incremento de la actividad de SOD en los pacientes con mieloma analizados, lo que apoya los datos obtenidos por Yamanaka y col. (117) que observaron un incremento de la actividad de SOD en células mielocíticas. Por lo que respecta a otros tipos de tumores, se han publicado observaciones aisladas con resultados contradictorios. Así, Shinji y col. (118) encontraron que la actividad de SOD estaba *significativamente elevada en sueros de pacientes con varios cánceres digestivos (cáncer gástrico, colorectal, del tracto biliar y de esófago)*. En este estudio no se ha observado ninguna diferencia significativa de la actividad de SOD en esta patología. Bewick y col. (119) observaron que la actividad de SOD estaba disminuida en pacientes con linfoma. Estos resultados contrastan con los elevados niveles de SOD encontrados por González

(79) en un grupo similar de pacientes y con los niveles normales de actividad de SOD que se observaron en los pacientes con linfoma descritos en este estudio. A la vista de todo ello, cabría pensar que, o bien la SOD implicada en los procesos tumorales es la de manganeso, o bien son otras enzimas, tales como las glutatión peroxidasa y reductasa o la catalasa, los implicados en los procesos de iniciación y promoción de la carcinogénesis.

D. POBLACIÓN CON DIABETES

Como puede verse en la tabla 36 la actividad de SOD es diferente entre pacientes con Diabetes mellitus insulín-dependiente y con Diabetes Mellitus no insulín-dependiente, siendo más elevada en los pacientes con Diabetes Mellitus no insulín-dependiente. En los pacientes con Diabetes Mellitus insulín-dependiente se han obtenido unos valores de actividad de SOD significativamente elevados a partir de los 30 años si se comparan con los de la población sana de esa edad. Kawamura y col. (83) han encontrado a la actividad de SOD disminuida en niños con Diabetes Mellitus insulín-dependiente. También Strange y col. (84) han encontrado la actividad de SOD disminuida en pacientes con este tipo de diabetes, mientras que Faure y col. (86) y Jos y Col. (87) no la han encontrado alterada.

Por otra parte, en la Diabetes Mellitus no insulín-dependiente se ha observado que la actividad de SOD se encuentra aumentada frente a la observada en la población sana de edad correspondiente. Estos resultados concuerdan con los de Li. y col. (120) en una población semejante. También en estos pacientes se observa que la actividad de SOD aumenta con la edad. Esto podría deberse tanto a una respuesta del organismo frente al estrés oxidativo como a un intento de compensar la mayor concentración de SOD glicosilada.

E. POBLACIÓN CON SÍNDROME DE DOWN

Como cabría esperar, en la población de pacientes estudiados con síndrome de Down que presentan trisomías 21 completas se observa que la actividad de SOD es de $6,38 \pm 0,76$ Unids/ml de sangre, que es un 33 % mayor que la encontrada en la población

