

BIBLIOTECA UCM



5306063091

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Efecto de la restricción calórica y de hidratos de carbono sobre las enzimas antioxidantes en el hígado y el riñón de ratón"

VºBº

El director

Gustavo Barja de Quiroga

Mª Caridad Rojas Manzanares

R. 22.205



Memoria presentada por Mª Caridad Rojas Manzanares para obtener el Grado de Licenciada en Ciencias Biológicas.

Madrid, Noviembre de 1992

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Gustavo Barja de Quiroga.

A mi familia

Hay muchas personas a las que quiero agradecer su apoyo y ayuda durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Gustavo Barja de Quiroga por su constante ayuda en la realización de esta tesina. He aprendido muchas cosas trabajando durante este tiempo a su lado y espero seguir aprendiendo en futuros trabajos.

A la Dra. Mercedes Alonso Bedate y la Dra. Mónica de la Fuente del Rey, directoras de departamento desde mi incorporación, su interés por esta tesina.

A Rosa y Susana quiero agradecerles todos esos momentos tan agradables que hemos pasado durante la realización de esta tesina, haciendo que el trabajo duro y el cansancio fueran siempre llevaderos. No podía haber tenido mejores compañeras.

A Mónica y de nuevo a Rosa, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y por demostrarme su amistad en todo momento.

Al resto del departamento que ha estado cerca de mí durante todo este tiempo, Angel Luis, Nuria, M^a Jesús, Ana, Begoña, Dolores, M^a Paz, Alberto, Rosi, Manuel, Sol y Paco, quiero agradeceros vuestra amistad y ayuda y el hacer que exista ese ambiente tan agradable entre nosotros.

A Gustavo por las "horas extras" de trabajo y esfuerzo que has empleado en ayudarme, a veces incluso sacando tiempo de donde no lo había; por anteponer casi siempre mis deseos a los tuyos y sobre todo por quererme.

Gracias muy especiales a mi familia, a mi padre, a mi hermano en particular por su ayuda "informática" dejando que le "robara" su ordenador y a mi tía por saber ser mi madre y darme todo su cariño sin pedir nada a cambio.

ABREVIATURAS

CAT	Catalasa
C	Control
COX	Citocromo oxidasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
R	Restricción calórica global
RH	Restricción en hidratos de carbono
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Acido 2-tiobarbitúrico

INTRODUCCION	1
I. ENVEJECIMIENTO	3
II. RESTRICCION CALORICA	11
1.- Aspectos generales	11
2.- Efectos de la restricción calórica	13
3.- Mecanismos de acción de la restricción calórica	16
A.- Mecanismo de acción a través de un nutriente específico	16
B.- Tasa metabólica	18
C.- Regulación endocrina	18
D.- Teoría de la glucosilación	19
E.- Teoría de los radicales libres	19
III. TOXICIDAD DEL OXIGENO	20
1.- El oxígeno en la Tierra	20
2.- Los organismos aerobios y el oxígeno	20
3.- Mecanismos de toxicidad del oxígeno	23
A.- Inactivación de enzimas	23
B.- Generación de radicales libres	24
a) Formación y propiedades del peróxido de hidrógeno	27
b) Formación y propiedades del radical superóxido	29
c) Formación y propiedades del radical hidroxilo	31

Indice

IV. PEROXIDACION DE MACROMOLECULAS	32
1.- Peroxidación lipídica	32
2.- Daño oxidativo a DNA	36
3.- Daño oxidativo a proteínas	39
V. DEFENSAS ANTIOXIDANTES	43
1.- Antioxidantes enzimáticos	44
A.- Superóxido dismutasa	44
B.- Catalasa	47
C.- Glutación peroxidasa	49
D.- Glutación reductasa	51
2.- Antioxidantes no enzimáticos	52
A.- Glutación	52
B.- Acido Ascórbico	53
C.- Acido úrico	55
D.- Alfa- Tocoferol	55
E.- Carotenoides	56
OBJETIVOS	58
MATERIAL Y METODOS	62
I. MATERIAL	63
1.- Equipo instrumental	63
2.- Productos químicos	64
3.- Animales de experimentación	65

Indice

II. DISEÑO EXPERIMENTAL	66
1.- Grupos experimentales	66
2.- Método de trabajo en la realización de la restricción calórica	66
3.- Dietas	68
III. METODOS ANALITICOS	69
1.- Preparación de muestras	69
2.- Medidas enzimáticas	71
A.- Medida de la actividad superóxido dismutasa	71
B.- Medida de la actividad catalasa	73
C.- Medida de la actividad glutatión peroxidasa	75
D.- Medida de la actividad glutatión reductasa	77
E.- Medida de la actividad citocromo oxidasa	79
3.- Valoración de proteínas	81
4.- Métodos estadísticos	83
RESULTADOS	84
I. PESO DE LA INGESTA	85
II. PESO DE ANIMALES	85
1.- Estudio longitudinal	85
2.- Estudio transversal	86
III. ACTIVIDADES ENZIMATICAS	91
1.- HIGADO	91
A.- Superóxido dismutasa	91

Indice

B.- Catalasa	91
C.- Glutación peroxidasa	91
D.- Glutación reductasa	98
E.- Citocromo oxidasa	98
2.-RIÑON	103
A.- Superóxido dismutasa	103
B.- Catalasa	103
C.- Glutación peroxidasa	103
D.- Glutación reductasa	103
E.- Citocromo oxidasa	112
DISCUSION	115
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFIA	126

INTRODUCCION

I. EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso muy familiar para todos nosotros, lo vivimos día a día observándolo en los seres vivos que nos rodean y aunque nos pese también en nosotros mismos. Sin embargo, a pesar de ser un fenómeno tan familiar, todavía no están claros los mecanismos biológicos por los cuales envejecemos, o por qué unas personas envejecen más rápido que otras e incluso porque existen especies muy longevas como es el caso del hombre y sin embargo hay otras especies con períodos de vida muy cortos.

El fin de la vida individual es esencial para la evolución. Esta es la idea que subyace en la primera teoría evolucionista sobre el envejecimiento, la cual fue sugerida por Weissman hace más de 100 años. En esta teoría, el envejecimiento era considerado necesario para que los individuos murieran y así evitar que los organismos compitieran con sus progenitores por la comida y el espacio. La selección natural podría utilizar un gran rango de opciones y combinaciones de procesos que garantizarían el fin de las vidas individuales.

La selección natural no actuaría en el hombre de la misma manera que en el resto de animales pues no estamos sometidos a los peligros que suponen una vida salvaje y el progreso y los avances en ciencia y medicina han conseguido aumentar en los últimos años la esperanza de vida, aunque si bien es cierto que la longevidad máxima continua invariable y es exactamente la misma para los individuos africanos de hace 50.000 años que para la población humana actual, la diferencia es únicamente un aumento en el porcentaje de supervivencia (fig 1.1).

La longevidad máxima se entiende como la edad máxima alcanzada por los individuos de una especie, algunos autores usan el último 10% de una población. La longevidad máxima es un valor constante y característico de cada especie. La longevidad máxima (MLSP) se ha usado como estimador indirecto de la tasa de envejecimiento en mamíferos (Cutler, 1986).

La tasa de envejecimiento se define como la tasa media de declive desde el máximo de su capacidad de un gran número de diferente funciones fisiológicas (Cutler, 1986).

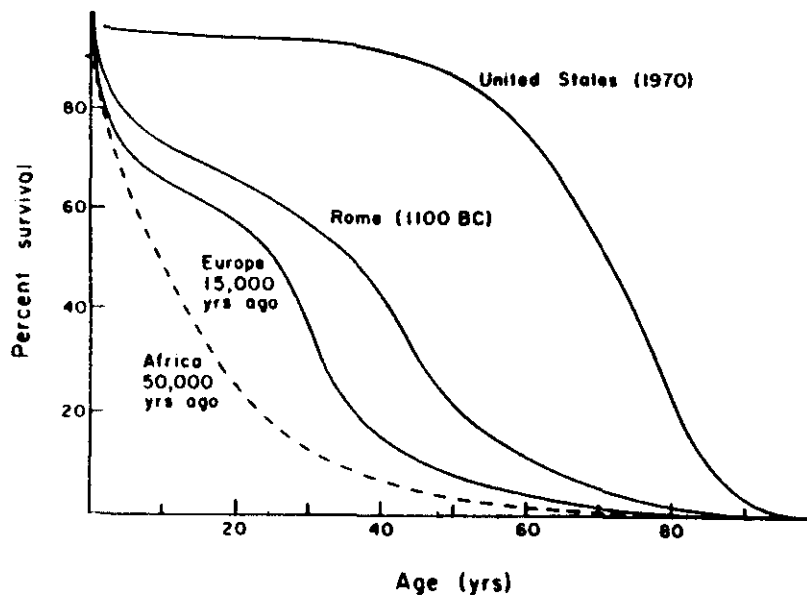


Fig 1.1.- Curvas de supervivencia de humanos bajo diferentes condiciones ambientales. Se observa diferente vida media pero constante vida máxima en los cuatro tipos de curva. (Cutler, 1984).

La longevidad se modifica por factores como la temperatura: los animales poiquiloterms como insectos y reptiles viven más tiempo a bajas temperaturas. Por ejemplo, *Drosophila* tiene una vida media de 120 días a 10°C pero sólo de 14 días a 30°C. Esto parece ser debido a que el aumento de temperatura afecta aumentando la actividad metabólica y el consumo de oxígeno. De hecho, hay evidencias de la correlación inversa entre la tasa metabólica específica de los animales y su longevidad, por lo que en general animales grandes consumen menos oxígeno por unidad de masa corporal que los pequeños y además viven más que éstos (Rubner, 1908; Pearl, 1928).

Los insectos consumen mucho más oxígeno mientras vuelan que cuando están en reposo. En relación con la tasa metabólica y longevidad R. S. Sohal (Sohal y Allen, 1986) estudió las curvas de supervivencia de *Musca domestica* y observó que cuando se les limitaba el ejercicio se producía un incremento de longevidad respecto a las

que volaban libremente, y esto era más agudo cuanto más privadas de movimiento estaban las moscas (fig 1.2), aunque el diseño experimental utilizado ha sido fuertemente criticado.

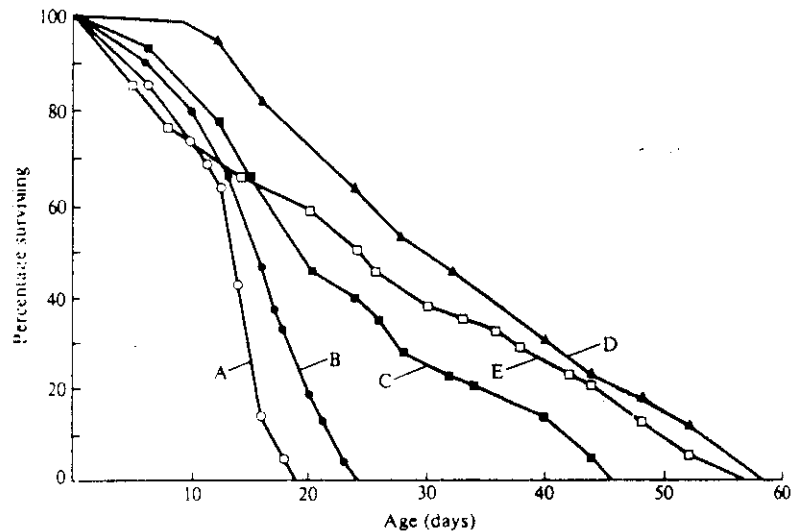


Fig 1.2.- Efecto de la actividad en la longevidad de *Musca domestica*.

Las letras representan grados distintos de actividad, siendo A el mayor grado de actividad y D el menor. (Sohal y Allen, 1986).

La longevidad media como hemos visto es un valor que se puede modificar por muchos factores, en el hombre se ha conseguido por los progresos en medicina, higiene etc., pero sin embargo la longevidad máxima es invariable. La única manipulación que ha conseguido aumentar la longevidad máxima ha sido la restricción calórica siempre que se iniciara, según algunos autores, durante la fase temprana de crecimiento. Cualquier teoría de envejecimiento que se proponga ha de tener en cuenta y explicar las diferencias de longevidad máxima entre las distintas especies tanto como su valor constante dentro de cada especie.

Se han propuesto ya más de 300 teorías sobre el envejecimiento y el número continua aumentando. Esto es el resultado de los rápidos progresos en el conocimiento del fenómeno biológico y a la aplicación de nuevas técnicas y métodos a la investigación sobre el envejecimiento. Aunque muchas teorías están basadas en una causa única, es de consenso bastante general que el envejecimiento es un fenómeno multicasual, y hablar de una única causa de envejecimiento sería un enfoque muy reduccionista de un fenómeno

tan complejo. Es por ello que muchas de las teorías pueden coexistir porque no se contradicen, o porque intentan explicar diferentes formas de envejecimiento (Medvedev, 1990).

La clasificación de una manera racional de las teorías de envejecimiento es una tarea difícil. Se pueden ver agrupadas estas teorías en la bibliografía de muchas maneras pero la clasificación más actual sería la que separa a las teorías en dos grupos principales: teorías de envejecimiento programado y teorías de acumulación de errores.

Las teorías de envejecimiento programado proponen la existencia de una secuencia de sucesos codificados por el genoma que conducirían al envejecimiento. Una de las evidencias que apoyan este tipo de control genético sería el caso de salmones como *Oncorhynchus nerka kennerlyi*, cuyo ciclo de vida finaliza cuando realiza la migración para desovar, y en las semanas siguientes al desove este salmón muere. Parece ser que todas las variaciones morfológicas y fisiológicas degenerativas que acontecen en estos salmones están bajo control hormonal, la castración de salmones inmaduros retrasa marcadamente estos cambios degenerativos.

La progeria humana (Síndrome de Hutchison-Gilford y síndrome de Werner) también proporciona evidencias de que pocos genes pueden tener importantes efectos sobre el envejecimiento. Sin embargo, esos síndromes de envejecimiento prematuro con una base genética clara, no muestran muchas de las características del envejecimiento normal y por ello no pueden ser considerados como envejecimiento acelerado.

Una cuestión a tener en cuenta es que los animales salvajes rara vez llegan a ser viejos, y normalmente mueren en la época juvenil. Así la naturaleza es poco probable que haya favorecido el desarrollo del envejecimiento genéticamente programado. En el hombre aunque en la actualidad la esperanza de vida esté en 75 años, en tiempos prehistóricos era de 18 años, por lo que estaríamos en el mismo caso que el resto de los animales.

Existe una correlación positiva de la eficiencia en reparar el DNA y la

longevidad alcanzada en cada especie. Por estas observaciones se ha pensado en la existencia de "genes determinantes de longevidad", idea desarrollada por Cutler. Apoyándose en la teoría de radicales libres éstos serían genes que codificarían, entre otras, para enzimas antioxidantes. Cutler sugirió que cambios en la regulación genética *permitirían tener concentraciones más altas de antioxidantes en los individuos más longevos*. Las diferencias entre especies en lo que se refiere a su longevidad máxima no se deberían a la existencia de genes distintos sino a la extensión con que estos genes son expresados. Así, lo que variaría serían los genes reguladores no los genes estructurales. La longevidad máxima según Cutler sería un reflejo de las características genéticas de una especie para contrarrestar su procesos de envejecimiento intrínseco.

Las teorías de acumulación de errores se basan en la idea de que se produce menor reparación y mantenimiento del requerido para la supervivencia indefinida del individuo.

La teoría de error catastrófico es una de estas teorías encuadradas como de acumulación de errores. Fue introducida por Orgel en 1963. Propone que los errores en la transcripción de RNA y su traducción en proteínas conducirían a la acumulación de proteínas alteradas no funcionales con la edad de las células. La acumulación de estas proteínas llevaría al final a un error catastrófico que conduciría a un funcionamiento anormal, una pérdida de homeostasis y a la muerte celular. Otro factor que podría estar implicado sería el mecanismo proteolítico, encargado de degradar proteínas anormales, que podría disminuir también con la edad. Sin embargo y en contra de esta teoría no hay evidencia de que exista *acumulación de proteínas anormales en la mayoría de los tejidos de animales viejos*.

La teoría de radicales libres y el envejecimiento fue propuesta por Harman en 1956. Propuso que la causa básica del envejecimiento a nivel celular sería el ataque continuo a las macromoléculas (DNA, lípidos, proteínas) debido a la presencia de radicales libres. Los radicales libres de oxígeno son producidos durante el metabolismo normal en la cadena de transporte mitocondrial. En la vía univalente de reducción del oxígeno hasta H₂O se forman intermediarios incompletamente reducidos como son O₂^{•-} (radical

superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrógeno, que no es radical pero puede generarlos) y $\cdot OH$ (radical hidroxilo). En el flujo normal de esta cadena se producirían "escapes" y así la utilización de oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales.

Los organismos disponen de defensas antioxidantes que contrarrestan este daño producido por radicales pero su eficiencia no es del 100% por lo que a lo largo de su vida el individuo está siendo atacado continuamente por estos radicales de oxígeno y así éstos jugarían un papel importante en el proceso de envejecimiento.

Se sabe que existe una correlación negativa entre la tasa metabólica específica y la longevidad máxima entre las distintas especies de mamíferos (Rubner, 1908; Pearl, 1928). Esto podría interpretarse desde el punto de vista de la teoría de los radicales libres y el envejecimiento. Se sabe que en muchas especies de mamíferos el producto de longevidad máxima y tasa metabólica específica tiene un valor constante (Rubner, 1908; Pearl, 1928), denominado potencial energético vital (LEP) (Cutler, 1986) (fig 1.3).

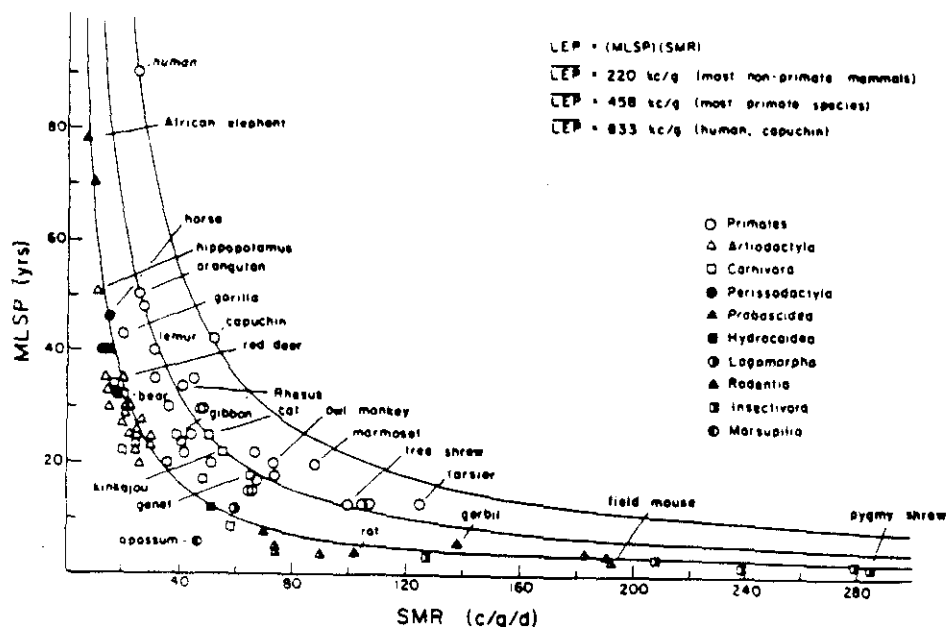


Fig 1.3.- Correlación entre longevidad máxima (MLSP) y tasa metabólica (SMR) de varias especies de mamíferos. Potencial energético vital de las distintas especies (LEP). (Cutler, 1986).