sana de edades correspondientes. Este valor no supone el 50% de incremento que era de esperar que se produciría si se observara el efecto de dosis génica descrita por algunos autores (95, 96) en casos aislados de pacientes con trisomía 21, aunque es un incremento muy elevado frente a la actividad de la población sana que era de $4,84 \pm 1,01$ Unids SOD/ml de sangre. Se podría pensar que existe un mecanismo de regulación de esta actividad de SOD que intenta compensar el exceso de actividad producido. En la población de pacientes con Síndrome de Down sin cariotipar, la actividad de SOD obtenida fue de $5,75 \pm 1,04$, que es un 25% superior a la encontrada en la población sana de edad semejante. Respecto a los resultados obtenidos en la población con trisomias parciales, traslocaciones y mosaicismos, conviene destacar que algunos individuos con Síndrome de Down, a pesar de tener la mayoría de los rasgos fenotípicos del Síndrome de Down, aparentemente tienen una estructura cromosómica normal, debido a que solo un área específica del brazo largo del cromosoma 21 produce el Síndrome de Down. En efecto, 18 de los 23 rasgos característicos del Síndrome de Down resultan de la trisomía de un pequeño segmento del cromosoma 21, que desde una perspectiva citogenética comprendería las tres sub-bandas del segmento 21q22, si bien, mas recientemente, se piensa que la pequeña zona terminal 21q22.3 podría constituir la región crítica del Síndrome de Down. Puesto que el gen que codifica para SOD no se localiza en esta región crítica, es posible detectar en trisomias parciales del Síndrome de Down valores normales de actividad de SOD. Y aunque se hable de región crítica, sin embargo, ello no significa que el resto del cromosoma sea irrelevante. Esto explicaría los resultados obtenidos en los pacientes con Síndrome de Down sin cariotipar y con trisomias parciales, traslocaciones y mosaicismos, en los que la actividad de SOD no estaba incrementada frente a los valores normales.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. La media de actividad de superóxido dismutasa en la población adulta sana española es de $4,16 \pm 0,89$ Unids SOD/ml de sangre.
2. No se han encontrado diferencias significativas entre la actividad de superóxido dismutasa que presentan las mujeres adultas sanas españolas ($4,09 \pm 1,01$ Unids SOD/ml de sangre) y la que presentan los varones adultos sanos españoles ($4,2 \pm 0,97$ Unids SOD/ml de sangre).
3. En la población adulta rural española se ha encontrado una actividad de superóxido dismutasa de $3,81 \pm 0,9$ Unids SOD/ml de sangre, lo que representa una actividad un 10% inferior a la obtenida en la población adulta urbana española ($4,22 \pm 0,97$ Unids SOD/ml de sangre).
4. La población española comprendida entre los 18 y los 26 años muestra una actividad de $4,40 \pm 0,91$ Unids SOD/ml de sangre, lo que significa un aumento del 9% frente al resto de la población adulta sana española ($4,03 \pm 0,92$ Unids SOD/ml de sangre), observándose este incremento únicamente en la población urbana española comprendida en dicho grupo de edades.
5. La población adulta rural española en su distribución por edades muestra unos niveles homogéneos de actividad de superóxido dismutasa.
6. En la población infantil y adolescente sana española la actividad de superóxido dismutasa es en el momento del nacimiento de $4,67 \pm 1,18$ Unids SOD/ml de sangre. En el 1^{er} año de vida asciende hasta $5,46 \pm 1,44$ Unids SOD/ml de sangre, disminuyendo después progresivamente hasta alcanzar los niveles de actividad de superóxido dismutasa del adulto entre los 15 y los 18 años.

7. Las niñas sanas españolas entre 15 y 18 años presentan una actividad de superóxido dismutasa menor ($4,07 \pm 0,78$ Unids SOD/ml de sangre) que la de los niños de la misma edad ($4,25 \pm 0,80$ Unids SOD/ml de sangre), siendo esta diferencia estadísticamente significativa.
8. En la población española sana mayor de 50 años, la actividad de superóxido dismutasa es de $4,37 \pm 0,99$ Unids SOD/ml de sangre, observándose diferencias significativas de actividad de superóxido dismutasa entre los dos sexos, siendo en las mujeres de $4,57 \pm 1,05$ Unids SOD/ml de sangre y en los varones de $4,16 \pm 0,89$ Unids SOD/ml de sangre. La actividad de superóxido dismutasa en las mujeres sanas mayores de 68 años asciende hasta $5,03 \pm 0,81$ Unids SOD/ml de sangre, mientras que en los varones sanos mayores de 68 años esta actividad se mantiene constante.
9. La actividad de superóxido dismutasa se encuentra aumentada en algunas patologías asociadas al envejecimiento, tales como accidente cerebral vascular agudo, patologías del sistema cardiovascular, cataratas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, miomas y patologías del sistema osteoarticular, no observándose variaciones de la actividad de SOD en otras patologías propias del envejecimiento tales como la demencia, la osteoporosis y la patología prostática.
10. En las patologías del sistema osteoarticular la actividad de superóxido dismutasa disminuye significativamente con la edad del paciente.
11. La actividad de superóxido dismutasa no está alterada en los procesos cancerosos salvo en los cánceres de mama y de pulmón, donde esta actividad está disminuida, y en mielomas, donde se encuentra aumentada. En los tumores pulmonares, la actividad de superóxido dismutasa es mas elevada en las mujeres que en los varones.
12. La actividad de superóxido dismutasa es significativamente diferente en los pacientes con Diabetes Mellitus insulín-dependiente y no insulín-dependiente, siendo superior en estos últimos ($5,23 \pm 1,17$ Unids SOD/ml de sangre) frente a la actividad que presentan

los individuos con Diabetes Mellitus insulín-dependiente ($4,53 \pm 1,13$ Unids SOD/ml de sangre), no observándose diferencias significativas con respecto al sexo en ninguna de las dos poblaciones.

13. En los individuos con Diabetes Mellitus insulín-dependiente, la actividad de superóxido dismutasa mantiene los niveles infantiles a todas las edades, sin descender a los niveles de los adultos.
14. En los individuos con Diabetes Mellitus no insulín-dependiente, la actividad de superóxido dismutasa aumenta con la edad, alcanzando valores de $5,5 \pm 1,18$ Unids SOD/ml de sangre entre los 80 y 85 años.
15. En la población con síndrome de Down que presentaba trisomías 21 completas, la actividad de superóxido dismutasa era de $6,38 \pm 0,75$ Unids/ml de sangre, un 33% superior a la actividad de superóxido dismutasa observada en la población sana. En la población con síndrome de Down que presentaba trisomías 21 parciales, traslocaciones y mosaicismos no se encontraron diferencias significativas de actividad frente a la población sana. En la población con síndrome de Down sin cariotipar analizada, la actividad de superóxido dismutasa fue de $5,76 \pm 1,1$ Unids SOD/ml de sangre, un 25,21% más de actividad que en la población sana. No se observaron diferencias significativas de actividad de superóxido dismutasa entre sexos ni entre diferentes grupos de edad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mann, T. y Keilin, D.: Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. Proc. R. Soc. London, Ser. B **126**: 303-315 (1939).
2. McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J.Biol. Chem. **244**: 6049-6055 (1969).
3. Keele, B.B.Jr. McCord, J.M. y Fridovich, I.: Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B: A new manganese-containing enzyme. J. Biol. Chem. **245**: 6176 (1970).
4. Weisiger, R.A. y Fridovich, I.: Superoxide dismutase: Organelle specificity. J.Biol. Chem. **248**: 3582 (1973).
5. Yost, F.J. Jr. y Fridovich, I.: An Iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **248**: 4905 (1973).
6. Omar, B.A., Flores, S.C. y McCord, J.M.: Superoxide dismutase: Pharmacological developments and applications. Adv. Pharmacol. **23**: 109-161 (1992).
7. Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W. y Chang, L.Y.: Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 10405-10409 (1992).
8. Mohamed, M.S. y Greenberg, D.M.: Isolation of purified copper protein from horse liver. J.Gen. Physiol. **37**: 433 (1953).
9. Fridovich, I.: Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. En "Free Radicals in Biology". Vol.1, Edit. Pryor, W.A. pp 239-277, Academic Press, 1976.
10. Richardson, D.C.: The three dimensional structure of Cu,Zn-superoxide dismutase. En "Superoxide and superoxide dismutases". Edits. Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I. pp 217-223. Academic press, 1977.
11. Fridovich, I.: Superoxide dismutases. Ann. Rev. Biochem. **44**: 147-159 (1977).

12. Doadrio, A.: Química Bioinorgánica. Editorial L.A.E.F. (1979).
13. Sines, J.J., Allison, S.A. y McCammon, J.A.: Point charge distributions and electrostatic steering in enzyme/substrate encounter: Brownian dynamics of modified copper/zinc superoxide dismutase. *Biochemistry* **29**: 9403-9412 (1990).
14. Forman, H.J. y Fridovich, I.: Stability of bovine superoxide dismutase. Effects of metals. *J. Biol. Chem.* **248**: 2645-2649 (1973).
15. Beem, K.M., Rich, W.E. y Rajagopalan, K.V.: Total reconstitution of Copper-Zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **249**: 7298-7305 (1974).
16. Fridovich, I.: The biology of oxygen radicals. *Science* **201**: 875-880 (1978).
17. Halliwell, B.: Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen in living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biol. Int. Rep.* **2**: 113-128 (1978).
18. Kellog, E.W. y Fridovich, I.: Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* **250**: 8812-8817 (1975).
19. Kellog, E.W. y Fridovich, I.: Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **252**: 6721-6728 (1977).
20. Green, R.C., Little, C. y O'Brien, P.J.: Inactivation of isocitrate dehydrogenase by a lipid peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **142**: 598-605 (1971)
21. Fridovich, I.: *Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle.* *Photochem. and Photobiol.* **28**: 733-741 (1978)
22. Misra, H.P. y Fridovich, I.: The generation of superoxide radical during the autooxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **247**: 6960-6962 (1972).