Este valor nos da una idea de la capacidad metabólica, en humanos este valor es extraordinariamente alto.

Sohal también realizó estudios sobre las relaciones entre la tasa metabólica y el envejecimiento en *Musca domestica*. Como ya se citó anteriormente, aquello que hacía que aumentara la tasa metabólica (ejercicio, temperatura) se traducía en una disminución de la longevidad (Sohal y Allen, 1986).

El aumento de la tasa metabólica, se traduce en un incremento del consumo de oxígeno. Así el flujo de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial aumentaría y la generación de radicales libres sería mayor. No se trata de que la mitocondria sea más ineficaz, sino simplemente de que al haber más flujo hay más fugas. Por ello y basándonos en la teoría del daño producido por radicales libres, los animales con tasa metabólicas más altas tendrían menor longevidad por estar más expuestos al daño por radicales.

Según lo explicado previamente el efecto de los radicales libres de oxígeno ha de ser contrarrestado o reducido de alguna forma. Según Cutler estos mecanismos de "antienvjecimiento" estarían codificados por los "genes determinantes de longevidad", nombrados anteriormente. Cutler señala que el envejecimiento sería el resultado de procesos de desdiferenciación celular y el papel principal de los genes determinantes de longevidad sería estabilizar la propia diferenciación de las células. Los radicales libres podrían alterar el estado de diferenciación de las células y los antioxidantes endógenos (productos directos o indirectos de estos genes) protegerían contra estos efectos, estos antioxidantes serían enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) etc. o antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico entre otros, (Cutler, 1986).

Cutler denomina a estos antioxidantes "potenciales determinantes de longevidad" siempre que correlacione positivamente su concentración entre la tasa metabólica frente a la longevidad máxima. Este autor obtiene una serie de correlaciones positivas como son para la SOD, carotenoides, alfa-tocoferol, ácido úrico, no obtiene correlaciones con ascorbato y retinol, y correlaciones negativas con catalasa, glutatión

(GSH) y glutatión peroxidasa (GPx). Con respecto a estos valores hay que tener en cuenta que se refieren a concentración del antioxidante dividido por la tasa metabólica. Si lo hacemos sin dividir entre la tasa metabólica, las correlaciones positivas, que son las que favorecerían esta teoría, no se dan. Respecto a esta última consideración trabajos recientes realizados por el grupo de investigación al que pertenezco, utilizando 8 especies de vertebrados han mostrado que la correlación entre antioxidantes y longevidad máxima es esencialmente de carácter negativo.

En estudios descriptivos sobre envejecimiento de autores como Sohal y Allen (Sohal *et al.*, 1983; Sohal y Allen, 1986) realizados en *Musca domestica* se observa que los sistemas antioxidantes (SOD, CAT, GSH, vitamina E) tenderían a disminuir durante el envejecimiento, mientras que el daño inducido por radicales libres (sustancias TBA -ácido tiobarbitúrico- positivas, n-pentano, GSSG, peróxidos inorgánicos) parece aumentar con la edad (fig 1.4).

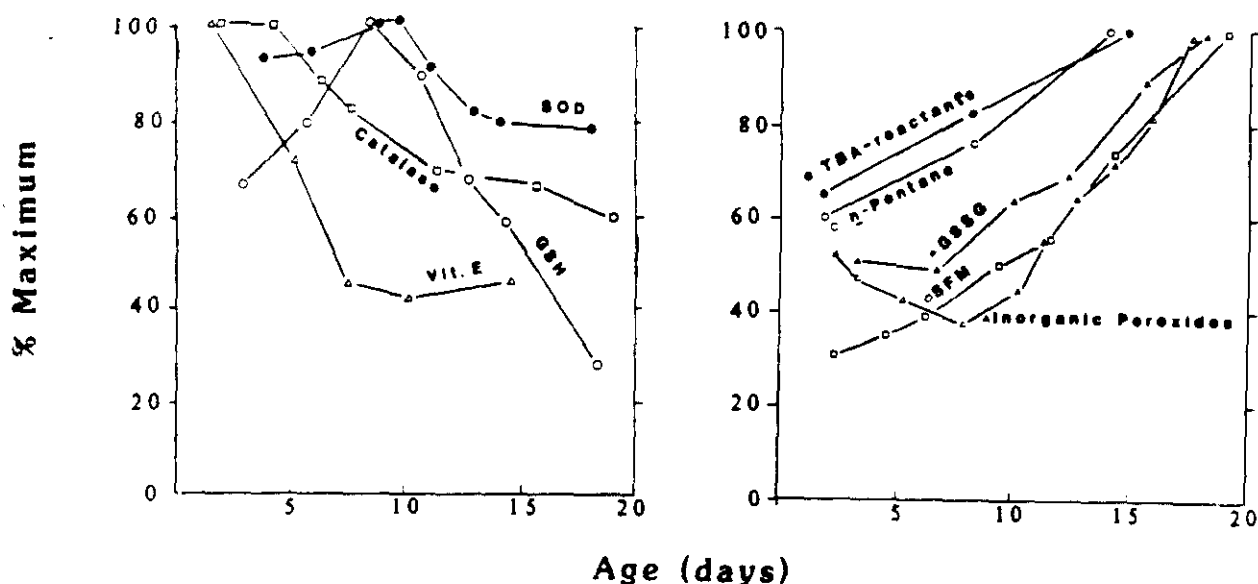


Fig 1.4.- Cambios asociados con la edad en las defensas antioxidantes (a) y en la concentración de distintos productos de reacciones de radicales libres (b) en machos de *Musca domestica*. (Sohal y Allen, 1986).

En trabajos recientes realizados por Sohal en *Drosophila* (Sohal *et al.*, 1990) y trabajos realizados en mamíferos recientemente por mi grupo de investigación se observa que los descensos de antioxidantes con la edad no son tan evidentes. También se ha descrito correlación entre longevidad máxima y generación de radicales de oxígeno por parte de mitocondrias *in vitro*.

Miquel, en relación con la teoría de los radicales libres y envejecimiento, da un papel central a la mitocondria, afirmando que el envejecimiento celular está asociado a lesiones del genoma mitocondrial por los radicales libres que se forman, como ya hemos descrito, en la membrana interna de estos orgánulos. Según esta hipótesis las células fijas post-mitóticas sufren un "envejecimiento mitocondrial" debido al intenso metabolismo aerobio. Por el contrario, las células que se replican rápidamente no sufren este ataque pues tienen una menor utilización de oxígeno (Miquel *et al.*, 1980).

La lipofucsina es uno de los pocos marcadores del envejecimiento tisular de carácter universal. La primera descripción de pigmentos intracelulares conocidos como lipofucsina fue hecha por Hannover en 1842 cuando descubrió su presencia en neuronas. Se acumula en cantidades que se incrementan con la edad aumentando tanto el número de gránulos como el tamaño de estos. En apoyo con la teoría de los radicales se sabe que los tejidos metabólicamente más activos tienen mayor deposición de lipofucsina. En *Musca domestica*, por ejemplo, la lipofucsina contenida en el músculo aumenta con el ejercicio. Además las moscas más activas acumulan el pigmento más rápidamente y viven durante menos tiempo. Este pigmento se acumula normalmente en neuronas y músculo cardíaco debido a su incapacidad para dividirse. En otros tejidos el recambio normal de las células puede eliminar la lipofucsina. La deposición de lipofucsina no es un proceso irreversible, pues la centrophenoquina disminuye el número de gránulos en el sistema nervioso central. En trabajos recientes realizados por nuestro grupo de investigación hemos observado que cuando se inducía la capacidad antioxidante debido al tratamiento con 3-amino-1,2,4 triazol (inhibidor de catalasa) disminuía en ranas viejas la deposición de lipofucsina en neuronas, respecto a ranas viejas no tratadas. Hoy se acepta que la lipofucsina no produce daño a la célula y representa la acumulación de material de desecho no eliminable, aunque es cierto que en algunos casos ocupa bastante, el 28% del volumen

intracelular en neuronas rata de 28 meses y en centenarios humanos hasta el 75%.

Como conclusión podríamos decir que no está muy clara la implicación de los radicales libres en relación con el envejecimiento, aunque lo que sí parece estar claro es que éstos no serían la única causa del fenómeno del envejecimiento.

II. RESTRICCIÓN CALORICA

1.- Aspectos generales

La única estrategia reconocida entre los gerontólogos como capaz de actuar aumentando la vida máxima y retardar los procesos del envejecimiento en los animales, es la restricción calórica. Como se puede observar en la figura 2.1, la restricción calórica aumenta tanto la vida media como la máxima, hasta incluso el 50%.

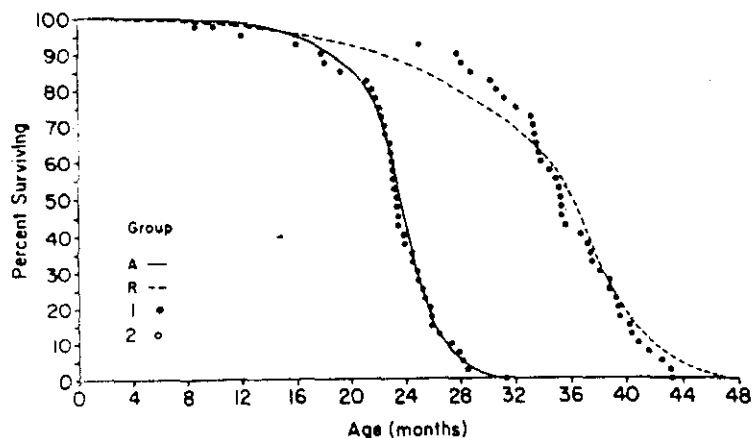


Fig 2.1.- Curvas de supervivencia de ratas macho F344, alimentadas *ad libitum* (A ó 1) o restringidas, las cuales comían el 60% de la ingesta de las *ad libitum* (R ó 2) (Masoro E. J., 1992).

Hay que tener en cuenta que la restricción calórica, normalmente del 30% ó 40%, se debe entender como una reducción de la ingesta de calorías, pero sin que esto

vaya acompañado de una menor ingesta de otros nutrientes esenciales como son las vitaminas y minerales, es decir, debe haber "restricción sin malnutrición".

En los años 30, Clive McCay y colaboradores (McCay *et al.*, 1935) restringieron la ingesta a ratas, empezando dicha restricción en el período de destete. Estos investigadores encontraron que estas ratas sobrevivían durante el primer año de vida mucho más que aquellas ratas que se le permitió comer cuanto querían (*ad libitum*). La hipótesis de este grupo era que el envejecimiento ocurría sólo después de que el crecimiento y el desarrollo hubieran finalizado, por consiguiente, el fenómeno del envejecimiento puede ser prevenido mediante la restricción calórica debido a que se producía una disminución en la tasa de crecimiento y desarrollo.

Este importante hallazgo de McCay, apenas fue continuado por nuevas investigaciones en este campo hasta 30 años después. Los pocos trabajos realizados en este período mostraban que la restricción calórica retardaba la aparición y la progresión de neoplasias y otras enfermedades asociadas con la edad.

En los primeros años de la década de los 70 se revivió de nuevo el interés por la restricción calórica. Se vio que su efecto en la extensión de la vida, es un fenómeno que ocurre en una gran variedad de cepas de ratas y ratones de ambos sexos y dentro de una gran variedad de condiciones experimentales; también se ha visto que este efecto se da también en moscas, peces, y actualmente el grupo de Donald K. Ingram (Ingram *et al.*, 1990) está realizando este tipo de estudios en primates.

La idea inicial propuesta por McCay *et al.* en 1935, en la que se afirmaba que el efecto sobre la extensión de la vida debido a la restricción calórica era debido a un retraso en el crecimiento y desarrollo ha sido desplazada, según algunos, por trabajos en los que se inició la restricción calórica tanto en la etapa de destete como en la etapa de adulto, (fig 2.2) en varias cepas de ratas y ratones; en estos trabajos la vida media y la máxima aumentaron en prácticamente la misma extensión en los dos grupos (recién destetados y adultos) con respecto al grupo *ad libitum* (Weindruch *et al.*, 1982; Masoro *et al.*, 1991). La idea que subyace a estos últimos experimentos es que la restricción

calórica actuaría modulando los procesos primarios del envejecimiento, más que a un retraso en el desarrollo. Sin embargo, muchos autores describen un efecto mucho mayor de la restricción calórica cuando ésta se inicia durante el desarrollo.

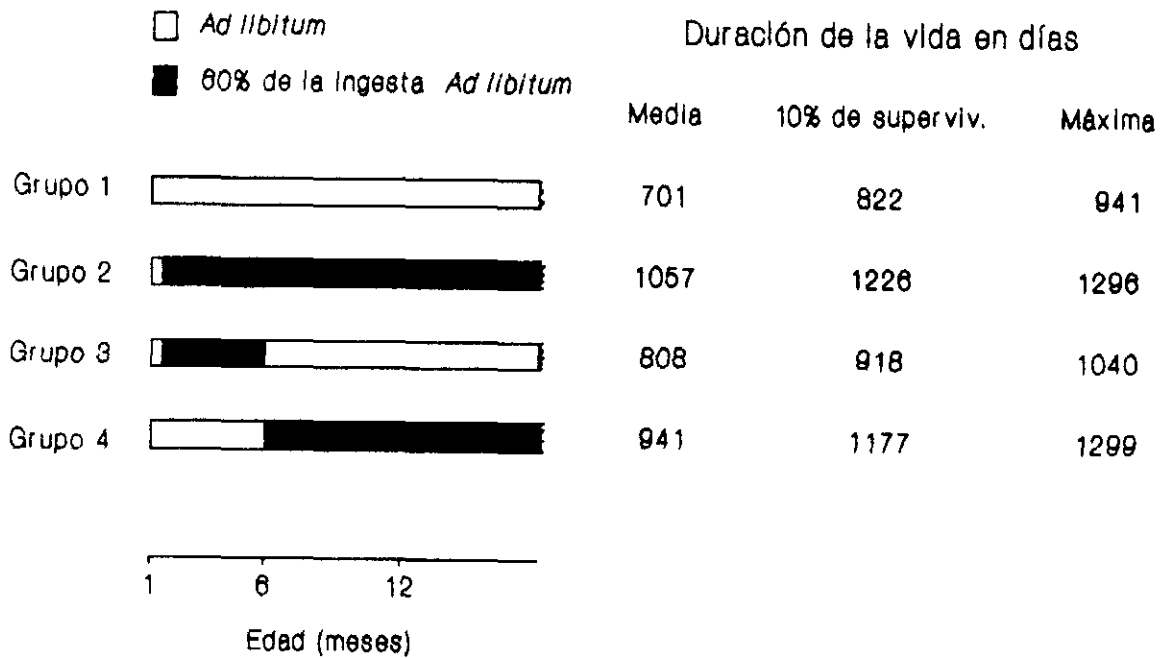


Fig 2.2.- Influencia del tiempo de iniciación y duración de la restricción calórica sobre la longevidad. (Masoro *et al.*, 1991).

2.- Efectos de la restricción calórica

Como ya se vió en experimentos aislados entre los años 30 y 70 se ha observado que la restricción calórica no sólo alarga la duración de la vida, sino que retarda los cambios con la edad que se producen en la mayoría de los procesos fisiológicos y produce importantes efectos retardando también la mayoría de las enfermedades asociadas con el envejecimiento. Entre otros, los efectos de la restricción calórica son:

- disminuye el incremento de colesterol en sangre con la edad (Masoro E. J. 1992).

- se ha comprobado que ratas viejas restringidas (machos CD-COBS) tienen un comportamiento y una memoria similar a las ratas jóvenes (Pitsikas N. *et al.*, 1991).

- el sistema inmune se ve activado en el grupo de restringidos respecto al grupo *ad libitum*, disminuyendo los efectos de la edad (Gilman-Sachs *et al.*, 1991).

- la tasa de síntesis de proteínas muestra un declive durante el envejecimiento, siendo esto un cambio molecular reconocido ampliamente. La restricción calórica incrementa la tasa de síntesis de proteínas en el hígado y el riñón durante el envejecimiento, respecto a los animales alimentados *ad libitum*. En ambos grupos disminuye la síntesis de proteínas durante el envejecimiento pero esto fue de un 35% a un 45% más alta en los animales restringidos (Rattan S.I.S., 1991). Se ha comprobado igualmente que aumenta la degradación y por lo tanto el turnover de proteínas es mayor en animales restringidos que en animales *ad libitum* (Lewis *et al.*, 1985).

- en ratas Fischer 344 las principales enfermedades asociadas al envejecimiento son nefropatías y cardiomiopatías; se ha visto que la restricción calórica influye en estos dos procesos. Se examinaron las ratas en el momento de su muerte espontánea y se vió que el 68% de las ratas *ad libitum* tenían nefropatías de grado 4 (la severidad se midió en grados de 0 a 4) frente a las restringidas que sólo exhibían grado 4 en un 1%. Estos resultados son todavía más importantes si se tiene que cuenta que las ratas restringidas eran mucho más viejas. En el caso de las cardiomiopatías en el momento de la muerte el 19% del grupo *ad libitum* tenía lesiones de grado 3 (0 a 3) mientras que los restringidos con este grado de daño eran sólo 6%. Se valoró también el grado de lesiones sacrificando animales a distintas edades tanto a los animales restringidos como al grupo *ad libitum*, analizando tanto riñones como corazón histológicamente. Los resultados (fig 2.3) mostraron que el aumento en la severidad en las lesiones con la edad era significativamente mayor en las ratas *ad libitum* que en las ratas restringidas.

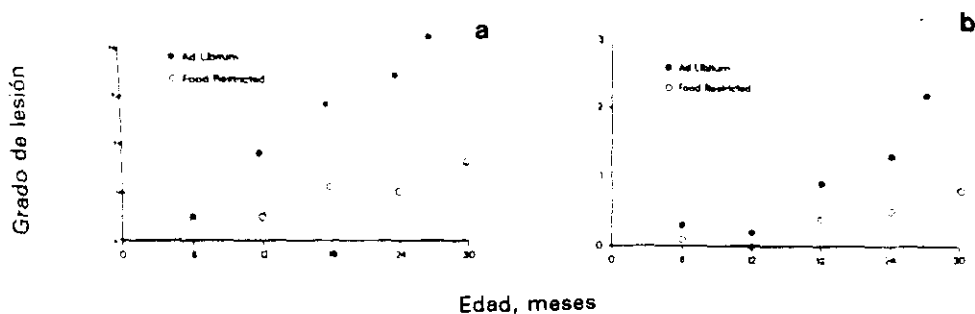


Fig 2.3.- Severidad de las nefropatías (a) y cardiomiopatías con la edad en ratas *ad libitum* y restringidas.

- disminuye la incidencia de tumores (fig 2.4), ya sean espontáneos o inducidos, a la vez que retrasa su aparición (Weindruch, 1989). La restricción calórica lograría esto actuando a nivel de la **iniciación** al ingerir menos carcinógenos, o reparando mejor el DNA (ya que se ha comprobado que la restricción retarda el declive con la edad de la eficacia en la reparación del DNA) (Weraachakul *et al.*, 1989); o actuando a nivel de la **promoción** debido a una mayor respuesta inmune (Gilman-Sachs *et al.*, 1991), o a una falta de energía para el crecimiento de tumores o a menores niveles celulares de especies activas del oxígeno (Weindruch, 1989).