23. Gotoh, T. y Shikama, K.: Generation of the superoxide radical during the autooxidation of oxyhemoglobin. *J. Biochem.* **80**: 397-400 (1976).
24. Michelson, A.M.: Production of superoxide by metal ions. En "Superoxide and superoxide dismutases. Edits. Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I. pp 77-86. Academic Press, 1977.
25. Michelson, A.M.: Role biologique du radical anion superoxyde et des superoxyde-dismutases dans le metabolisme cellulaire. Complet vendus des seances de la Societe de Biologie **170**: 1137-1146 (1976).
26. McCord, J.M., Keele, B.B.Jr. y Fridovich, I.: An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**: 1024-1027 (1971).
27. Tan, Y.H., Tischfield, J. y Ruddle, F.H.: The linkage of genes for the human interferon induced and antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21. *J.Exp. Med.* **137**: 317-330 (1973).
28. Sinet, P.M., Lavelle, F., Michelson, A.M. y Jerome, H.: Superoxide dismutase activities of blood platelets in trisomy 21. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **67**: 904-909 (1975).
29. Epstein, C.J., Avraham, K.B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C. y Groner, Y.: Transgenic mice with increased Cu/Zn superoxide dismutase activity: Animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 8044-9448 (1987).
30. Elroy-Stein, O., Bernstein, Y. y Groner, Y.: Overproduction of human Cu/Zn superoxide dismutase in transfected cells: Extenuation of paraquat-medicated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J.* **5**: 615-622 (1986).

31. Schickler, M., Knobler, H., Avraham, K.B., Elroy-Stein, O. y Groner, Y.: Diminished serotonin uptake in platelets of transgenic mice with increased Cu/Zn superoxide dismutase activity. *EMBO J.* **8**: 1385-1392 (1989).
32. Avraham, Schickler, M., Sapoznikov, D., Yarom, R. y Groner, Y.: Down's syndrome: Abnormal neuromuscular junction in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn superoxide dismutase. *Cell (Cambridge, Mass)* **54**: 823-829 (1988).
33. Michelson, A.M., Puget, K., Durosay, P. y Bonneau, J.C.: Clinical aspects of the dosage of erythrocyte superoxide dismutase. En "Superoxide and superoxide dismutases" Edits. Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I. pp 467-499. Academic Press, New York, 1977.
34. Glose, B., Debray-Ritzen, P., Puget, K. y Michelson, A.M.: Dosage de la superoxyde dismutase 1 plaquettaire dans les psychoses infantile de développement. *Nouv. Press. Med.* **6**: 2449 (1977).
35. Goldberg, B. y Stern, A.: Generation of O_2^- by interaction of the haemolytic agent phenylhydrazine with human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **250**: 2401-2403 (1975).
36. Heikkila, R. E. y Cohen, G.: 6-hydroxydopamine evidence for O_2^- as an oxidative intermediate. *Science* **181**: 456-457 (1973).
37. Heikkila, R.E., Winston, B. y Cohen, G.: Alloxan induced diabetes evidence for $\bullet OH$ as a cytotoxic intermediate. *Biochem. Pharmacol.* **25**: 1085-1092 (1976).
38. Hassan, H.M. y Fridovich, I.: Physiological function of superoxide dismutase in glucose-limited chemostat cultures of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **130**: 805-811 (1977).
39. Dybing, E., Nelson, S.D., Mitchel, J.R., Sasume, H.A. y Gillete, J.R.: Oxidation of α -metildopa and other catechols by cytochrome P₄₅₀-generated O_2^- : possible mechanism of α -metildopa hepatitis. *Mol. Pharmacol.* **12**: 911-920 (1976).

40. Lown, J.W., Sims, S.K., Majundar, K.C. y Chang, R.Y.: Strand scission of DNA by bound adriamycin and daunorubicin in the presence of reducing agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **76**: 705-710 (1977).
41. Cunningham, M.L., Ringrose, P.S. y Lokesh, B.R.: Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase. *Mutat Res.* **135**: 199-202 (1984).
42. Lorentzen, R.J. y Tso, P.O.P.: Benzpyrenedione (benzpyrene diol) oxidation-reduction couples and the generation of reactive reduced molecular O₂. *Biochemistry* **16**: 1467-1473 (1977).
43. Bus, J.S., Aust, S.D. y Gibson, J.E.: Lipid peroxidation: A possible mechanism for paraquat toxicity. *Res Comm. Chem. Pathol.* **11**: 31-38 (1975).
44. Misra, H. P. y Fridovich, I.: Superoxide dismutase and the oxygen enhancement of radiation lethality. *Arch. Biochem. Biophys.* **176**: 577-581 (1976).
45. Weitberg, A.B. y Corvese, D.: Oxygen radicals potentiate the genetic toxicity of tobacco-specific nitrosamines. *Clin. Genet.* **43**: 88-91 (1993).
46. Zidenberg-Cherr, S., Halsted, C.H., Olin, K.L., Reisenauer, A.M. y Keen, C.L.: The effect of chronic alcohol ingestion on free radical defense in the miniature pig. *J. Nutr.* **120**: 213-217 (1990).
47. Guemouri, L., Artur, Y., Herberth, B., Jeandel, C., Cuny, G. y Siest, G.: *Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood.* *Clin. Chem.* **37**: 1932-1937 (1991).
48. De la Torre, M^a R., Casado, A. y López-Fernández, M^a E.: Superoxide dismutase activity in the Spanish population. *Experientia* **46**: 854-856 (1990).

49. Wisdom, S.J., Wilson, R., McKillop, J.H. y Walker, J.J.: *Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165/6 (I)**: 1701-1704 (1991).
50. Aliakbar, S., Brown, P.R., Bidwell, D. y Nicolaidis, K.H.: *Human erythrocyte superoxide dismutase in adults, neonates, and normal, hypoxaemic, anaemic, and chromosomally abnormal fetuses*. *Clin. Biochem.* **26**: 109-115 (1993).
51. Huston, R.K., Shearer, T.R., Jelen, B.J., Whall, P.D. y Reynolds, J.W.: *Relationship of antioxidant enzymes to trace metals in premature infants*. *J. Parent. Ent. Nutr.* **11/2**: 163-168 (1987).
52. Novák, Z., Kovács, L., Pál, A., Pataki, I., Varga, Sz.I. y Matkovics, B.: *Comparative study: the antioxidants enzymes and lipid peroxidation in cord and maternal red blood cells haemolysates*. *Clin. Chim. Acta* **180**: 103-106 (1989).
53. Harman, D.: *Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry*. *J. Gerontol.* **11**: 298-300 (1956).
54. Tolmasoff, J.M., Ono, T. y Cutler, R.G.: *Superoxide dismutase: correlation with lifespan and specific metabolic rate in primate species*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 2777. (1980).
55. Perrin, R., Briançon, S., Jeandel, C., Artur, Y., Minn, A., Penin, F. and Siest, G.: *Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: A case control study*. *Gerontology* **36**: 306-313 (1990).
56. Sulkawa, R., Nordberg, U.R., Erkinjuntti, T. and Westermarck, T.: *Erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase in Alzheimer's disease and other dementias*. *Acta Neurol. Scand.* **73**: 487-489 (1986).

57. Marklund, S.L., Adolfsson, R., Gottfries, C.G. and Winblad, B.: Superoxide dismutase isoenzymes in normal brains and in brains from patients with dementia of Alzheimer type. *J. Neurol. Sci.* **67**: 319-325 (1985).
58. Jeandel, M.B., Nicolas, F., Dubois, F., Nabet-Belleville, F., Penin, F. and Cuny, G.: Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology* **35**: 275-282 (1989).
59. Liles, M.R., Newsome, D.A. y Oliver, P.D.: Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch. Ophthalmol.* **109**: 1285-1288 (1991).
60. Lohr, J.B.: Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. *Arch. Gen Psychiatry* **48**: 1097-1106 (1991).
61. De Lustig, E.S., Serra, J.A., Kohan, S., Canziani, G.A., Famulari, A.L. and Dominguez, R.O.: Copper-Zinc superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging. *J. Neurol. Sci.* **115**: 18-25 (1993).
62. Kontos, C.D., Wei, E.P., Williams, J.I., Kontos, H.A. y Povlishock, J.T.: Cytochemical detection of superoxide in cerebral inflammation and ischemia in vivo. *Am. J. Physiol.* **263**: H1234-H1242 (1992).
63. Strand, T. y Marklund, S.L.: Release of superoxide dismutase into cerebrospinal fluid as a marker of brain lesion in acute cerebral infarction. *Stroke* **23**: 515-518 (1992).
64. Michowiz, S.D., Melamed, E., Pikarsky, E. and Rappaport, Z.H.: Effect of ischemia induced by middle cerebral artery occlusion on superoxide dismutase activity in rat brain. *Stroke* **21**: 1613-1617 (1990).
65. Kinouchi, H., Epstein, C.J., Mizui, T., Carlson, E., Chen, S.F. y Chan, P.H.: Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 11158-11162 (1991).