5306653094

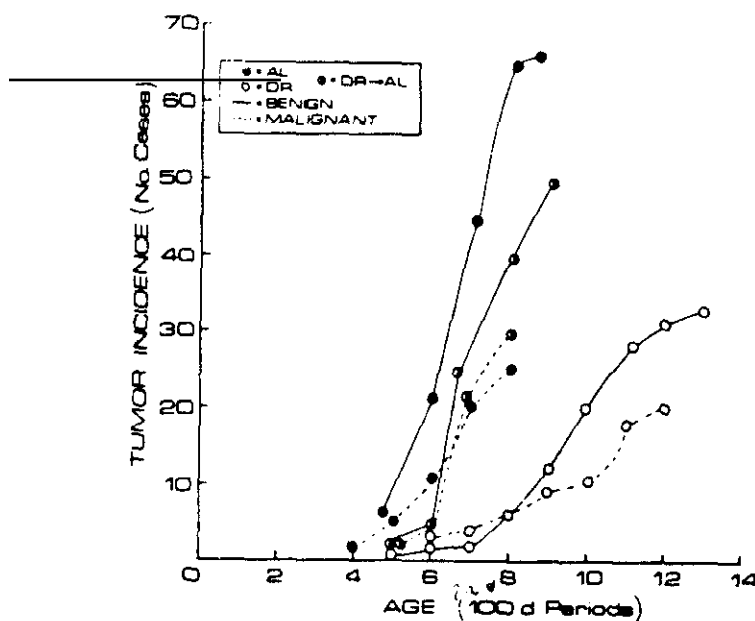


Fig 2.4.- Incidencia de tumores en ratas Sprague-Dawley alimentadas *ad libitum*: AL; restringidos desde el destete (21 días) hasta su muerte: DR; restringidos desde el destete hasta los 70 días de edad: DR→AL.

3.- Mecanismos de acción de la restricción calórica

Todas estas acciones de la restricción calórica sobre la longevidad, fisiología y patología nos proporciona una fuerte evidencia de que la restricción calórica retardaría los procesos primarios del envejecimiento. Sin embargo, lo difícil de averiguar es cuáles son esos procesos primarios del envejecimiento y como realmente actúa la restricción calórica sobre ellos. Si bien de ella se conocen muchos de sus efectos, no se sabe sin embargo cuales son los mecanismos de acción de este fenómeno.

A.- Mecanismo de acción a través de un nutriente específico.

Uno de los planteamiento sobre como actúa la restricción calórica ha sido *el pensar que sus efectos eran debidos a la restricción de un nutriente específico. La base de esta idea está en que los distintos elementos energéticos tienen una acción potencialmente dañina.*

*Así la glucosa, como sabemos reacciona de manera no enzimática con los grupos amino de proteínas y ácidos nucleicos que en último término conducen a cambios irreversibles en esta macromoléculas; además la glucosa ha sido considerada como mediador de los procesos del envejecimiento y de hecho algunas consecuencias a largo plazo de la diabetes son similares a los deterioros observados durante el envejecimiento normal. Entre los efectos de la restricción calórica se encuentra el descenso en los niveles plasmáticos de glucosa, aunque si bien la utilización de glucosa en ambos grupos, *ad libitum* y restringidos, es la misma (Masoro y McCarter, 1991).*

Las grasas también podrían actuar en este sentido pues se sabe que determinados niveles de triglicéridos en plasma y de VLDL, constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de arteriosclerosis. Además las moléculas de ácidos grasos, no unidas a albúmina, son un potencial factor de daño pues a pH fisiológico están en forma aniónica y pueden actuar como detergentes dañando moléculas y estructuras supramoleculares (Masoro y McCarter, 1991).

Las proteínas también tienen un efecto dañino intrínseco; se sabe que el ácido glutámico y aspártico son neuroexcitotóxicos debido a la excesiva excitación neuronal resultado de la acción de estos aminoácidos con receptores específicos. Esto puede ocurrir durante un período extenso de tiempo y ha sido relacionado con enfermedades neurovegetativas como el Alzheimer. Los estudios de Yu *et al.* (Yu *et al.*, 1985), dieron lugar a la observación de que la restricción de proteínas en ratas sin restricción calórica aumentaba la longevidad; esto posiblemente sea debido a una disminución en las nefropatías. Sin embargo, la restricción calórica con o sin restricción de proteínas previene la incidencia de nefropatía severa y es probable por esta razón que el nivel de ingesta de proteína tenga un efecto pequeño sobre la longevidad de la ratas restringidas.

% de restricción de calorías	% de restricción de proteínas	vida media (días)	10% de superviv.	vida max. (días)
0	0	701	822	941
0	40	810	935	969
40	0	956	1158	1295
40	40	936	1121	1275

Tabla 2.1.- Influencia de la restricción calórica, restricción de proteína y de restricción de proteínas y calorías sobre la longevidad. (Yu *et al.*, 1985; Masoro *et al.*, 1991).

Los trabajos realizados por Masoro *et al.* hasta la fecha no han indicado que haya un específico nutriente mediante el cual actúe la restricción calórica, sino más bien que es la restricción de la energía ingerida la que ejercería este papel.

B.- Tasa metabólica

Basándose en el trabajo de Rubner (Rubner, 1908) y Pearl (Pearl, 1928) se postulo que la tasa de envejecimiento está inversamente relacionada con la tasa metabólica. Extendiendo este concepto, Sacher (Sacher, 1977) propuso que la restricción calórica producía un incremento en la longevidad al disminuir la tasa metabólica.

Sin embargo, trabajos realizados por McCarter *et al*, no están de acuerdo con las ideas de Sacher. Este grupo realizó medidas del consumo de oxígeno, en ratas machos Fischer 344, tanto en los animales alimentados *ad libitum*, como en los animales restringidos. Estas medidas fueron realizadas meticulosamente, durante períodos de 24 horas en las condiciones de vida normal del animal. Inicialmente, la restricción calórica producía una disminución en el gasto energético por unidad de masa corporal (sin considerar la grasa corporal) pero a las seis semanas del comienzo de la restricción los animales restringidos y los *ad libitum* tenían tasas de consumo de oxígeno similares por unidad de masa corporal (sin grasa) (McCarter *et al.*, 1985). Según esto, los efectos de la restricción calórica no serían debidos a una reducción en la intensidad del metabolismo.

C.- Regulación neuroendocrina.

Se piensa que la reducción en la ingesta de energía podría retardar los procesos de envejecimiento no por influir en la tasa de utilización de compuestos energéticos, sino modulando las características de este uso. Además, la disminución en la ingesta de energía tiene que estar emparejada a la regulación de las características de la utilización de los compuestos energéticos por los sistemas neurales o endocrinos. Los candidatos más probables en el desarrollo de acoplamiento son los glucocorticoides, el sistema insulina-glucosa, la hormonas tiroideas y el sistema nervioso simpático.

D.- Teoría de la glucosilación.

Cerami en 1985 (Cerami,1985) propuso que la glucosa podría servir como un mediador del envejecimiento, lo que podría apuntar a otro posible mecanismo de la restricción calórica. Según este autor la glucosilación no enzimática de proteínas y ácidos nucleicos por la glucosa, al formar los productos Amadori y AGE, puede ser la base de muchos aspectos del envejecimiento. Se ha visto que los animales restringidos tienen unos niveles de glucosa plasmática aproximadamente 15 mg/dl por debajo de los niveles de las ratas *ad libitum*. A su vez los niveles de insulina son mantenidos en una tercera parte o incluso la mitad de los presente en las ratas *ad libitum*. También se ha encontrado que el porcentaje de glucosilación de hemoglobina tiene niveles significativamente más bajos en animales restringidos que los alimentados *ad libitum*. (Masoro *et al.*, 1989). Este efecto podía ser la clave de la acción antienvjecimiento de la restricción calórica ya que permite el uso efectivo de un componente energético importante pero potencialmente tóxico, manteniéndolo a concentraciones más bajas y por lo tanto menos dañinas (Masoro *et al.*, 1991).

E.- Teoría de los radicales libres

Desde que las teoría de los radicales libres en el envejecimiento fuera propuesta por Harman en 1956, se han hecho varios intentos para relacionar el metabolismo de los radicales libres en el proceso del envejecimiento. Recientemente, algunos estudios sobre los efectos de la restricción calórica han dado nueva vida a la teoría de los radicales libres. Se ha propuesto que los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno están reducidas en la restricción calórica. Podría así producirse una disminución en la generación de radicales libres o una inducción de los mecanismos de defensa frente a la acción de los mismos. Si como hemos dicho antes, la tasa de consumo de oxígeno no varía en animales restringidos respecto a animales *ad libitum*, aquí tendríamos otro ejemplo de la capacidad de la restricción calórica para influir en las características de la utilización de los componentes energéticos de tal manera que sean menos dañinos a el organismo (Masoro E.J., 1992).

Si bien el fenómeno de la restricción calórica tiene unos efectos bastantes claros, aumentando la longevidad, retrasando la incidencia de enfermedades asociadas con la edad, atenuando el declive de ciertas funciones fisiológicas etc., no están tan claros sin embargo, los mecanismos por los cuales actúa. El estudio de estos mecanismos puede ser una buena herramienta para la comprensión de los procesos y fenómenos que tienen lugar durante el envejecimiento normal.

III. TOXICIDAD DEL OXIGENO

1.- El oxígeno en la tierra

Excepto para los organismos que están especialmente adaptados a vivir bajo condiciones anaeróbicas, todos los animales y plantas requieren oxígeno para la producción de energía. La aparición de oxígeno en cantidades significativas en la atmósfera terrestre probablemente se debió a la aparición de organismos fotosintéticos. La aparición del oxígeno tuvo que haber sido acompañada de la aparición de la capa de ozono para así permitir la evolución de los organismos terrestres (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Así, los organismos que evolucionaron adaptándose a esta vida aerobia, para ello tuvieron que desarrollar mecanismos de defensa antioxidantes de diversa índole.

Sin embargo, los organismos anaerobios evolucionaron refugiándose en ambientes donde el oxígeno no penetrase.

2.- Los organismos aerobios y el oxígeno

El oxígeno fue descubierto por SHEEL en 1775 y dos años después ya describía este mismo autor sus efectos nocivos. A finales del siglo pasado Paul Bert realizó los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del oxígeno sobre los animales.

El oxígeno cuando es suplementado a concentraciones más grandes de las existentes en el aire normal, resulta tóxico para plantas, bacterias aeróbicas como *Escherichia coli* y animales.

En plantas todos los tejidos son dañados a concentraciones de oxígeno por encima de lo normal, dándose una inhibición del desarrollo de los cloroplastos, disminución de la viabilidad de las semillas, inhibición del crecimiento de las raíces y eventual marchitamiento y caída de hojas (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Estudios sobre quimiotaxis frente al oxígeno en bacterias, muestran que varias cepas huyen de regiones con altas concentraciones de oxígeno. El crecimiento de *E. coli* se enlentece por exposición a oxígeno a 1 atmósfera de presión.

La toxicidad del oxígeno en animales, incluyendo al hombre, ha sido de gran interés en relación con el buceo y en tratamiento del cáncer, gangrena gaseosa, esclerosis múltiple e incluso en el diseño de la suplementación de aire en naves espaciales (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Durante el pasado y presente siglo se han ido acumulando datos descriptivos sobre la letalidad y las consecuencias patológicas de la exposición animal a altas presiones parciales de oxígeno. Se sabe que la toxicidad del oxígeno es mayor según aumenta la tasa metabólica, y esto estaría en relación con el hecho de que los invertebrados son más resistentes a la toxicidad del oxígeno que los vertebrados. Hay excepciones como el caso de *Drosophila* en la cual un incremento de la presión de oxígeno de una atmósfera, produce serios daños, pero esto se debe a las altísimas tasas metabólicas de los insectos que incluso superan a los mamíferos; entre los vertebrados son más sensibles los homeotermos.

Animales poiquilotermos como cocodrilos, tortugas o ranas son relativamente resistentes a la toxicidad del oxígeno a bajas temperaturas ambientales pero son mucho más sensibles cuando la temperatura ambiental aumenta (Halliwell y Gutteridge, 1986).

También existen diferencias en cuanto a la sensibilidad del oxígeno según la edad. Así las ratas jóvenes son más resistentes que las adultas.

La toxicidad del oxígeno está influida por la presencia en la dieta de cantidades variables de vitamina A, E, C, metales pesados, antioxidantes, y ácidos poliinsaturados y además también está inducida por una elevada concentración de glucosa que retrasaría la presencia de convulsiones provocados por el oxígeno hiperbárico (Halliwell y Gutteridge, 1986).

En los mamíferos hay tres órganos especialmente sensibles al oxígeno: pulmón, ojo y sistema nervioso.

La hiperoxia normobárica lo primero que daña es el pulmón, ya que es el tejido expuesto a tensiones de oxígeno más altas en el organismo. La exposición de humanos a oxígeno puro a 1 atmósfera durante tan poco como 6 horas, causa tos, dolor pectoral y dolor de garganta. La exposición durante más tiempo produce daño en los alvéolos pulmonares, incremento de la barrera aire-sangre causada por edema, muerte de las células epiteliales alveolares, formación de material fibroso inelástico. Llegado a este punto el daño es irreparable, y con 72 horas de exposición se produce la muerte (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Observaciones clínicas y experimentales recientes sugieren que el oxígeno puede empeorar el daño pulmonar causado por otras fuentes incluso a concentraciones aparentemente no perjudiciales.

La utilización de concentraciones de oxígeno del 50% a presión normal (menores a las anteriores), puede causar ceguera, producida por fibroplasia retrolental (formación de tejido fibroso detrás del cristalino). Esto fue observado en los primeros años de la década de los 40 en los niños prematuros, debido a que en las incubadoras se usaba una alta concentración de oxígeno. La concentración elevada de oxígeno parece inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos de la retina; cuando se retorna a una atmósfera normal, se produce un crecimiento excesivo de estos vasos, lo cual a veces ocurre de tal

manera que causa desprendimiento de retina con la correspondiente ceguera.

Si se suministra oxígeno puro a presiones hiperbáricas (a más de 2 ó 3 atmósferas) produce una toxicidad aguda sobre el sistema nervioso (efecto Paul Bert), produciendo convulsiones en los animales. El tejido nervioso es altamente sensible al oxígeno y su mayor resistencia *in vivo* en relación al pulmonar es debido a su menor grado de exposición al oxígeno debido a que la hemoglobina está saturada a presiones parciales de oxígeno bajas.

El oxígeno también puede ser tóxico a presiones normobáricas, estando implicado en procesos de isquemia-reperfusión, en los mecanismos de defensa de leucocitos frente a agentes infecciosos y posiblemente en procesos como el envejecimiento.

3.- Mecanismos de toxicidad del oxígeno

Todo lo descrito en los apartados anteriores son aspectos únicamente descriptivos sobre la toxicidad del oxígeno. En este apartado nos centraremos en los mecanismos por los que el oxígeno sería tóxico.

A. Inactivación de enzimas

El mecanismo de toxicidad del oxígeno propuesto en primer lugar consistía en suponer que el oxígeno actuaba inactivando enzimas que presentaban grupos tiólicos esenciales en forma reducida. El glutatión sería el encargado de proteger frente a esta acción del oxígeno (fig 3.1).

Sin embargo, este mecanismo solo explicaría una pequeña parte de los procesos celulares alterados por el oxígeno.

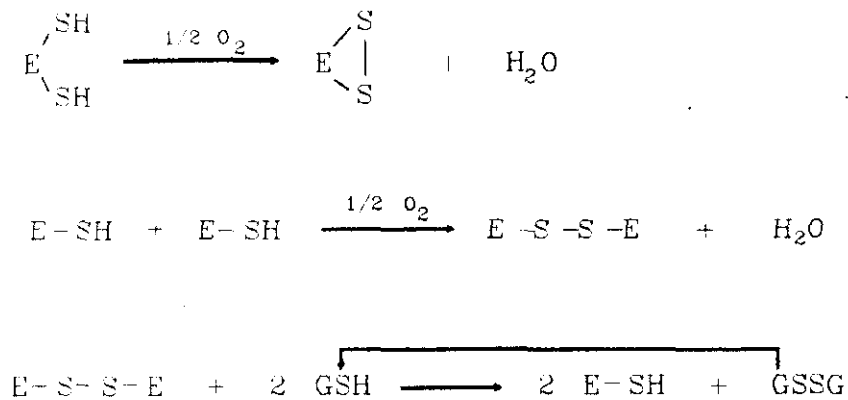


Fig 3.1.- Inactivación de enzimas por acción del oxígeno sobre grupos tiólicos y acción protectora del glutatión.

B. Generación de radicales libres

La mayor parte del daño oxidativo se debe a que la utilización de oxígeno por los sistemas biológicos da lugar a generación de radicales libres.

Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados. Según esta definición habría muchos radicales libres en química y biología (la molécula de oxígeno, el átomo de hidrógeno).

La presencia de uno o más electrones desapareados hace que estas especies sean atraídas ligeramente por un campo magnético (son paramagnéticas) y en general estas especies son altamente reactivas. Los radicales se pueden formar por la pérdida de

un electrón de un no radical o por la ganancia de un electrón por un no radical. Un radical libre también se puede formar por la rotura homolítica de un enlace covalente; la energía requerida para disociar este enlace puede ser obtenida por calor, radiación electromagnética, o por otras fuentes energéticas.

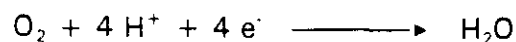
La molécula de oxígeno es en si misma un radical, tiene dos electrones desapareados cada uno localizado en un orbital antienlazante diferente y con espines paralelos. Esta es la forma más estable del oxígeno.

Los radicales libres derivados del oxígeno se forman durante el metabolismo normal de las células, algunos de estos radicales libres y especies relacionadas se muestran en la tabla 3.1.

$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
HO_2^{\cdot}	Radical hidroperoxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$\cdot OH$	Radical hidroxilo
ROO^{\cdot}	Radical peroxil
1O_2	Oxígeno Singlete

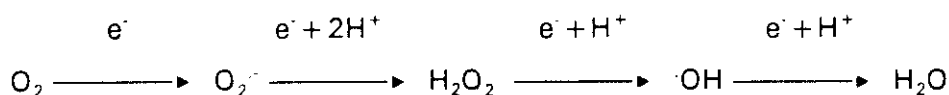
Tabla 3.1..-Especies derivadas del oxígeno potencialmente citotóxicas (Southorn *et al*, 1988).

La mayoría del oxígeno utilizado por los organismos aerobios es reducido a agua por la adición de cuatro electrones a cada molécula de oxígeno (reducción tetravalente):



Esta reacción es catalizada por el complejo citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial interna, o en la membrana plasmática en el caso de bacterias (Halliwell, 1981). En este proceso, los intermediarios de esta reacción, que son radicales libres, están firmemente unidos a los centros activos de la enzima y no presentan peligro para la célula (Southorn *et al*, 1988).