66. Saggiu, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F.R., Jenner, L.P. and Marsden, C.D.: A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J. Neurochem.* **53**: 692-697 (1989).
67. Mizuno, Y and Ohta, K.: Regional distribution of thiobarbituric acid-reactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adult and aged rat brains. *J. Neurochem.* **46**: 1344-1352 (1986).
68. Marttila, R.J., Lorentz, H y Rinne, V.K.: Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J. Neurological Sci.* **86**: 321-331 (1988).
69. Kalra, J., Rajput, A.H., Mantha, S.V. and Prasad, K.: Serum antioxidant enzyme activity in Parkinson's disease. *Mol. Cell Biochem.* **110**: 165-168 (1992).
70. Abdalla, D.S.P., Monteiro, H.P., Oliveira, J.A.C. y Bechara, E.J.H.: Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and maniac-depressive patients. *Clin. Chem.* **32**: 805-808 (1986).
71. Golse, B., Debray, Q., Puget, K. y Michelson, A.M.: Dosage erythrocytaire de la superoxyde dismutase 1 et de la glutathion peroxydase dans le schizophrénies de l'adulte, *Nouv. Presse Med.* **23**: 2070-2071 (1978).
72. Copeland, E.S.: Free radicals in promotion. A chemical pathology study workshop. *Cancer Res.* **43**: 5631-5637 (1983).
73. Mimnaugh, E.G., Dusre, L., Atwell, J. y Miers, C.E.: Differential oxygen radical susceptibility of adriamycin-sensitive and -resistant MCF-7 human breast tumor cells. *Cancer Res.* **49**: 8-15 (1989).

74. Petkau, A. y Chelack, W.S.: Radioprotection by superoxide dismutase of macrophage progenitor cells from mouse bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **119**: 1089-1095 (1984).
75. Chen, J., Geissler, C., Parpia, B. y Campbell, T.C.: Antioxidant status and cancer mortality in China. *Int. J. Epidemiol.* **21**: 625-635 (1992).
76. Bartoli, G.M., Giannattasio, B., Palozza, P. y Cittadini, A.: Superoxide dismutase depletion and lipid peroxidation in rat liver microsomal membranes: correlation with liver carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta* **966**: 214-221 (1988).
77. Ikeda, Y. y Long, D.M.: Oxygen free radicals in the genesis of peritumoural brain oedema in experimental malignant brain tumours. *Acta Neurochir. Suppl.* **51**: 142-144 (1990).
78. Kumar, K., Thangaraju, M. y Sachdanandam, P.: Changes observed in antioxidant system in the blood of post-menopausal women with breast cancer. *Biochem. Int.* **25**: 371-380 (1991).
79. Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gantero, H., Dhemy, D. and Boivin, P.: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res.* **44**: 4137-4139 (1984).
80. Mulder, T.P.J., Verspaget, H.W., Janssens, A.R., De Bruin, P.A.F., Griffioen, G. y Lamers, C.B.H.W.: Neoplasia-related changes of two copper (Cu)/Zinc (Zn) proteins in the human colon. *Free Rad. Biol. Med.* **10**: 501-506 (1990).
81. Walter, R.M., Uriu-Hare, J.Y., Lewis Olin, K., Oster, M.H., Anawalt, B.D., Critchfield, J.W. y Keen, C.L.: Copper, Zinc, Manganese and Magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **14/11**: 1050-1056 (1991).
82. Sakurai, T., Matsuyama, M. y Tsuchiya, S.: Glycation of erythrocyte superoxide dismutase reduces its activity. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 302-307 (1987).