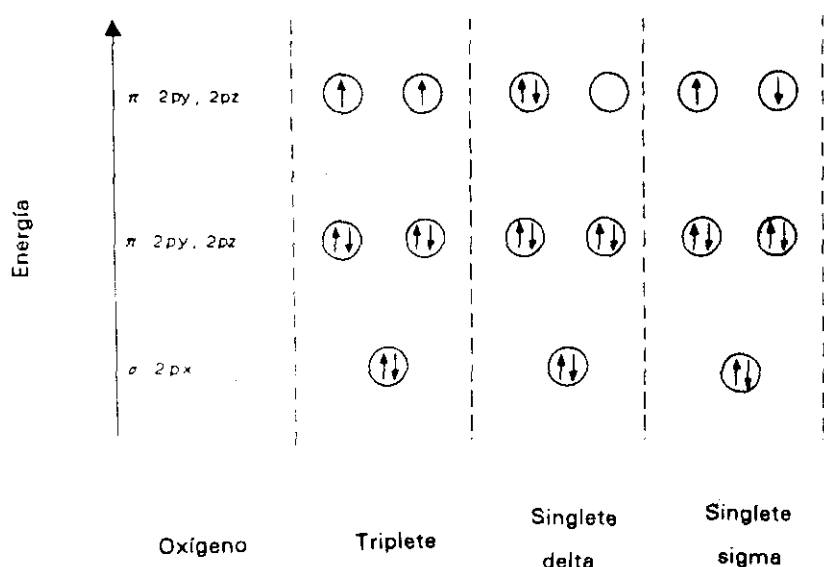
La reducción univalente del oxígeno en otros lugares puede producir radicales libres intermediarios que debido a su reactividad pueden alterar el normal funcionamiento de la célula.



El radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) es producido por la adición de un electrón al oxígeno molecular. La dismutación del radical superóxido da lugar a la formación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual en sí mismo no es un radical, pero es capaz de atravesar las membranas celulares y este aspecto sí es importante por el hecho de que la matriz extracelular posee pocos mecanismos antioxidantes (Southorn *et al*, 1988). La adición de un electrón al anterior da lugar a una forma altamente reactiva que es el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que tiene una vida media de 10^{-9} seg (Pryor, 1986). Al ser tan reactivo actúa entre 1 a 5 diámetros moleculares de su lugar de formación (Southorn *et al*, 1988). Este radical tiene un papel muy importante en el daño a proteínas, DNA y el inicio de la peroxidación lipídica. Al adquirir un electrón más, el radical hidroxilo se convierte en agua.

La reactividad del oxígeno molecular puede ser incrementada también por otra vía diferente a la anterior. Si al oxígeno basal (triplete) se le suministra energía suficiente, uno de los electrones desapareados puede sufrir una inversión de espín quedando ambos antiparalelos lo que le confiere una gran reactividad (Halliwell, 1981). Existen dos tipos de oxígeno singlete, uno de vida media muy corta (10^{-11} seg) oxígeno singlete sigma ($^1\Sigma\text{gO}_2$) y el oxígeno singlete delta ($^1\Delta\text{gO}_2$) más importante biológicamente

debido a su mayor vida media (10^{-6} seg). La estructura electrónica de estos dos tipos de oxígeno singlete junto al oxígeno basal sería (Halliwell, 1981):



a) Formación y propiedades del peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

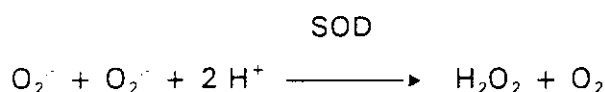
Como hemos dicho anteriormente la reducción del O₂ por acción de la enzima citocromo oxidasa se realiza añadiendo 4 electrones al oxígeno. Sin embargo, existen enzimas celulares que son oxidasas que transfieren 2 electrones a cada molécula de oxígeno formando así peróxido de hidrógeno:



Ejemplos de estas enzimas son urato oxidasa, L-aminoácido oxidasa, glicolato oxidasa, la autooxidación de algunos de los componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y de cloroplastos genera H₂O₂ *in vitro* (Nohl y Hegner, 1978) y en el caso de la mitocondria se ha demostrado que ocurre también *in vivo*

(Chance *et al.*, 1979). Microsomas aislados incubados con NADPH generan grandes cantidades de H₂O₂ sin embargo la tasa de producción de peróxido de hidrógeno por el retículo endoplasmático *in vivo* parece ser mucho mas pequeña.

Sin embargo la mayor fuente de peróxido de hidrógeno es la dismutación del radical superóxido, una reacción catalizada intracelularmente por la enzima superóxido dismutasa (McCord y Fridovich, 1969).



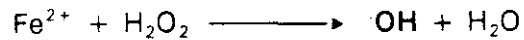
También se forma peróxido de hidrógeno por dismutación espontánea del radical superóxido.

Se ha sugerido que la toxicidad del O₂ a altas concentraciones sería debida a que se producía un incremento en la producción de H₂O₂ *in vivo*. La producción de H₂O₂ por fracciones aisladas de mitocondrias se incrementa al aumentar la concentración de O₂ por encima de lo normal y muchas enzimas oxidasas como glicolato oxidasa, no están saturadas de O₂ con las concentraciones fisiológicas. Así, respirando oxígeno puro se aumenta la producción de H₂O₂ durante la oxidación del glicolato por el hígado de rata *in situ* (Oshino *et al.*, 1975).

Las células animales en cultivo y algunas bacterias como *Neisseria gonorrhoeae* son muy sensibles al H₂O₂. De hecho muchas bacterias mueren más fácilmente por H₂O₂ que por otras especies derivadas del oxígeno. Sin embargo, no hay un patrón uniforme de la toxicidad del H₂O₂.

El H₂O₂ puro a concentraciones bajas es muy poco reactivo, pero en presencia de metales de transición como el hierro, se descompone para dar lugar al radical hidroxilo OH·, y esta especie derivada del oxígeno se encuentra entre las especies mas reactivas conocidas en el organismo. El daño celular producido por el peróxido de hidrógeno es debido más que a la propia molécula, a la capacidad de ésta de formar radical

hidroxilo.



El peróxido de hidrógeno también formaría radical hidroxilo en una reacción conocida como Haber-Weiss catalizada por hierro.

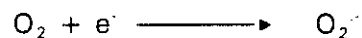
Así, la variabilidad en la toxicidad del H_2O_2 para los organismos puede depender de la cantidad y tipos de metales que contengan.

El peróxido de hidrógeno es capaz de difundir en la célula por lo que sería responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares.

El efecto nocivo del peróxido de hidrógeno dependerá de la disponibilidad de metales de transición o de como se elimine éste por acción de las enzimas antioxidantes (catalasa y peroxidasas).

b) Formación y propiedades del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Existen varias enzimas capaces de catalizar la reducción univalente del oxígeno molecular a radical superóxido. entre otras estarían la triptófano dioxigenasa, la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, las flavín deshidrogenasas, u otras peroxidasas.



El radical superóxido se forma también durante la autoxidación de formas reducidas de algunos compuestos presentes *in vivo* como son ferredoxina, adrenalina, flavinas, tioles, melanina etc.

También se forma por oxidación de componentes de las cadenas de transporte de electrones en bacterias, cloroplastos y el mitocondrias de plantas y animales (Nohl y Hegner, 1978), en el retícula endoplasmático y en la membrana plasmática y

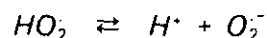
gránulos intracelulares de leucocitos. En este último caso la NADPH oxidasa, produciría radical superóxido y este sería importante para el papel de estas células en la defensa frente a organismos patógenos.

Los factores ambientales también pueden conducir a la generación de radical superóxido *in vivo* como ocurre con la luz ultravioleta, rayos X, ultrasonidos etc. (Halliwell, 1981).

En solución acuosa, el radical superóxido puede actuar como un fuerte agente reductor, cediendo su electrón extra, o como un débil agente oxidante transformándose en H₂O₂. Por ejemplo reduce citocromo c pero oxida moléculas como ácido ascórbico y adrenalina.

También reacciona con Mn²⁺ para producir un oxidante más poderoso. Por ejemplo, O₂⁻ por si solo oxida lentamente NADH pero se produce una rápida oxidación si se añaden cantidades catalíticas de Mn²⁺.

La forma protonada de O₂⁻, HO₂[·], es un oxidante más poderoso que el radical superóxido por si mismo. Sin embargo el pK_a de la reacción de disociación es 4,88 por lo que hay poca cantidad de HO₂[·] presente a pH fisiológicos.



El O₂⁻ formado en sistemas biológicos tiene una vida media significativa por lo que es capaz de difundir fuera de su lugar de formación y alcanzar otras estructuras dentro de la célula.

En disolución acuosa es poco reactivo si lo comparamos con otras especies como el radical hidroxilo o el oxígeno singlete delta, pero es potencialmente tóxico y puede influir directamente en la homeostasis local, por ejemplo oxidando catecolaminas. Los sistemas generadores de radical superóxido son capaces de destruir bacterias, inactivar

virus, dañar enzimas e inducir la peroxidación lipídica (Fridovich, 1979).

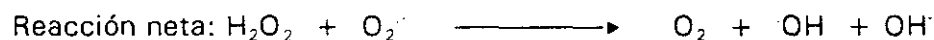
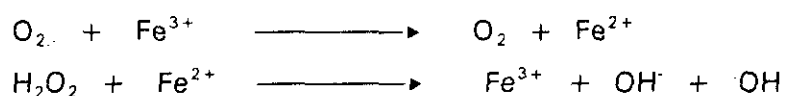
Muchos de los efectos de los sistemas generadores del radical superóxido pueden ser debidos a que este radical es precursor del radical hidroxilo y del oxígeno singlete, especie mucho más reactiva que el radical superóxido, el cual carece de reactividad suficiente para atacar a macromoléculas directamente (Halliwell, 1981).

c) Formación y propiedades del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

El radical hidroxilo es una de las especies más reactivas conocidas en química orgánica: puede atacar y dañar a casi todas las moléculas que se pueden encontrar en las células vivas.

Como se podría esperar debido a la reactividad del radical hidroxilo ningún sistema enzimático está implicado en su formación; más bien la célula intenta prevenir su formación (Southorn *et al*, 1988).

El radical hidroxilo es formado por la combinación de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y la presencia en el medio de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre mediante la reacción:



Esta reacción es conocida como reacción tipo Fenton o Haber-Weiss. La reacción neta fue propuesta por primera vez por Haber y Weiss en 1934. Como se puede observar en esta reacción el verdadero papel del radical superóxido es actuar como reductor del hierro. Como se observa, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ necesita al H_2O_2 para poder producir $\text{OH} \cdot$,

mientras que el H_2O_2 no necesita al $\text{O}_2^{\cdot-}$ para poder hacerlo. Esto, junto con la presencia del H_2O_2 en las células a concentraciones unas mil veces superiores a las del $\text{O}_2^{\cdot-}$, convierte al peróxido de hidrógeno en una especie con gran capacidad de generar daño oxidativo a pesar de no ser un radical libre.

El radical hidroxilo también puede ser formado por radiación ionizante (Southorn *et al*, 1988).

El radical hidroxilo es tan reactivo que reacciona siempre entre 1 a 5 diámetros moleculares de su lugar de formación. Su alta reactividad impide su difusión en la célula, como lo haría por ejemplo el peróxido de hidrógeno.

El radical hidroxilo puede hidroxilar a las bases púricas y pirimidínicas presentes en el DNA, también puede causar escisión de las hebras de DNA, pudiendo producir mutaciones. Las membranas celulares también son dañadas por la generación de $\cdot\text{OH}$ en su inmediaciones. El radical hidroxilo es capaz también de dañar proteínas, inactivar enzimas e iniciar la peroxidación lipídica. El $\cdot\text{OH}$ es considerado el principal iniciador del ataque oxidativo a todo tipo de macromoléculas.

IV. PEROXIDACION DE MACROMOLECULAS

1.- Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica fue definida de manera general por A.L. Tappel como el "deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados". El deterioro dependiente de oxígeno conduce al enranciamiento, un fenómeno que ya conocido desde la antigüedad como un problema en el almacenamiento de grasas y aceites y hoy es aún más relevante por la popularidad de las margarinas poliinsaturadas y aceites de cocina que pueden sufrir también este tipo de ataque oxidativo.

Las membranas celulares, ya sea membranas plasmática o membranas de

orgánulos subcelulares, contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados. Por ello las membranas celulares son propensas a sufrir peroxidación lipídica.

El proceso de peroxidación lipídica ocurre en tres etapas bien definidas: Iniciación, propagación y terminación.

La peroxidación se inicia cuando cualquier especie es lo suficientemente reactiva para extraer un electrón de un grupo metilo de la cadena de ácido graso. La presencia de enlaces dobles en los ácidos grasos debilita el puente C-H sobre el átomo adyacente al doble enlace y así el electrón en este sitio se elimina mucho más fácilmente. Se forma de esta manera un radical alquil ($R\cdot$ o $\cdot\text{CH}$), el cual tiende a estabilizarse por un reajuste molecular, formando un dieno conjugado (Fig 4.1). Bajo condiciones aeróbicas el radical alquil se combina con el oxígeno y forma el radical peroxil. Una vez iniciada, la peroxidación es autocatalítica.

En la fase de propagación, el radical peroxil puede transformarse en un hidroperóxido a expensas de reaccionar con otro ácido graso contiguo en la membrana formando de nuevo otro radical alquil, el cual propagaría la peroxidación lipídica. A partir del hidroperóxido formado en presencia de hierro puede formarse un radical alcoxil, que igualmente se estabiliza reaccionando con un ácido graso contiguo y formando un hidróxido y otro radical alquil que continuaría con la propagación de la peroxidación.

El proceso se termina por la reacción de radicales (por ejemplo tipo alquil) contiguos, dando lugar a puentes cruzado (R-R); o mediante la fragmentación del ácido graso en gran número de productos como el malondialdehído (el marcador más ampliamente utilizado) alcanos o hidróxidos que aparecen en el aire espirado (único método no invasivo de medida de la peroxidación lipídica). Los hidroperóxidos lipídicos y algunos de sus productos de degradación son altamente citotóxicos: pueden causar daño a enzimas y a membranas, produciendo un decremento en la resistencia y fluidez de la membrana y una eventual pérdida de su integridad.

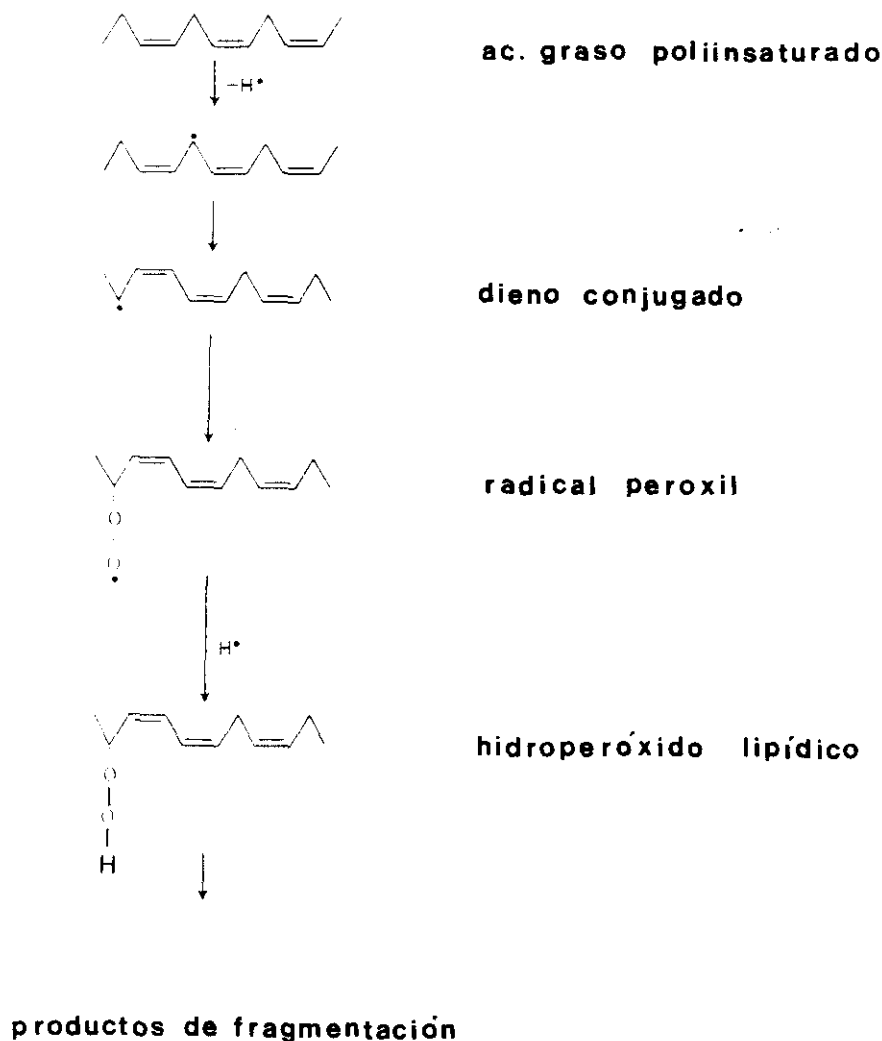


Fig 4.1.- Mecanismo de peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados.

Entre las especies que son capaces de provocar la peroxidación lipídica se encuentran el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, que en presencia de metales de transición es muy dañino para las células. También la adición de oxígeno singlete a lípidos de membrana produce peroxidación rápidamente. El radical superóxido no es suficiente reactivo para iniciar la peroxidación lipídica y en cualquier caso no podría entrar en el interior hidrofóbico de la membrana debido a la naturaleza de su carga. Su forma protonada sin embargo (HO_2^\bullet) si es capaz de extraer un electrón de algunos ácidos grasos como el

ácido linoléico (Halliwell y Gutteridge, 1986).

La tasa de peroxidación de lípidos puros o ácidos grasos *in vitro* es muy lenta, pero es altamente acelerada en presencia de metales de transición (especialmente hierro y cobre). También se puede inducir la peroxidación por agentes reductores como el ácido ascórbico, NADPH o el ácido dihidroxifumárico; sin embargo, estas moléculas no inducen peroxidación en sistemas libres de metales de transición, y la peroxidación observada probablemente se deba a contaminación con metales de transición. El Fe^{2+} es un buen iniciador de la peroxidación. Los compuestos arriba mencionados actuarían manteniendo al hierro en su forma reducida, y así permiten la continuación de la peroxidación (Halliwell, 1981).

Hay por lo menos tres mecanismos por los que los organismos aerobios pueden disminuir la tasa de peroxidación y sus lípidos insaturados.

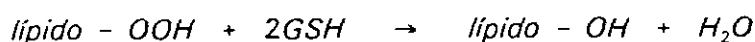
El mecanismo más simple sería secuestrar los iones metálicos libres en formas que no puedan catalizar la peroxidación. Por ejemplo, unidos a proteínas como la transferrina o ferritina. Este secuestro no puede ser completamente efectivo porque los iones metálicos están siempre en tránsito entre su lugar de almacenamiento y su lugar de uso dentro de la célula.

Un segundo mecanismo de protección, sería inhibiendo la reacción en cadena de la peroxidación lipídica por acción de compuestos como la vitamina E o los carotenoides. La vitamina E es una molécula apolar, que es capaz de neutralizar de manera efectiva los radicales peroxil y alcoxil formados dentro de las membranas celulares. Así inhibiría el proceso de peroxidación lipídica a nivel de la propagación. Además de su acción de "atrapador" de radicales, la vitamina E elimina también oxígeno singlete y así puede prevenir la iniciación de la peroxidación por esta molécula. Otro compuesto que actuaría como la vitamina E sería los carotenoides como el β -caroteno, que puede reaccionar con el oxígeno singlete y protege contra la peroxidación lipídica inducida por ésta molécula.

Un tercer mecanismo por el que los tejidos animales controlan la

peroxidación lipídica sería por acción de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), la cual actúa sobre lípidos peroxidados para reducirlos y estabilizarlos en compuestos hidroxilados y así prevenir su degradación a aldehidos y otros productos tóxicos.

GPx



2.- Daño oxidativo al DNA

Aunque se ha dedicado mucha más atención a la peroxidación lipídica, hoy sabemos que se producen ataques similares por parte de radicales libres tanto a ácidos nucleicos como a proteínas. Los productos de estas peroxidaciones se acumulan en proporciones menores, lo que ha dado lugar a que hayan pasado desapercibidos durante largo tiempo. A pesar de esto, estos procesos son muy importantes debido al carácter cualitativo del daño y a la mayor dificultad de reparación.

El daño al DNA puede estar producido por varios procesos, ya sea debido a la propiedades intrínsecas del DNA (procesos de tautomerización, análogos de bases, hidrólisis, desaminación...) como por acción de agentes tanto exógenos (radiación ultravioleta, mutágenos en la dieta o tabaco...) como endógenos (agentes alquilantes endógenos, especies reactivas de oxígeno...).

Dentro de los procesos endógenos quizás los más importantes en cuanto a la inducción de daño al DNA sean los que se producen por acción de las especies reactivas derivadas del oxígeno.

Mucho de los que se sabe actualmente sobre la química de las interacciones de los radicales libres con el DNA ha sido aprendido de estudios hechos con radiación

ionizantes o con H_2O_2 .

Las reacciones de los radicales libres con el DNA han sido analizadas a varios niveles de complejidad. Desde el estudio de las bases púricas y pirimidínicas, o de la desoxirribosa del DNA en solución acuosa, pasando por el análisis de las reacciones con los radicales libres de la doble hebra de DNA en disolución, o del DNA en cultivos celulares y hasta el estudio en el organismo completo. Las reacciones que ocurren en el organismo completo son obviamente las que tienen más importancia fisiológica.

De estos trabajos se ha observado que de los cinco principales componentes del DNA, los más susceptibles al ataque por el radical hidroxilo son las bases pirimidínicas (timina y citosina) seguida de las púricas (adenina y guanina) y por último la desoxirribosa (Saul *et al.*, 1987).

Las reacciones frente a los radicales libres de la estructura del DNA completa es cuantitativamente y cualitativamente diferente de las que ocurren frente a los componentes individuales. La doble hélice de DNA es diez veces menos susceptible al ataque por radicales libres que los componentes individuales (Saul *et al.*, 1987), lo cual puede ser explicado por consideraciones esteéricas debido a que las bases están protegidas dentro de la estructura helicoidal y son por lo tanto menos accesibles al ataque por radicales libres. La desoxirribosa sin embargo, al estar más expuesta al exterior, sería un blanco mucho mejor que las bases. También hay que considerar que existen reacciones que no se podrían dar en los componente individuales libres y sin embargo si se dan en la doble hélice, como son las reacciones de entrecruzamiento entre bases y azúcares de la misma hebras o entre hebras (Saul *et al.*, 1987).

Dentro de los radicales libres y especies derivadas del oxígeno el radical hidroxilo ($\cdot OH$) es el que reacciona mayoritariamente con las bases del DNA y con la desoxirribosa. En humanos se ha podido calcular que cada célula recibe como media 10.000 impactos de daño oxidativo por día (Fraga *et al.*, 1990). Esta cantidad es cientos de miles de veces superior a la producida por la radiación natural de fondo. Esto subraya la importancia de los radicales libres de origen endógeno como causantes potenciales de

muchas alteraciones de la función celular. Como consecuencia de este ataque oxidativo se generan muchos productos, que serían los mismos en la mayoría de los organismos.

En principio cualquiera de estos productos puede ser usado como un biomarcador del daño oxidativo al DNA siempre que ningún otro proceso contribuya a su formación.

Los biomarcadores de daño oxidativo más utilizados en el momento actual, son dos de los productos de la reacción del radical $\cdot\text{OH}$ con las bases de DNA: 8-hidroxiguanosina (8-OH-G) y la timidina glicol (Tg) (Fig 4.2). Estos dos compuestos son los principales productos de la reacción del radical $\cdot\text{OH}$ con guanina (G) y timidina (T) respectivamente. Tanto estas bases modificadas como sus nucleósidos son eliminadas por enzimas reparadoras. Estos productos finalmente se eliminan por el organismo por la orina.

A pesar de su especificidad, estas bases (Tg y 8-OH-G) podrían no ser idóneas como biomarcadores del daño oxidativo a DNA, porque pueden ser absorbidas a partir de la dieta (Simic, 1992).

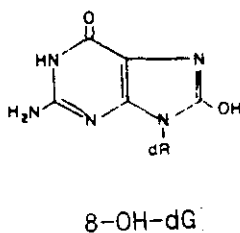
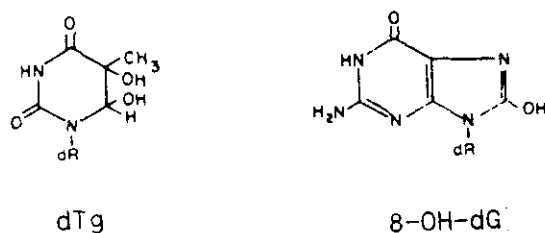


Fig 4.2.- Estructuras de timidina glicol (dTg) y 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG).

La producción diaria en orina de dTg y 8-OH-dG podría en principio representar la tasa de daño oxidativo al DNA, siempre que no ocurriera ninguna pérdida desde el momento de su escisión del DNA hasta que es recogida la orina y cuantificada. Esta equivalencia fue demostrada en experimentos de irradiación en ratón y humanos. Se utilizaron estas radiaciones ionizantes porque generan una cantidad conocida de radical $\cdot\text{OH}$

por rotura de las moléculas de agua. Los incrementos en la producción diaria de estos biomarcadores en orina (diferencia en la producción diaria antes de la irradiación y un día después de la irradiación) fueron proporcionales a la energía absorbida (número de ·OH). Se puede concluir por lo tanto, que estos productos no se catabolizan y representan la tasa de daño oxidativo a DNA (Simic, 1992).

Por último, hay que tener en cuenta que los ácidos nucleicos pueden ser dañados por la acción de la glucosa. La glucosa puede reaccionar con los grupos amino de los ácidos nucleicos, formando productos Amadori, y productos finales de esta glucosilación (AGE) que producen cambios irreversibles en las macromoléculas formando cruzamientos intra e intermoleculares.

3.- Daño oxidativo a proteínas

Ultimamente se han desarrollado numerosos estudios sobre el posible papel de las especies de oxígeno activo en relación con el daño y la degradación de proteínas.

Se sabe que las proteínas oxidadas son rápidamente y selectivamente degradadas por sistemas proteolíticos intracelulares. Estas observaciones pueden tener implicaciones importantes para la regulación del "turnover" de proteínas en todos los organismos aerobios. Los mecanismos por los que las proteasas reconocen a las proteínas modificadas no se entienden aún. Además, sólo tenemos un conocimiento superficial de los tipos de modificaciones que las especies reactivas de oxígeno pueden inducir.

En este sentido, el grupo de Kelvin Davis ha realizado numerosos trabajos para investigar la susceptibilidad de las proteínas al ataque por radicales libres, estudiando las modificaciones que se producen tanto a nivel de los aminoácidos (Davis *et al.*, 1987a), como en la estructura secundaria y terciaria (Davis *et al.*, 1987b). A su vez este grupo ha estudiado la susceptibilidad a la proteólisis de las proteínas oxidadas por la acción de radicales libres.

Las proteínas fueron expuestas a la acción del radical ·OH, o a la acción

conjunta de $\cdot\text{OH} + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2$. Esta última combinación podría ser un mejor reflejo de la exposición biológica a los radicales de oxígeno. Todos los aminoácidos de las proteínas estudiadas son susceptibles a la modificación tanto por un tipo de exposición como por la otra y esta modificación de los aminoácidos produce progresivamente un cambio en la carga eléctrica neta de las proteínas afectadas. Frente a exposición a $\cdot\text{OH}$, el triptófano, la tirosina, la histidina y la cisteína son más vulnerables que los otros residuos. Sin embargo, el daño a estos residuos fue mucho menor del que se esperaría si fueran aminoácidos libres, por lo que las estructuras primaria, secundaria y terciaria influirían en la reactividad con los radicales de oxígeno (Davis *et al.*, 1987a). La formación de bitirosina (unión de un radical tirosil con una tirosina o con otro radical tirosil) es un marcador de la modificación de proteínas por $\cdot\text{OH}$. Se produce una producción lineal de bitirosina con el tratamiento con $\cdot\text{OH}$, lo cual es un importante factor de agregación pues la formación de estas tirosinas es más probable que se dé entre proteínas. Se ha visto que el radical $\cdot\text{OH}$ es el principal iniciador de todas las modificaciones de la estructura primaria. El O_2 y el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ actuarían modificando el daño causado por el radical hidroxilo. A la vista de todas estas modificaciones en la estructura primaria se han de prever alteraciones en la estructura secundaria y terciaria.

A nivel de estructura secundaria y terciaria la exposición frente a $\cdot\text{OH}$ causa desnaturalización e incremento en la hidrofobicidad, seguidos de formación de enlaces covalentes entre las moléculas (agregación) en los que estarían implicadas bitirosinas. La combinación de $\cdot\text{OH} + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2$, también causa desnaturalización, pero en contraste con la acción del $\cdot\text{OH}$ solo, la proteína en este caso sufre fragmentación. La fragmentación parece ocurrir preferentemente a nivel de carbono alfa más que en el enlace peptídico. Esta fragmentación es el resultado de la adición de oxígeno a este carbono, inducida por $\cdot\text{OH}$; así, se formaría un radical peroxil, que produciría un peróxido cuya descomposición causaría la escisión de la cadena polipeptídica produciendo un grupo carbonilo y una amida. Se ha observado un aumento en la producción de carbonilos cuando se exponían las proteínas a radicales libres, lo cual apoyaría esta idea (Davies *et al.*, 1987b).

En cuanto a la susceptibilidad de las proteínas tratadas con $\cdot\text{OH}$, se vió que estas proteínas exhibían un incremento en la degradación por los sistemas proteolíticos

susceptible a la degradación proteolítica, por proteasas citosólicas neutras y alcalinas.

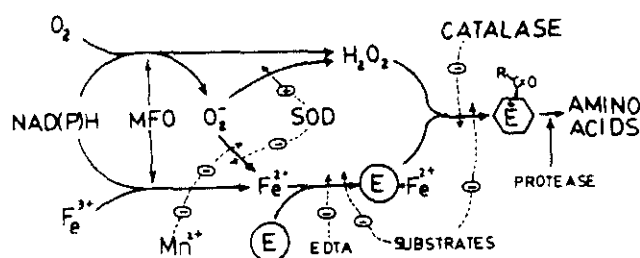


Fig 4.3.- Mecanismos de oxidación y degradación de enzimas.
(Stadtman, 1992).

Los residuos de histidina, arginina, lisina, prolina, cisteína y centros no hémicos de hierro en las proteínas son las dianas más comunes de los sistemas MCO. Las reacciones de los sistemas de oxidación catalizados por metales actúan sobre sitios específicos y esto se observa porque: a) son muy poco sensibles a la inhibición por agentes que eliminan los radicales del medio (manitol, SOD); b) sólo uno o muy pocos residuos de aminoácidos en una proteína dada son modificados por los sistemas MCO; c) sólo los residuos de aminoácidos localizados en sitios de unión de metales en la proteína son fácilmente oxidados.

En la figura 4.4 podemos observar el mecanismo de sitio específico por el cual un residuo de lisina en un lugar de unión de metales de una enzima podría ser oxidado a un derivado aldehído, por la combinación de $Fe(II)$ y H_2O_2 . En este mecanismo, se supone que el grupo epsilon-amino del residuo de lisina es uno de los ligandos a los cuales se puede unir el hierro. La reacción del complejo Fe -proteína con el peróxido de hidrógeno conduciría a la producción de $Fe(III)$, $\cdot OH$, y OH^- (reacción de Fenton). Debido a su reactividad el radical hidroxilo formado no difunde por el medio sino que capta un átomo de hidrógeno del átomo de carbono y así se forma un radical alquil. El paso siguiente es la transferencia del electrón del grupo alquil al $Fe(III)$ del complejo, por lo que se generaría $Fe(II)$ y se formaría un derivado imino, el cual por hidrólisis espontánea formaría un

derivado aldehídico y amoníaco. Esto conduce en conjunto, a la destrucción del sitio del unión de metal, liberación de Fe(II), y conversión de la proteína en una forma que es altamente susceptible a la degradación proteolítica. En este mecanismo se da una reacción "enjaulada" en la cual las especies de oxígeno activo producidas en la reacción del H_2O_2 con Fe(II) no escapan sino que reaccionan preferentemente con grupos funcionales de residuos de aminoácidos en el sitio de unión a metales de la enzima. Esto justifica la alta especificidad de las reacciones catalizadas por metales y también la incapacidad de los sistemas que eliminan radicales de inhibir esta reacción (Stadtman, 1992).

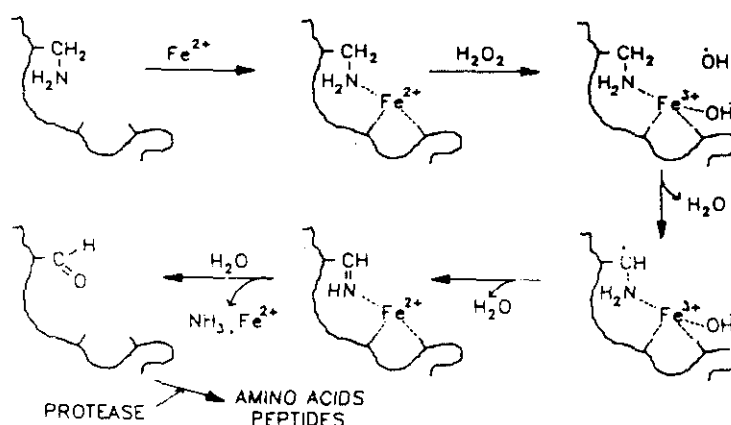


Fig 4.4.- Oxidación de proteínas en sitio específico. (Stadtman, 1992)

El hecho de que la oxidación de proteínas catalizada por metales produce la conversión de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en derivados carbonilos puede aprovecharse para estimar mediante el uso de técnicas de medida altamente sensibles el nivel de proteínas oxidadas, a través de la medida de estos derivados; aunque en cierta medida se infravalora la cantidad de proteínas oxidadas ya que la oxidación de algunos residuos de aminoácidos no produce carbonilos (Stadtman, 1992).

V. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

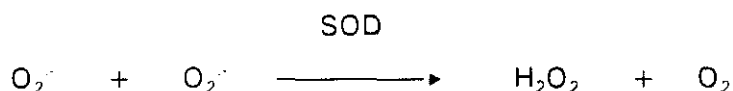
Con la aparición del oxígeno en la Tierra hubo una gran presión evolutiva para que los organismos desarrollaran mecanismos de defensa contra la toxicidad del oxígeno. Unos optaron por refugiarse en ambientes donde el oxígeno no penetrara

(anaeróbios), incluso algunas bacterias desarrollaron una envoltura que las protegía del medio con oxígeno (heterocistos) y otros se adaptaron a vivir con esta nueva atmósfera con oxígeno desarrollando mecanismos endógenos de defensa antioxidante. Estas defensas antioxidantes las podemos dividir en dos grandes grupos, antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

1.- Antioxidantes enzimáticos

A. Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1) cataliza la siguiente reacción:



Esta enzima fue descubierta por McCord y Fridowich en 1969, en eritrocitos. Actúa eficientemente eliminando $\text{O}_2^{\cdot -}$ a valores de pH fisiológicos (la velocidad de catálisis es independiente de pH entre los valores de pH 5,3 y 9,5), la dismutación espontánea también se da pero es mucho menos eficiente y depende fuertemente del pH.

El oxígeno producido por esta dismutación mediada por la enzima es el oxígeno en estado basal, no oxígeno singlete (Halliwell, 1981).

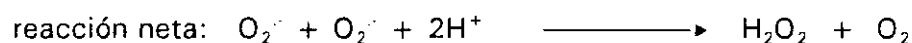
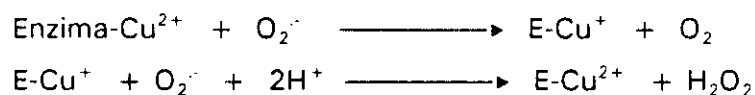
A pesar de una intensiva investigación no se ha encontrado ningún otro sustrato de esta enzima, por lo que el papel real *in vivo* de esta enzima sería la dismutación del radical superóxido.

Existen varias formas moleculares de esta enzima. Una de ellas sería la SOD que contiene cobre y zinc, SOD Cu-Zn, que es muy estable y por ello es fácil su aislamiento. Para purificar esta enzima a partir de eritrocitos, se lisan las células y se elimina la hemoglobina con tratamiento con cloroformo y etanol, seguido de centrifugación. No todas las enzimas toleran estos procedimientos; la SOD Cu-Zn es muy resistente al

calor, ataque con proteasas, y a desnaturalización con agentes como cloruro de guanidina, dodecil sulfato sódico (SDS), o urea.

Todas las enzimas SOD Cu-Zn aisladas de células eucariotas tienen una masa molecular de alrededor de 32.000 Da y contienen dos subunidades, cada una de las cuales lleva un sitio activo que contiene uno el ión cobre y el otro el ión zinc. Normalmente se encuentra en el citoplasma de dichas células y en los cloroplastos de las hojas también se ha encontrado en estudios hechos en hígado de rata entre las membranas mitocondrial interna y externa y en el núcleo. Recientemente se ha descrito su presencia en los peroxisomas de células tanto vegetales (del Río, 1990) como animales.

El ión cobre sería el que realiza directamente la dismutación por una alternativa oxidación y reducción:



Sin embargo, al menos otro mecanismo es posible, en el que el primer $\text{O}_2^{\cdot -}$ no reduce al cobre, sino que forma un complejo con él.

El ión Zinc no tendría función en el ciclo catalítico pero parece funcionar estabilizando a la enzima.

El cianuro es un gran inhibidor de la SOD Cu-Zn, y la enzima también puede ser inactivada, por incubación prolongada con dietilditiocarbamato, el cual se une al cobre en el sitio activo y elimina este metal de la enzima.

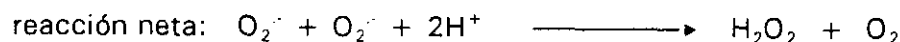
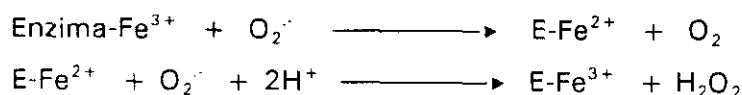
Esta enzima está presente en todas las células eucariotas, tales como levaduras, plantas y animales pero no se encuentra en células procariotas, tales como bacterias y algas verdeazuladas. Existen excepciones a esto y se puede encontrar SOD Cu-

Zn en la bacteria luminiscente *Photobacterium leiognathi* y en la bacteria *Caulobacter crescentus* CB15; la secuencia de aminoácidos de esta última está muy relacionada con la secuencia eucariótica.