83. Godin, D.V., Wohaiieb, S.A., Garnett, M.E. y Goumeniouk, A.D.: Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* **84**: 223-231 (1988).
84. Strange, R.C., Jones, P., Bicknell, J. y Scarpello, J.: Expression of CuZn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes from diabetic and non-diabetic subjects. *Clin. Chim. Acta* **207**: 261-263 (1992)
85. Taniguchi, N.: Clinical significances of superoxide dismutases: changes in aging, diabetes, ischemia and cancer. *Adv. Clin. Chem.* **29**: 1-59 (1990).
86. Loven, A., Romem, Y., Pelly, I.Z., Holcberg, G. y Agam, G.: Copper Metabolism -a factor in gestational diabetes? *Clin. Chim. Acta* **213**: 51-59 (1992).
87. Faure, P., Corticelli, P., Richard, M.J., Arnaud, J., Coudray, C., Halimi, S., Favier, A. y Roussel, A.M.: Lipid peroxidation and trace elements status in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy. *Clin. Chem.* **39/5**: 789-793 (1993).
88. Jos, J., Rybak, M., Patin, P.H., Robert, J.J., Boitard, C. y Thevenin, R.: Étude des enzymes antioxydantes dans le diabète insulino-independant de l'enfant et de l'adolescent. *Diab. Metab.* **16**: 498-503 (1990).
89. Tomba, M.C., Gandolfi, S.A. y Mariani, G.: Search for an oxidative stress in human senile cataract. Hydrogen peroxide and ascorbic acid in the aqueous humor and malondialdehyde in the lens. *Lens Res.* **2**: 263-276 (1984).
90. Ohrloff, C.H. y Hockwin, O.: Superoxide dismutase (SOD) in normal and cataractous human lens. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* **222**. 79-81 (1984)
91. Bhuyan, K.C., Bhuyan, D.K. y Podos, S.M.: Lipid peroxidation in cataract of the human. *Life Sci.* **38**: 1463-1471 (1986)

92. Babizhayev, M.A. y Costa, E.B.: Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. *Biochim. Biophys. Acta* **1225**: 326-337 (1994).
93. Fecondo, J.V. y Augusteyn, R.C.: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Exp. Eye Res.* **36**: 15-23 (1983).
94. Huret, J.L., Delabar, J.M., Marthens, F., Auvias, A., Nicole, A., Berthier, M., Tanzer, J. y Sinet, P.M.: Down syndrome with duplication of a region of chromosome 21 containing the Cu-Zn superoxide dismutase gene without detectable karyotypic abnormality. *Hum. Genet.* **75**: 251-257 (1987).
95. Feaster, W.W., Kwok, L.W. y Epstein, C.J.: Dosage effects for superoxide dismutase-1 in nucleated cells aneuploid for chromosome 21. *Amer. J. Hum. Genet.* **29**: 563-570 (1977).
96. Jeziorowska, A., Jakubowski, L., Armatys, A. y Kaluzewski, B.: Superoxide dismutase (SOD-1) activity in regular trisomy 21, trisomy 21 by traslocation and mosaic trisomy 21. *Clin. Genet.* **22**: 160.164 (1982).
97. Yoshimitsu, K., Hatano, S., Kobayashi, Y., Takeota, Y., Hayashidani, M., Ueda, K., Ohama, K. y Usui, T.: A case of 21q- syndrome with half normal SOD-1 activity. *Hum. Genet.* **64**: 200-202 (1983).
98. Pellisier, M.C., Philip, N., Voelcker-Baeteman, M.A., Mattei, M.G. y Mattei, J.F.: Monosomy 21: a new case confirmed by in situ hibridation. *Hum. Genet.* **75**: 95-96 (1987).
99. Kedziora, J., Lukaszewicz, R., Sibinka, E. y Leske, J.: Down's Syndrome: decreased enhancement ratio in lymphocytes DNA. *Hereditas* **103**: 301-303 (1986).
100. Sagar, S., Kallo, I.J., Naliki, N., Ganguly, N.K. y Sharma, B.K.: Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol. Cel. Biochem.* **111**: 103-108 (1992).