En tejidos animales (excepto eritrocitos) plantas y bacterias existe también otra forma molecular de SOD, que contiene manganeso, Mn (III), en lugar de cobre y zinc en su centro activo. Esta no se inhibe ni por cianuro ni por dietilditiocarbamato (DDC) por lo que se suele aprovechar para medir las dos formas de SOD; sin embargo, la interacción del cianuro o el DDC con el sistema generador o detector de $O_2^{\cdot-}$, junto con la frecuente inhibición incompleta de la SOD Cu-Zn y la gran desproporción de las dos formas (del orden de 9:1) en muchos tejidos, dificulta, en nuestra opinión, la obtención de resultados fiables con ese tipo de métodos. La SOD-Mn tiene un peso molecular de 80.000 Da (40.000 Da la bacteriana) y se destruye con tratamiento con cloroformo y etanol.

En hígado de rata, hojas de espinaca y semillas de maíz se localiza en la matriz mitocondrial, mientras que en hígado de mandril y humano también está presente en el citosol (Fridovich, 1979). También se puede encontrar SOD-Mn en los cloroplastos.

Por último, existe otra forma molecular de SOD que contiene hierro como grupo prostético. Se encuentra en bacterias, algas verdeazuladas y en unos tejidos vegetales. En tejidos animales este tipo no se encuentra. Este tipo tiene dos subunidades proteicas, sin embargo al menos existen dos enzimas tetraméricas, una de *Mycobacterium tuberculosis* y otra de *Methanobacterium bryantii*. Las enzimas diméricas contienen una o dos átomos de hierro por molécula de enzima. El hierro está en estado Fe (III) cuando la enzima no actúa y es probable que oscile entre Fe(III) y Fe(II) durante el ciclo catalítico.



E. coli tiene tres tipos de SOD: una sería la SOD-Mn, otra una Fe-SOD y la tercera una híbrido entre la enzima con manganeso y la enzima con hierro. Otras bacterias sin embargo contienen sólo un tipo de enzima. Por ejemplo, *Bacillus cereus* contiene sólo SOD-Fe, y *Streptococcus sanguis*, sólo SOD-Mn. Sin embargo, *Propionibacterium shermanii*, la cual normalmente contiene SOD-Fe cuando crece en un medio deficiente de hierro, produce SOD-Mn. *Streptococcus mutans* usa la misma apoenzima para la SOD-Fe que para SOD-Mn, sólo depende del metal que exista en el medio de cultivo.

La secuencia de aminoácidos de la SOD-Fe es muy similar a la de SOD-Mn y muy diferente de las secuencias de SOD Cu-Zn. Otros estudios sobre la secuencia de aminoácidos han demostrado que las enzimas bacterianas que contienen manganeso muestran una considerable homología en su secuencia tanto con las enzimas que contienen hierro como manganeso en organismos procariotas. Sin embargo, la SOD Cu-Zn no muestra homología con cualquiera de los otros tipos de enzimas. Tales resultados serían compatibles con la teoría endosimbiótica del origen de la mitocondria, la cual sugiere que las mitocondrias evolucionaron como una simbiosis entre una célula primitiva eucariota (con SOD Cu-Zn) y una procariota (con SOD-Mn) que eventualmente se llegó a ser incorporada en el citoplasma eucariótico, envuelta en una membrana (membrana mitocondrial externa) (Halliwell y Gutteridge, 1986).

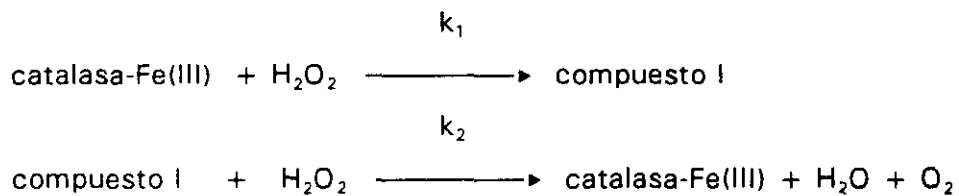
B. Catalasa (CAT)

La mayoría de las células aeróbicas contienen catalasa (EC.1.11.1.6). Sin embargo, no se ha detectado en la bacteria *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, el alga verde *Euglena* y el alga verdeazulada *Gloeocapsa*. Algunas bacterias anaeróbicas como *Propionibacterium shermanii* también contienen catalasa, pero la mayoría no la tienen. En animales, la catalasa está presente en la mayoría de los órganos, estando especialmente concentrada en hígado y eritrocitos sin embargo, el cerebro, el corazón y músculo esquelético contienen poca cantidad de catalasa.

Tiene un peso molecular alto (240.000 Da), y es una hemoenzima

tetramérica; cada subunidad contiene una molécula de NADPH unida a ella, que ayudaría a estabilizar la enzima. La disociación de la enzima en sus subunidades, lo cual ocurre con facilidad durante su almacenamiento en disolución diluida o la exposición de la enzima a medio ácido o básico, causa la pérdida de su actividad. El átomo de hierro del grupo hemo realiza el intercambio redox.

El mecanismo de acción de la catalasa sería el siguiente:



La rotura catalítica del H_2O_2 por acción de la catalasa requiere la formación del compuesto I el cual reacciona con una segunda molécula de H_2O_2 (Fig 5.1). La catalasa tiene una gran V_{max} y destruye peróxido de hidrógeno en concentraciones altas a gran velocidad, pero es casi inefectiva a bajas concentraciones de H_2O_2 debido a su baja afinidad por este sustrato. La rotura del H_2O_2 por acción de la catalasa es conocida como reacción catalítica. La catalasa es capaz de actuar también como una peroxidasa (reacción peroxidativa), necesitando un agente reductor como es el etanol, metanol etc. transformándolos en los correspondientes aldehídos a la vez que elimina H_2O_2 (Fig 5.1).

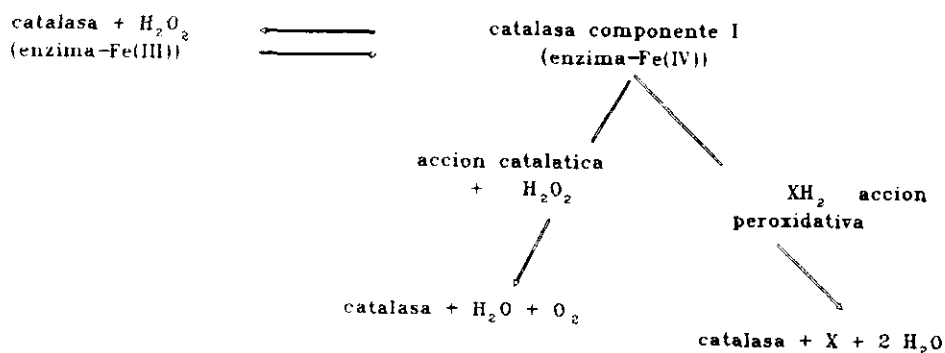


Fig 5.1.- Mecanismo de acción de la catalasa (Halliwell, 1981).

La catalasa abunda en los peroxisomas, lugares en los que precisamente existe una gran cantidad de enzimas productoras de H_2O_2 , como urato oxidasa, flavoproteín-deshidrogenasas etc. La mayoría del H_2O_2 generado por estas enzimas *in vivo* es eliminado por la catalasa, al menos en el hígado perfundido de rata, presumiblemente porque se forma localizadamente dentro del peroxisoma una alta concentración de H_2O_2 . También últimamente se ha demostrado que abunda la catalasa en el citosol, en especies distintas de la rata (ej: cobaya), cosa que antes se achacaba a ruptura de peroxisomas durante la homogeneización. En las mitocondrias y cloroplastos también se forma H_2O_2 pero ninguno de estos dos orgánulos tiene cantidades significativas de catalasa, por lo que la eliminación de éste en estos orgánulos sería a través del sistema glutatión peroxidasa/reductasa.

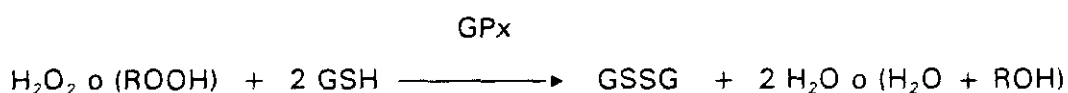
Por último, la actividad catalasa puede ser inhibida por acción de azida, cianuro o más específico sería el aminotriazol. La acción inhibitoria del aminotriazol se da sobre el compuesto I, el cual sólo es capaz de inhibir a la catalasa si el H_2O_2 está presente para formar el compuesto I. Esta inhibición dependiente de H_2O_2 ha sido utilizada para medir tasas producción de H_2O_2 *in vivo* (Yusa *et al.*, 1987).

C. Glutatión peroxidasa

La enzima glutatión peroxidasa (EC. 1.11.1.9) fue descubierta en tejidos animales en 1957 por G.C. Mills. No está presente generalmente en plantas ni bacterias aunque se ha descrito su presencia en algunas algas y hongos. Su sustrato es el compuesto tiólico de bajo peso molecular denominado glutatión, el cual es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina. Una forma enzimática es dependiente de selenio, el cual se encuentra en su sitio activo, es esencial para su actividad y controla la síntesis de la proteína.

Esta enzima es específica para GSH como sustrato pero actúa *in vivo* eliminando tanto hidroperóxidos inorgánicos (H_2O_2) como hidroperóxidos orgánicos (ROOH), como cumeno hidroperóxido, *tert*-butilhidroperóxido, progesterona 17 Ó-hidroperóxido así como hidroperóxidos lipídicos. En cada caso actuaría reduciendo los

peróxidos (ROOH) a alcoholes, que son más estables, impidiendo así su degradación a aldehídos u otros productos tóxicos.



Esta enzima tiene 76000 Da de peso molecular es tetramérica, y cada subunidad consta de un átomo de Se. Probablemente el átomo de Se se encuentre en el sitio activo como una selenio-cisteína en la cual el átomo de azufre ha sido reemplazado por un átomo de selenio. Cantidades traza de Se son indispensables en la dieta aunque es tóxico en exceso, y muchos de los síntomas de la deficiencia de selenio como el incremento en la acumulación de lípidos peroxidados en algunos tejidos o el incremento en la sensibilidad a los efectos dañinos del oxígeno entre otros, pueden ser explicados por una falta de glutatión peroxidasa (Halliwell y Gutteridge, 1986).

El GSH aparentemente reduce el Se y la forma reducida de la enzima entonces reacciona con el sustrato ya sea H_2O_2 como ROOH.

Existe otra forma enzimática de la glutatión peroxidasa la cual es independiente de Se. Esta forma actuaría únicamente sobre los hidroperóxidos orgánicos pero no sobre el peróxido de hidrógeno. Esta actividad parece ser debida a algunas de las enzimas glutatión-transferasas que están implicadas en la eliminación de xenobióticos. Estas enzimas no pueden trabajar en la fracción lipídica por lo que eliminan los hidroperóxidos lipídicos cuando estos se liberan desde la membrana al citosol por acción de la fosfolipasa A_2 . Sin embargo, se ha caracterizado más recientemente una GPx que actuaría directamente en las membranas celulares (Schuckelt *et al.*, 1991).

El balance entre glutatión peroxidasa Se dependiente y no Se dependiente varía entre los diferentes tejidos y entre las distintas especies animales.

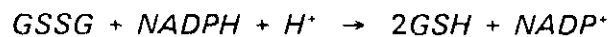
La GPx está presente en el citosol, en mitocondrias, y en el retículo

endoplasmático (principalmente Se-GPx en estos dos últimos casos). Su K_M y V_{max} por el H_2O_2 son pequeñas por lo que hace que la Se-Gpx sea idónea para eliminar concentraciones pequeñas de H_2O_2 , complementado así a la catalasa que actuaría sobre concentraciones mucho más altas y en otros orgánulos.

D. Glutación reductasa

La enzima glutación reductasa (EC.1.6.4.2.), es la enzima encargada de reducir el glutación oxidado; así la razón GSH/GSSG en células normales se mantiene elevada. Es muy importante que esta razón se mantenga elevada pues lo contrario resultaría altamente tóxico para la célula. Esta enzima es muy importante pues de ella depende indirectamente el funcionamiento de la glutación peroxidasa, de las GSH-transferasas y la reconstitución del GSH oxidado de forma no enzimática.

Esta enzima cataliza la reacción:



El NADPH requerido en esta reacción es proporcionado en tejidos animales por una compleja ruta metabólica conocida como la vía de las pentosas fosfato.

La enzima glutación reductasa contiene dos subunidades, posee una molécula de FAD en su sitio activo. Aparentemente el NADPH reduce al FAD, el cual pasa sus electrones a un puente disulfuro (-S-S-) entre dos residuos de cisteína de la proteína. Los dos grupos -SH así formados entonces interactúan con GSSG y así se reduce a 2GSH, volviéndose a formar entonces el puente disulfuro de la proteína (Halliwell y Gutteridge, 1986).

2.- Antioxidantes no enzimáticos

Entre los antioxidantes no enzimáticos están: Glutati3n, 3cido asc3rbico (vitamina C), 3cido 3rico, alfa-tocoferol (vitamina E) y carotenoides.

A. Glutati3n

El glutati3n (GSH) es un trip3ptido de 3cido glut3mico, ciste3na y glicina, que constituye el principal tiol no proteico celular. Su capacidad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo ti3lico de su ciste3na. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzim3ticas como la GPx o no enzim3ticas. Proteje de la oxidaci3n a grupos -SH esenciales de las prote3nas, tanto porque el GSH es m3s accesible para O₂ que los grupos -SH de las prote3nas como porque el GSH puede tambi3n actuar sobre enzimas que ya han resultado inactivadas por oxidaci3n de sus grupos -SH. La reacci3n del GSH con el O₂ da lugar a su forma oxidada (GSSG), la cual contiene un puente disulfuro.

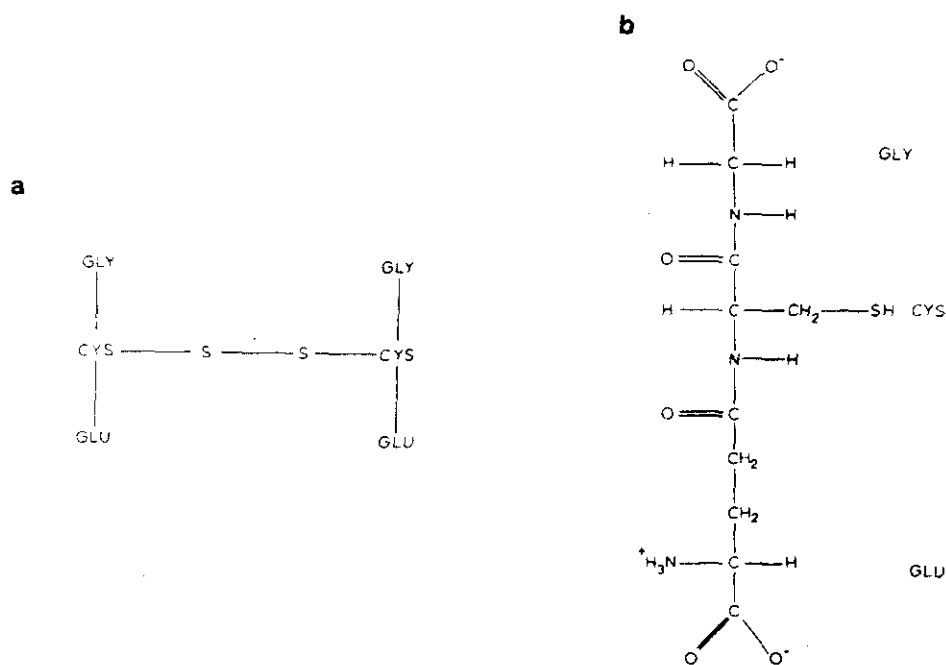
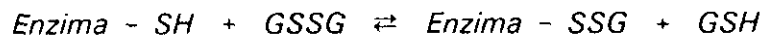


Fig 5.3.- Estructura del glutati3n oxidado (a) y reducido (b).

El GSSG se puede transformar en su forma reducida por la actividad glutatión reductasa o ser exportado activamente a través de la membrana; de esta manera la razón GSH/GSSG se debe mantener siempre alta, lo que es muy importante para la célula pues el glutatión oxidado es una sustancia altamente tóxica para las células. . El GSSG puede llegar a inactivar enzimas formando disulfuros mixtos:



Es por esto por lo que los hepatocitos exportan activamente el GSSG a la sangre cuando sus niveles son elevados.

Hasta tal punto es importante que la tasa GSH/GSSG sea alta que la medida de ésta es uno de los estimadores más fiables del grado de estrés oxidativo tisular.

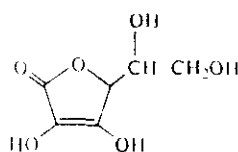
El glutatión además puede reducir al radical superóxido, radical hidroxilo, y realizar reacciones de "extinción" del O₂ singlete, devolviendolo a su estado basal no reactivo, o triplete.

B. Acido ascórbico (Vitamina C)

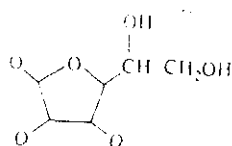
El ácido ascórbico es una sustancia hidrosoluble, puede ser sintetizada por las plantas y por la mayoría de los animales a partir de glucosa, pero los humanos, otros primates, cobayas y murcielagos han perdido durante su evolución una de las enzimas necesarias para su síntesis, y requieren por ello que el ácido ascórbico esté presente en la dieta. La propiedad química más importante del ácido ascórbico es su capacidad para actuar como un agente reductor, pero el ácido ascórbico *in vivo* tiene otras funciones como es la de actuar como cofactor de varias enzimas como la prolina hidroxilasa y lisina hidroxilasa por lo que sería muy importante su presencia para la síntesis del colágeno. También se ha descrito su actuación como cofactor enzimático, en otras 7 vías metabólicas como ocurre con la vía de síntesis de noradrenalina. Sin embargo, su papel no es específico en ninguna de esas 8 reacciones metabólicas pudiendo ser sustituido por

otros reductores que no evitan el escorbuto. Por ello, su función fisiológica aún no está aclarada. Su papel más claro en el organismo es el de actuar como reductor, lo que genera su elevada actividad antioxidante en muchos tejidos en los que está presente a concentraciones del orden de 1mM.

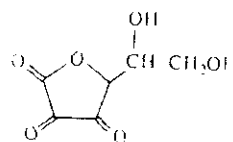
El ácido ascórbico puede existir en tres estados, ascorbato (reducido), semidehidroascorbato (tras la oxidación monoelectrónica del ascorbato) y dehidroascorbato (tras la oxidación bielectrónica del ascorbato).



ac. ascórbico



semidehidroascorbato

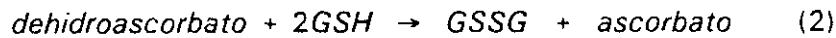
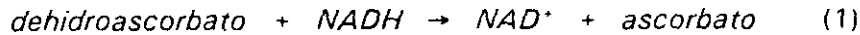


dehidroascorbato

Fig 5.4.- Estructuras del ácido ascórbico y sus formas oxidadas.

El ascorbato reacciona rápidamente de forma reductiva $O_2^{\cdot -}$, HO_2 y aún más rápidamente con $\cdot OH$. También es capaz de extinguir al oxígeno singlete, reducir radicales tiólicos y combinarse rápidamente con el ácido hipocloroso, un potente oxidante generado en los sitios donde existe inflamación.

La forma oxidada (dehidroascorbato) puede ser reducida de nuevo a ascorbato a partir de equivalentes de reducción de NADH mediante la catálisis de una NADH-dehidroascorbato reductasa (reacción 1) o del GSH de forma directa o catalizada por una GSH-dehidroascorbato reductasa (reacción 2).



C. Acido úrico

Se ha descrito que el ácido úrico tiene la capacidad de eliminar $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, O_2 singlete, o radicales alcoxil ($\text{ROO}\cdot$) y además puede eliminar de la solución trazas de Fe^{2+} , el cual como sabemos, en caso de estar presente podría actuar como estimulador potente de procesos peroxidativos. El ácido úrico tiene también la capacidad de extinguir el ozono y el ácido hipocloroso un oxidante producido por la enzima mieloperoxidasa (Halliwell y Gutteridge, 1896).

A pesar de que se trata de una sustancia que solemos asociar con situaciones patológicas por tender a precipitar (se encuentra en el límite de saturación en el hombre), el ácido úrico podría actuar como antioxidante *in vivo*. Así, la pérdida de la enzima urato oxidasa por el hombre durante su evolución podría haber sido beneficiosa. Se ha sugerido que en la evolución de los primates se habría producido una doble mutación de modo que la pérdida de la uricasa al dar lugar a elevados niveles de ácido úrico en plasma, habría compensado la pérdida de la capacidad para sintetizar el ácido ascórbico en los primates superiores (Ames *et al*, 1981).

D. Alfa-tocoferol (vitamina E)

Es de carácter liposoluble, y se considera el principal antioxidante de las membranas en las células animales. Su actividad suele atribuirse al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol (fig 5.5).

Su solubilidad en la membrana permite la accesibilidad directa a los grupos peroxil ($\text{ROO}\cdot$) que serían reducidos a hidroperóxidos (reacción 1), los cuales serían

entonces degradados hasta alcoholes por la GPx, evitando así que a partir de los radicales ROO· se inicie la propagación del daño peroxidativo. La vitamina E también actuaría sobre los radicales alcoxil (RO·) (reacción 2) y así habría otro punto de corte del daño peroxidativo en este caso limitando la propagación. Tanto en un caso como otro la vitamina se convierte en radical tocoferilo (VitEO·). La forma reducida de vitamina E se ha de regenerar y se ha propuesto que el ascorbato y el glutatión podrían ejercer esta función (3). Así, estas el alfa-tocoferol y el ácido ascórbico actuarían en tandem en la interfase citosol-membrana.

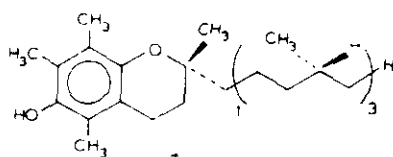
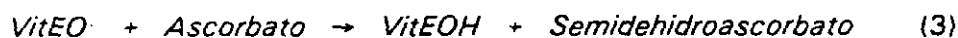


Fig 5.5.- Estructura del alfa-tocoferol.

E. Carotenoides

Los carotenoides tienen una gran capacidad para dar lugar a reacciones de extinción como la del O₂ singlete a triplete. El β-caroteno así protegería contra la peroxidación inducida por oxígeno activo. Así, los carotenoides podrían ser importantes como agentes protectores naturales contra la peroxidación lipídica. Los carotenoides

representan un gran grupo de pigmentos sintetizados sólo en plantas (fig 5.6). Su función biológica en plantas sería la de proteger a los cloroplastos del oxígeno singlete debido a su concentración y generación de éste a nivel de los cloroplastos en presencia de luz visible (fotooxidación). En los animales, en los que su concentración es mucho menor su función antioxidante natural es menos clara aunque se conoce su papel frente a alteraciones fotooxidativas en la piel. De todas maneras, el hecho de que la molécula de β -caroteno esté compuesta de dos moléculas de vitamina A ha estimulado también investigaciones sobre el papel antioxidante del retinol. Datos recientes muestran el papel protector de los carotenos frente al desarrollo de cánceres, función que es independiente de vitamina A.

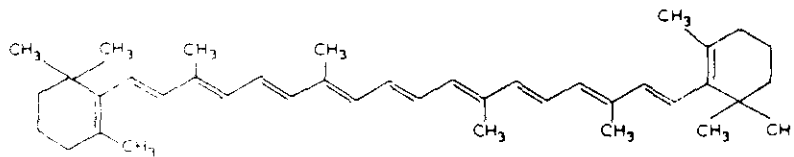


Fig 5.6.- Estructura del β -caroteno.

OBJETIVOS

Los efectos de la restricción calórica parecen estar bastante bien definidos. Se sabe que aumenta la longevidad (media y máxima), retrasa la incidencia de enfermedades asociadas con la edad (tumores, cardiomiopatías etc.) y atenúa el declive de ciertas funciones fisiológicas importantes en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Muchos autores han hecho incapié en el hecho de que la restricción calórica para ser realmente efectiva ha de iniciarse antes de finalizar la fase de desarrollo. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales actúa la restricción calórica, es aún una incógnita por despejar (Viidik, 1991).

Entre las hipótesis que intentan explicar el fenómeno de la restricción calórica, está la que considera a los radicales libres como agentes directamente implicados en este fenómeno, debido a la presunta relación entre radicales libres y envejecimiento. Se ha sugerido que la restricción calórica podría alterar el metabolismo oxidativo modulando los niveles de radicales libres y los mecanismos de defensa frente a éstos.

Entre muchas de las cuestiones que se desconocen sobre la restricción calórica está el hecho de si alguno de los tres elementos energéticos principales (hidratos de carbono, lípidos o proteínas) es responsable en mayor grado de los fenómenos ocurridos en la restricción calórica. De estos, los hidratos de carbono es el único elemento energético presente en la dieta de roedores (animal empleado para el presente estudio) en cantidades lo suficientemente grandes como para poder realizar una reducción experimental al 60% de la ingesta de calorías del control únicamente reduciendo la cantidad de este elemento. Por otra parte, la restricción calórica basada en restricción de carbohidratos nos resulta especialmente interesante si tenemos en cuenta la teoría del envejecimiento basada en la glucosilación no enzimática (A. Cerami, 1985) y su recientemente propuesta relación con la teoría de los radicales libres. Algunos autores, implicando a los radicales libres junto con altos niveles de azúcares, han sugerido que la auto-oxidación de glucosa, al generar peróxidos, radicales libres y compuestos dicarbonilos altamente reactivos sería responsable de modificación de proteínas (Wolff y Dean, 1987). Por otra parte, la restricción calórica generalizada da lugar a niveles más bajos de glucosa plasmática y una disminución en la

glucosilación de proteínas tisulares (Masoro *et al*, 1989), por lo que se ha postulado que la clave de la restricción calórica podría estar a este nivel.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones y en un intento de contribuir a aclarar en lo posible el papel de los radicales libres en el fenómeno de la restricción calórica, nos planteamos el presente trabajo por una parte para investigar el efecto de la restricción calórica sobre las enzimas antioxidantes y la capacidad aeróbica máxima (medida a través de la actividad citocromo oxidasa) en la restricción calórica generalizada y por otra parte para observar el efecto de la restricción de hidratos de carbono sobre esos mismos parámetros.

La especie elegida para la realización del presente trabajo fue el ratón ya que han sido ampliamente demostrados los efectos de la restricción calórica en una gran variedad de cepas de esta especie.

Los animales fueron sometidos a un período de restricción calórica de dos meses, el cual coincidió con la fase de desarrollo de los ratones, pues otro de los objetivos de nuestro trabajo era el ver el posible papel de los radicales libres cuando la restricción calórica se ejercía durante el desarrollo.

Por otro lado, muchos de los trabajos realizados hasta la fecha sobre restricción calórica se han basado simplemente en el descenso de la ingesta de alimento, pero esto no implica reducción de calorías como se busca, sino también reducción de vitaminas y minerales, lo que puede llevar a conclusiones erróneas. Algunas de las veces incluso no se reducía la ingesta diariamente sino simplemente se les daba de comer un día si y otro no, con el consecuente escaso control de la misma (Pieri *et al*, 1992). En el presente trabajo se han utilizado dietas semipurificadas, tomando como la control la AIN 76 (American Institute of Nutrition), y se han igualado los niveles de ingesta de vitaminas y minerales en los tres grupos experimentales, teniendo en cuenta el grado de restricción en cada caso.

Por último, el estudio se ha realizado en el hígado y el riñón. La elección de estos dos órganos se debe a que son dos tejidos en los que la generación de radicales libres es más intensa en el organismo, y experimentan cambios importantes durante el envejecimiento.

MATERIAL Y METODOS

I. MATERIAL

1.- Equipo instrumental

- Agitador Vórtex P SELECTA Heidolph reax 1D
- Balanzas de precisión SAUTER 404 y SARTORIUS
- Balanza COBOS precisión Mod. 301
- Balanza electrónica AND EW-300A
- Baño termostatzado con agitación GRANT INSTRUMENTS SS 30 A-13838
- Centrífuga refrigerada KONTRON Hermle ZX 365
- Destilador de agua BIBBY MERIT
- Espectofotómetro MILTON ROY spectronic 1201
- Espectofotómetro MILTON ROY spectronic 601-C
- Homogeneizador mecánico WHEATON INSTRUMENTS
- Membrana de diálisis Servapor, diámetro de poro 6 mm (Serva)
- Multiagitador magnético con placa térmica SBS A-08 y S INVESTER
- Picador de hielo NOUVA ROSSI Mod. Ghiaccio
- Pipetas automáticas GILSON y KARTELL
- pH/mV-metro CRISON D-501 13145
- Sonicador VIBRA CELL SONICS MATERIALS
- Termostatzador con agitación B. BRAUN 3656
- Termostatzador con agitación P SELECTA tectron 3000543

2.- Productos químicos

- Acido ascórbico (Merck)
- Acido clorhídrico (Merck)
- Acido dietilentriamino pentaacético (DTPA) (Sigma)
- Acido sulfúrico (Panreac)
- Albúmina bovina (Sigma)
- Azida Sódica (Sigma)
- Carbonato Sódico (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- EDTA Na₂ (Sigma)
- Etanol (Panreac)
- Ferricianuro potásico (Sigma)
- Ferrocitocromo C tipo IV de corazón de caballo (Sigma)
- Fosfato bipotásico (Panreac)
- Fosfato monopotásico (Panreac)
- Glutación oxidado (Sigma)
- Glutación reducido (Sigma)
- Glutación reductasa tipo III de levadura (Sigma)
- Hidróxido potásico (Panreac)
- Hidróxido sódico (Merck)
- Lubrol (Sigma)
- NADPH (Boehringer)
- Nitrógeno (SEO)
- Peróxido de hidrógeno (Merck)
- Pirogalol (Sigma)
- Reactivo Folin-Ciocalteau (Panreac)
- Sulfato de cobre (Probus)
- Tartrato sódico-potásico (Merck)
- Tris (Merck)
- Triton-X-100 (Sigma)

3.- Animales de experimentación

Este trabajo ha sido realizado con ratones OF1 machos, distribuidos por la casa comercial Iffa Credo (OF1: Oncins France cepa 1).

Estos animales se caracterizan por ser ratones albinos, con una vida media de 540 días y con crecimiento rápido.

El número de nacimientos por camada es de 12,47, el número de supervivientes por camada de 11,66, el número de supervivientes/hembra/semana es de 2,45 y se observa entre ellos un 2,49% de esterilidad.

II. DISEÑO EXPERIMENTAL

1.- Grupos experimentales

Para realizar el presente trabajo se diseñó un modelo experimental en el cual, separando a los ratones en tres grupos, se les sometió a una dieta distinta a cada grupo. Las dietas que se emplearon para la realización de este trabajo fueron del "American Institute of Nutrition" AIN-76, obtenidas de ICN.

Así, los grupos experimentales en base a su tipo de dieta fueron:

1) **GRUPO CONTROL (C):** "ad libitum".

2) **GRUPO DE RESTRICCIÓN CALÓRICA GLOBAL (R):** Este grupo recibió diariamente un 60% de las calorías totales ingeridas por los controles. La restricción se realizó sobre proteínas, lípidos e hidratos de carbono de forma proporcionada a sus concentraciones iniciales. Además la dieta de este grupo está suplementada con minerales y vitaminas de manera que los animales ingieren la misma cantidad de éstos que los controles.

3) **GRUPO DE RESTRICCIÓN EN HIDRATOS DE CARBONO (RH):** Recibió diariamente el 100% del peso de alimento ingerido por los controles, pero de una dieta especial en la cual se reduce las calorías al sustituir hidratos de carbono por material no digerible. La restricción final fue también un 60% de la ingerida por los controles, pero debida sólo a hidratos de carbono. Este grupo ingiere la misma cantidad de vitaminas y minerales que el control. Con este grupo se pretendía poner de relieve el papel de los carbohidratos en el fenómeno de la restricción calórica.

2.- Método de trabajo en la realización de la restricción calórica

Los animales utilizados en este experimento fueron ratones OF1 machos de 12 semanas de edad.

Se utilizaron 21 animales seleccionados en tres grupos de 7 animales cada uno. El criterio para la distribución en cada una de los tres grupos no fue más que conseguir que las medias iniciales de peso corporal fueran lo más homogéneas posible. Los ratones fueron separados individualmente; así se permitía el control de la ingesta de cada uno de los ratones.

Los tres tipos de dietas, debido a las características de éstas, eran suministradas en forma de comida en polvo, por lo cual la comida era depositada en unos comederos especiales que diseñamos para tal efecto. Estos comederos tenían una parte basal metálica de 4 cm de alto, que permitía que los animales tuvieran la comida a una altura accesible y a la vez debido al peso de esta base no tiraran el comedero; la parte superior era de plástico con una abertura por la que el animal podía meter la cabeza y comer.

Previamente al comienzo del experimento todos los grupos experimentales fueron alimentados durante una semana con la dieta control; así los animales se acostumbraron al comedero y a alimentarse con comida en polvo.

Los animales controles eran alimentados "ad libitum". Los animales sometidos a restricción calórica global se les ponía diariamente el 60% del peso ingerido por los controles y al grupo de restricción en hidratos de carbono el 100% del peso de la ingesta de los controles. Para poder realizar esto, la ingesta de los animales controles fue observada semanalmente. Así, la cantidad de comida que se ponía al grupo R o RH era corregida en función de la ingesta de los controles en la última pesada semanal.

A lo largo del período de experimentación también se observó la evolución del peso corporal de los distintos grupos estudiados. Los animales fueron pesados en tres ocasiones: al principio del experimento, a las cuatro semanas y al término de éste.

Los ratones fueron sometidos a ocho semanas de restricción calórica, al término de las cuales fueron sacrificados. Se extrajeron hígado y riñón los cuales fueron congelados para su valoración en las semanas siguientes.

3.- Dietas**1) DIETA CONTROL:**

	<u>%</u>	<u>Kcal/Kg</u>
- Caseína purificada	20,3	924
- Almidón de maíz	65,0	2633
- Fibra	5,2	
- Aceite de maíz	5,0	470
- Vitaminas	1,0	
- Minerales	3,5	
C: 4027 Kcal/Kg		4027

2) DIETA DE RESTRICCIÓN CALORICA GLOBAL:

	<u>%</u>	<u>Kcal/Kg</u>
- Caseína purificada	20,3	924
- Almidón de maíz	65,0	2633
- Fibra	2,2	
- Aceite de maíz	5,0	470
- Vitaminas	1,7	
- Minerales	5,8	
R: 4027 X 0,6 = 2407 Kcal/Kg		4027

3) DIETA DE RESTRICCIÓN EN HIDRATOS DE CARBONO:

	<u>%</u>	<u>Kcal/Kg</u>
- Caseína purificada	20,3	924
- Almidón de maíz	25,0	1013
- Fibra	45,2	
- Aceite de maíz	5,0	470
- Vitaminas	1,0	
- Minerales	3,5	
RH: 2407 Kcal/Kg		2407

III. METODOS ANALITICOS

1.- Preparación de muestras

Los animales fueron sacrificados a las ocho semanas de someterlos a restricción calórica. Los órganos fueron extraídos, divididos en varias porciones y congelados a -28°C hasta el día de su valoración.

Para la preparación de las muestras las porciones de los órganos fueron pesadas en balanzas de precisión, seguidamente se homogeneizaron en tampón fosfato pH 7,4, 50mM, a una concentración de 50 mg de tejido por cada ml de tampón. Se utilizó un homogeneizador automático Wheaton y homogeneizadores de teflón-vidrio (Pobel). La homogeneización se realizó en tres movimientos rodeando a la muestra con hielo picado para evitar el aumento de temperatura debido a la rotación.

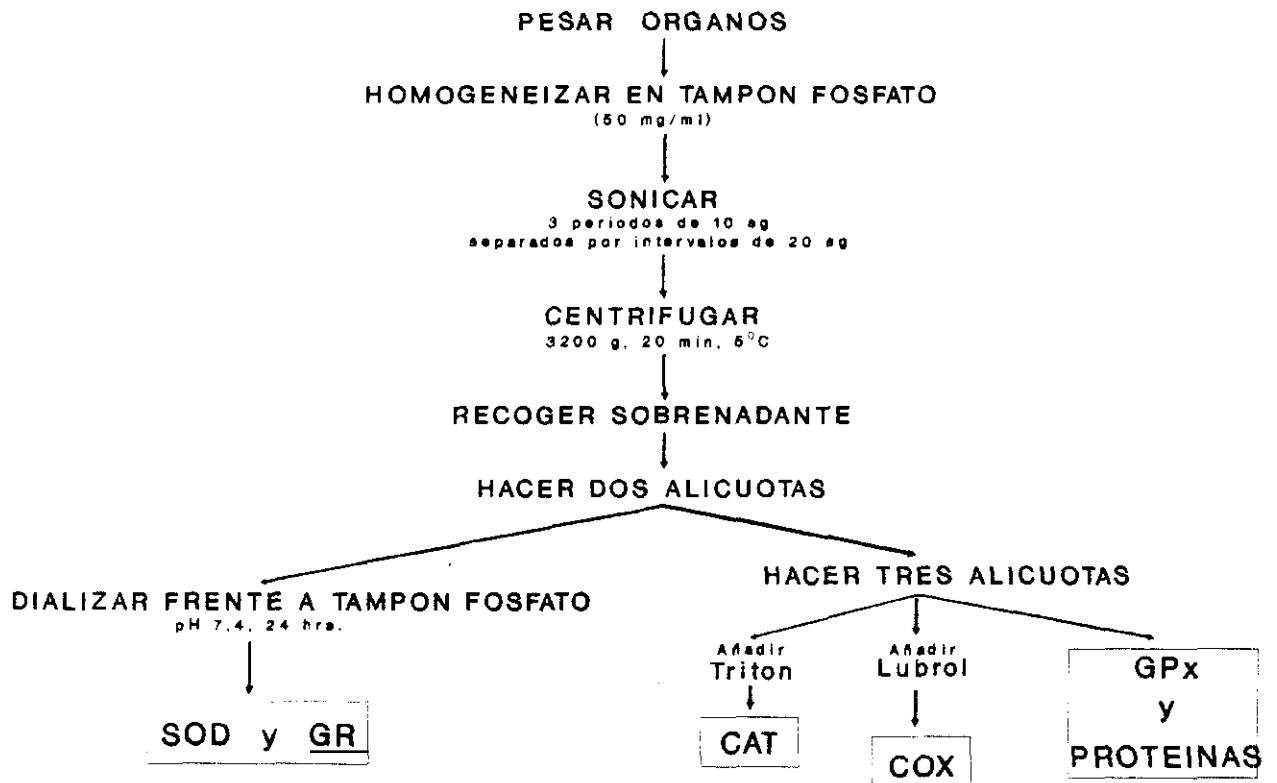
Seguidamente los homogenados fueron sonicados, mantenidos también en frío, en un sonicador Vibra-Cell durante tres períodos de 10 seg con un descanso entre ellos de 20 seg.