101. Asayama, K., Shiki, Y., Ito, H., Hasegawa, O., Miyao, A., Hayashibe, H., Dobashi, K. y Kato, K.: Antioxidant enzymes and lipoperoxide in blood in uremic children and adolescents. *Free Rad. Biol. Med.* **9**: 105-109 (1990).
102. Schacter, L., Warth, J.A., Gordon, E.M., Prasad, A. y Klein, B.L.: Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *FASEB J.* **2**: 237-243 (1988).
103. Imadaya, A., Terasawa, K., Tosa, H., Okamoto, M. y Toriizuka, K.: Erythrocyte antioxidant enzymes are reduced in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **15**: 1628-1631 (1988).
104. Dogan, P., Soyuer, Ü. y Tanrikulu, G.: Superoxide dismutase and myeloperoxidase activity in polymorphonuclear leukocytes, and serum ceruloplasmin and copper levels, in psoriasis. *British J. Dermatol.* **120**: 239-240 (1989).
105. Liao, W., Jin, X.Y., Wang, B.H., Cui, X. S., Wang, J.L., Zhang, J. y Zhou, T.J.: Impaired blood superoxide dismutase in the traumatic paraplegic patients. *Acta Neurol. Scand.* **86**: 329-331 (1992).
106. Umeki, S., Sumi, M., Niki, Y. y Soejima, R.: Concentrations of superoxide dismutase and superoxide anion in blood of patients with respiratory infection and compromised immune systems. *Clin. Chem.* **33**: 2230-2233 (1987).
107. Jiang, X. y Chen, F.: Effect of lipid peroxides and superoxide dismutase on systemic Lupus Erythematosus: A preliminary study. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **63**: 39-44 (1992)
108. Togashi, H., Shinzawa, H., Wakabayashi, H., Nakamura, T., Yamada, N., Takahashi, T. y Ishikawa, M.: Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. *J. Hepatol.* **11**: 200-205 (1990).
109. Mavelli, I., Ciriolo, M.R., Rotilio, G., De Sole, D., Castovino, M. y Stabile, A.: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis. A

- study of Fanconi's anemia erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **106**: 286-290 (1982).
110. Sugawara, M., Kita, T., Lee, E.D., Takamatsu, J., Hagen, G.A., Kuma, K. y Medeiros-Neto, G.A.: Deficiency of superoxide dismutase in endemic goiter tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**: 1156-1161 (1988).
111. McCord, J.M., Crapo, J.D. y Fridovich, I.: Superoxide dismutase assay: A review of methodology, En "Superoxide and superoxide dismutases" Edits. Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I. pp 11-17. Academic press, New York, 1977.
112. Minami, M. and Yoshikawa, H. (1979): A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin. Chim. Acta* **92**: 337-342.
113. Jacques, P.F. y Chilack, L.T.: Antioxidant status in persons with and without senile cataract. *Arch. Ophthalmol.* **106**: 337-340 (1988).
114. Ferrer, J.V., Sastre, J., Pallardó, F.V., Asensi, V.A., Estrela, J.M., Viña, J. y Miquel, J.: Senile cataract: a review on free radical related pathogenesis and antioxidant prevention. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **13**: 51-59 (1991).
115. Miyazaki, K., Sueoka, K., Dharmarajan, A.M., Atlas, S.J., Bulkley, G.B. y Wallach, E.E.: Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J. Reprod. Fert.* **91**: 207-212 (1991).
116. Tang, Z.P.: Observation on the activity of superoxide dismutase and catalase in alveolar macrophage in patients with lung cancer. *Chung-Hua-Chien-Ho-Ho-Hu-Hai-Tsa-Chih* **14/4**: 213-215 (1991).
117. Yamanaka, N., Nishida, K. y Ota, K.: Increase of superoxide dismutase activity in various human leukemia cells. *Physiol. Chem. Physics* **11**: 253-256 (1979).

118. Shinji, O., Keiki, O., Shinjiro, M., Syunji, Y., Kazunari, Y., Yukinori, O., Tadeyoshi, T., Nobuyasu, K. and taizo, U.: Human serum immuno reactive copper, zinc superoxide dismutase assayed with an enzyme monoclonal immunosorbent in patients with digestive cancer. *Clin. Chim. Acta* **182**: 209-220 (1989).
119. Bewick, M., Coutie, W. and Tudhope, G.R.: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in the red cells of patients with malignant lymphoma. *British J. Haemat.* **65**: 347-350 (1987).
120. Li, H., Tang, X.H.y Xia, T.Q.: Relationship between free radicals and diabetic microangiopathy. *Chung-Hua-Nei-Ko-Tsa-Chin* **30**: 402-405 (1991).