A continuación, se centrifugaron a 3200 g durante 20 min a 5°C en centrífuga Kontron. Seguidamente se recogieron los sobrenadantes que fueron mantenidos en frío hasta el momento de su valoración.

Se separaron dos alícuotas de estas muestras. Una de ellas se dializó frente a tampón fosfato pH 7,4, 50mM, durante 24 horas, renovando el tampón de diálisis a las 12 horas. Esta muestra dializada se utilizó para las medidas de las actividades enzimáticas superóxido dismutasa y glutatión reductasa. La otra alícuota, se separó a su vez en tres, a la primera se le añadió lubrol (1mg de lubrol por cada $100\mu\text{l}$ de muestra) para medir la actividad citocromo oxidasa y a la segunda alícuota Triton-X-100 ($10\mu\text{l}$ de Triton al 10% por cada $100\mu\text{l}$ de muestra) para valorar la actividad catalasa. Después de añadir lubrol o Triton se esperó 30 minutos para realizar el ensayo enzimático. La tercera alícuota se utilizó para analizar la actividad glutatión peroxidasa y para la valoración de proteínas.

PREPARACION DE MUESTRAS

Esquema general



2.- Medidas enzimáticas

A. Medida de la actividad superóxido dismutasa

Las medidas de actividades enzimáticas están basadas normalmente en la desaparición de sustrato o en la aparición de productos. La reacción de dismutación que cataliza la SOD no se estudia fácilmente por esos criterios, debido a la naturaleza del sustrato, el radical superóxido, muy inestable. Consecuentemente la medida directa no es usada normalmente para los ensayos de SOD en muestras.

En el presente trabajo hemos usado el método de S. Marklund y G. Marklund (1974) con las modificaciones realizadas por R.F. Del Maestro y W. Mc Donald. Este método indirecto está basado en la autooxidación del pirogalol (1,2,3, benzenotriol) en la cual está implicado el radical superóxido. La SOD tiene la capacidad como sabemos de eliminar radical superóxido, y así mediante cortas reacciones en cadena, disminuye la tasa de autooxidación del pirogalol. La reacción es seguida por el cambio en la absorbancia a 420 nm, longitud de onda en la cual el pirogalol oxidado tiene un máximo de absorbancia.

Se dializaron las muestras, tal y como se explicó en el apartado 1, pues sustancias de bajo peso molecular interfieren en la medida aunque el glutatión no interferiría en esta técnica del pirogalol (Roth y Gilbert, 1984), después hubo que eliminar la hemoglobina presente en dichas muestras pues interfiere en la reacción. Para ello se añadió 0,33 ml de etanol y 0,18ml de cloroformo por cada ml de muestra, a continuación se agitó durante 5 minutos en Vortex, seguidamente se centrifugó a 1200g durante 10 min a 5°C, se recogió el sobrenadante y con éste se realizaron las medidas. Este tratamiento no altera la actividad SOD-Cu-Zn que representa más del 90% de la actividad SOD en los tejidos estudiados.

Para este ensayo los reactivos usados fueron:

- Tampón Tris 50mM, pH 7,4, con DTPA 1mM
- Pirogalol 24mM preparado en CIH 10mM

El tampón Tris se burbujeaba durante 20 minutos antes de la valoración. El pirogalol era preparado en el momento justo de realizar el ensayo y mantenido en hielo picado durante las valoraciones.

La actividad SOD se midió en presencia y ausencia de muestra. Se hicieron varias reacciones control (sin muestra), al principio y al final de la serie de medidas que realizábamos en el día.

Las medidas se realizaron en microcubetas de cuarzo que contenían:

- 0,75 ml de Tris- DTPA
- 25 μ l de muestra
- 25 μ l de pirogalol

En las reacciones control los 25 μ l de muestra fueron sustituidos por Tris-DTPA. La reacción comenzaba en el momento de añadir el pirogalol y la duración de la medida era de 5 minutos. El ensayo era realizado a 25°C, manteniendo el compartimento de la cubeta y la solución Tris-DTPA termostatizados.

Finalmente los cálculos de la actividad SOD fueron realizados según las siguientes expresiones:

$$\%Inhibición = \frac{\Delta DO_{Control} - \Delta DO_{Muestra}}{\Delta DO_{Control}}$$

$$USOD[mgtej] = \frac{\%inhibición}{50} \cdot \frac{V_r \cdot F}{V_m \cdot X}$$

siendo:

- $\Delta DO_{Control}$: incremento de absorbancia por minuto de la reacción control
- $\Delta DO_{Muestra}$: incremento de absorbancia por minuto de la reacción con muestra
- V_t : Volumen total en la cubeta
- F : factor de dilución de la muestra
- V_m : Volumen de muestra
- X : mg de tej por ml de tampón fosfato usado en la homogeneización

La actividad específica (U SOD/mg proteína) fue calculada una vez valoradas las proteínas por el método Lowry *et al.*

B.- Medida de la actividad catalasa

La medida de la actividad catalasa fue determinada por el método de Beers y Sizer (1952), el cual se basa en el descenso de la absorbancia a 240 nm por unidad de tiempo debido a la descomposición del H_2O_2 por la catalasa.

Después de añadir Triton-X-100 a los sobrenadantes, como ya se indicó en el apartado 1, se esperó 30 minutos y se procedió entonces a realizar el ensayo.

Para este ensayo se utilizó:

- Tampón fosfato 50mM, pH 7,4
- H_2O_2 14mM

Las medidas se realizaron con microcubetas de cuarzo, con un paso de luz de 1 cm. A la cubeta se añadía:

- 0,67 ml de H₂O₂
- 30 μ l de muestra

La reacción comenzaba en el momento de añadir la muestra, la duración del ensayo era de un minuto. La temperatura a la que se realizaba era de 25°C.

Para los blancos (0 absorbancia) se usó tampón fosfato en lugar de H₂O₂ y 30 μ l de muestra.

Los cálculos de la actividad catalasa se hicieron según la siguiente formula:

$$ACT.CAT\ Total(\mu moles\ H_2O_2/min.mg\ tej) = \frac{\Delta DO/min.V_t.F.1,1}{e.V_m.X}$$

siendo:

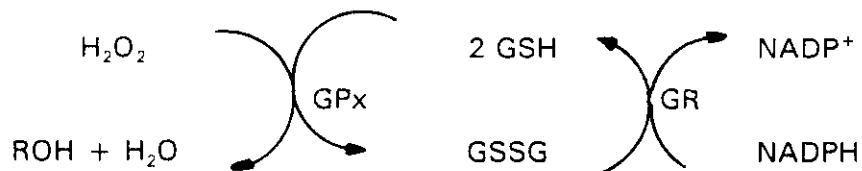
- $\Delta DO/min$: incremento de absorbancia por minuto
- V_t : Volumen total en la cubeta
- F : Factor de dilución de la muestra
- 1,1 : Factor de dilución debido al triton
- ϵ : Coeficiente de extinción molar del H₂O₂ ($43,6 \cdot 10^{-3} \mu M^{-1}.cm^{-1}$)
- V_m : Volumen de la muestra
- X : mg de tejido por cada ml de tampón utilizado al homogeneizar

La actividad específica fue calculada realizando una valoración de proteínas por el método de Lowry *et al.*

C.- Medida de la actividad glutatión peroxidasa

Para la medida de la actividad glutatión peroxidasa hemos utilizado el método de Paglia y Valentine (1967). Este método está basado en la capacidad de la Glutatión peroxidasa dependiente de selenio de catalizar la destrucción de peróxidos inorgánicos como el H_2O_2 . Con este método se mide la tasa de oxidación del GSH por H_2O_2 , catalizada por la glutatión peroxidasa presente en la muestra, para ello se sigue el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH en presencia de exceso de glutatión reductasa.

Estas reacciones acopladas serían:



Para este ensayo se utilizaron las siguiente soluciones:

* Solución reactiva:

- 3,4 mg de Azida Sódica
- 4,8 mg de EDTA
- 15,8 mg de GSH
- 2,4 mg de NADPH
- 13 unidades de GR
- 12 ml de tampón fosfato

* Solución de H_2O_2 0,071 mM

La solución reactiva se prepara burbujeando con nitrógeno durante 10 minutos antes de añadir los distintos componentes. Después de disolver los distintos componentes se vuelve a burbujear y se mantiene tapado. Esta solución se preparó siempre en el momento de su utilización.

En este ensayo enzimático hay que tener en cuenta que aún en ausencia de enzima, existe siempre reacción. Por ello realizábamos siempre una reacción en ausencia de muestra, que denominábamos no catalizada, para poder cuantificar la reacción espontánea.

En la reacción no catalizada se añadió a la cubeta:

- 0,65 ml de solución reactiva
- 25 μ l de tampón fosfato
- 25 μ l de H₂O₂

Antes de añadir el peróxido de hidrógeno la reacción se dejaba incubar durante 4 minutos. Esta reacción se ponía en marcha en el momento de añadir el H₂O₂ y se medía el descenso de absorbancia a 340 nm durante 5 minutos. El blanco (0 absorbancia) se hacía con la solución reactiva y tampón fosfato antes de añadir el H₂O₂.

La reacción no catalizada contenía:

- 0,65 ml de solución reactiva
- 25 μ l de muestra
- 25 μ l de H₂O₂

Antes de añadir el H₂O₂ se incubaba durante 4 minutos, y de la misma manera que en la reacción no catalizada el blanco se hacía con la solución reactiva y la muestra. En el momento de añadir el H₂O₂ se iniciaba la reacción que duraba también 5 minutos.

Las cubetas donde se realizaron los ensayos eran microcubetas de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. La reacción se hizo a 25°C manteniendo el compartimento de

la cubeta y la solución reactiva termostatzados.

Los cálculos de la actividad glutatión peroxidasa se hicieron según la siguiente expresión:

$$ACT.GPx \text{ Total}(\text{nmoles NADPH}/\text{min.mg tej}) = \frac{\Delta DO/\text{min} \cdot V_t \cdot F}{\epsilon \cdot V_m \cdot X}$$

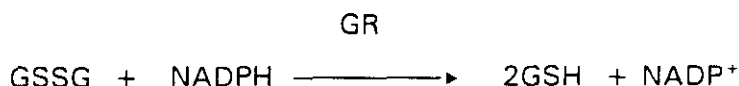
siendo:

- $\Delta DO/\text{min}$: incremento de absorbancia por minuto
- V_t : volumen total en la cubeta
- F : factor de dilución de la muestra
- ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm
($6,22 \cdot 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- V_m : volumen de la muestra
- X : 50 mg de tejido/ml de tampón fosfato

Después de la determinación de las proteínas los cálculos se expresaron como actividad específica.

D.- Medida de la actividad glutatión reductasa

Como ya se explicó en el apartado de Introducción el enzima glutatión reductasa cataliza la reducción del glutatión utilizando NADPH como fuente de equivalentes de reducción.



El presente método se basa en el seguimiento de la oxidación del NADPH, siendo la longitud de onda empleada 340 nm.

Las soluciones empleadas en esta valoración fueron:

- tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM
- NADPH 6mM (0,3 mM en cubeta)
- GSSG 80mM (4 mM en cubeta)

Una vez dializadas las muestras, tal y como se describió en el apartado 1, se procedió a su valoración. Se utilizaron microcubetas de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. La reacción se llevaba añadiendo a la cubeta:

- 0,58 ml de tampón fosfato + EDTA
- 50 μ l de muestra
- 35 μ l de GSSG
- 35 μ l de NADPH

La reacción era seguida durante 4 minutos después de esperar 30 segundos de retraso inicial. Se llevaba a cabo además, en cada serie de ensayos realizados en el día, una reacción no catalizada en la que se sustituía la muestra por 50 μ l de tampón fosfato + EDTA. Al realizar esta reacción se cuantificaba la oxidación producida espontáneamente la cual se tenía en cuenta para los cálculos de la actividad. El blanco (0 absorbancia) se hacía con el tampón fosfato + EDTA y la muestra, o sólo tampón fosfato + EDTA en el caso de la no catalizada.

La reacción se realizó a 25°C de la misma manera que en los ensayos del resto de enzimas.

El cálculo de la actividad enzimática se realizó mediante la siguiente expresión:

$$ACT.GR \text{ Total}(\text{nmoles NADPH}/\text{min.mg tej}) = \frac{\Delta DO/\text{min} \cdot V_t \cdot F}{\epsilon \cdot V_m \cdot X}$$

siendo:

- $\Delta DO/\text{min}$: incremento de absorbancia por minuto resultado de restar el incremento de absorbancia por minuto de la reacción no catalizada a el de la reacción catalizada.
- V_t : volumen total en la cubeta
- F : factor de dilución de la muestra
- ϵ : coeficiente de extinción molar de NADPH a 340 nm ($6,22 \cdot 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- V_m : volumen de muestra
- X : mg de tejido por cada ml de tampón utilizado en la homogeneización.

La actividad específica fue calculada una vez valoradas las proteínas por el método de Lowry *et al.*

E.- Medida de la actividad citocromo oxidasa

La medida de la actividad citocromo oxidasa fue determinada por el método de L. Smith (1955). Este método se basa en el seguimiento a 550 nm de la tasa de oxidación del citocromo c reducido.

Después de añadir lubrol a los sobrenadantes como se indico en el apartado 1, se esperó 30 minutos y se procedió a realizar el ensayo.

Para realizar el presente ensayo se necesitaba citocromo reducido el cual se obtuvo, reduciendo el citocromo c comercial disuelto en tampón fosfato 50mM pH 7,4, con ascorbato (0,6 ml fosfato + 6 mg citocromo c + 3 mg de ascorbato). El ascorbato se eliminaba dializando frente a tampón fosfato 50mM pH 7,4, durante 24 hrs. renovando el tampón a las 12 hrs.

La medida se realizó durante 30 segundos después de añadir los siguientes reactivos a una microcubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz:

- 0,65 ml tampón fosfato
- 50 μ l de citocromo c reducido (56 μ M en cubeta)
- 20 μ l de muestra

El blanco (0 absorbancia) se hizo sustituyendo los 20 μ l de muestra por 20 μ l de ferricianuro potásico 33mM (0,9 mM en cubeta), se esperaba 5 minutos y se hacía el 0 de absorbacia. La misión del ferricianuro es la de oxidar al citocromo, y así tener el blanco con citocromo oxidado.

Las medidas fueron realizadas a 25°C manteniendo el tampón fosfato y el compartimento de la cubeta termostatizados.

Los cálculos de realizaron según la siguiente fórmula:

$$ACT.COX \text{ Total}(\text{nmoles cit.c ox./min.mg tej}) = \frac{\Delta DO/\text{min} \cdot V_r \cdot F}{\epsilon \cdot V_m \cdot X}$$

siendo:

- $\Delta DO/\text{min}$: incremento de absorbancia por minuto
- V_t : volumen total en la cubeta
- F : factor de dilución de la muestra
- ϵ : coeficiente de extinción molar ($18,5 \cdot 10^3 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- V_m : volumen de la muestra
- X : 50 mg de tejido/ml de tampón fosfato

La actividad citocromo oxidasa específica fue calculada después de realizar la correspondiente valoración de proteínas.

3.- Valoración de proteínas

Para la valoración de proteínas necesaria para la obtención de las actividades específicas de los enzimas anteriores, se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951). Esta técnica colorimétrica está basada en la interacción del reactivo de Folin (fosfomolibdotúngstico) con los grupos fenólicos de la tirosina, la cual está presente en muchas proteínas. Esta interacción da lugar a color, la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteína.

Para que las tirosinas resulten accesibles al reactivo de Folin es necesario la presencia de iones cobre, formando complejos Cu-proteína, así las tirosinas quedan expuestas al medio acuoso.

Los reactivos usados fueron:

- reactivo A : Na CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N
- reactivo B : $\text{Cu SO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ al 1%
- reactivo C : Tartrato Na-K al 2%
- reactivo de Folin

Se añadió a cada tubo de ensayo, 0,05 ml de muestra y 0,95 ml de H₂O destilada. En el blanco se añadió 1 ml de H₂O destilada. Seguidamente se hizo una mezcla con los reactivos A, B y C en las proporciones 100/1/1 respectivamente. Se añadió a cada tubo 5 ml de esta mezcla y posteriormente se incubó a 30°C durante 15 minutos. A continuación se añadió 0,5 ml de una mezcla de reactivo Folin y H₂O destilada a partes iguales. Seguidamente se incubó a 30°C durante 30 minutos. Las dos incubaciones realizadas se hicieron con agitación. Por último, se realizó la lectura colorimétrica a 546 nm.

La curva patrón se construyó a partir de una solución de albúmina bovina en H₂O destilada con una concentración de 8 mg/ml, y a partir de ésta se hicieron las distintas diluciones. El intervalo de concentraciones empleado para la curva patrón fue desde 0,4 mg albúmina/0,05 ml, hasta 0,038 mg albúmina/0,05 ml, obteniéndose así la siguiente recta de regresión :

$$\text{mg prot/mg tej} = \frac{DO-a}{b} \cdot 20 \cdot \frac{1}{X}$$

siendo:

- a = 0,07417141793
- b = 1,029253148
- X: 50 mg tej./ml de tampón empleado en la homogeneización
- coeficiente de regresión r = 0,968

4.- Métodos estadísticos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el trabajo experimental se realizaron los siguientes tratamientos estadísticos:

A. Características muestrales

De cada conjunto de datos se obtuvo:

- Media aritmética de cada grupo de datos
- Error estándar de la media

B. Análisis estadístico

- Análisis de varianza de una vía.

Se usó este procedimiento para analizar los parámetros valorados en función del tipo de tratamiento y para analizar en función del tiempo de tratamiento la variación de ciertos parámetros (peso corporal, ingesta) dentro de cada grupo experimental.

- Test de mínima diferencia significativa (LSD).

Este test se aplicó *a posteriori* y permitió precisar las diferencias entre grupos en los casos en los que se obtuvo significación en el análisis de varianza previo. En todos los casos se tomó como mínimo grado de confianza $p < 0,05$.

RESULTADOS

I. PESO DE LA INGESTA. (Figura 1, tabla I)

Como ya se explicó en el apartado de Materiales y Métodos se realizó un seguimiento a lo largo del período de experimentación del peso de la ingesta de los animales controles.

Este valor no varió significativamente durante el estudio. En la figura 1 se puede observar la evolución de este parámetro durante las 8 semanas de experimentación.

II. PESO DE ANIMALES (Figura 2, tabla II)

A lo largo del período de experimentación se hizo un seguimiento del peso corporal de los tres grupos experimentales. Los resultados de dicho seguimiento se pueden observar en la figura 2.

Los resultados se analizaron tanto longitudinalmente (evolución del peso corporal dentro de cada grupo) como transversalmente (diferencias del peso entre los distintos grupos).

1.- Estudio longitudinal

En el grupo de **animales controles**, se observa un aumento progresivo del peso corporal de los animales a lo largo del estudio. Estos valores, respecto al inicio del experimento (12 semanas), son significativamente mayores a las 16 semanas ($p < 0,05$) y a las 20 semanas ($p < 0,001$).

En el grupo de **restricción calórica global** se observa un aumento del peso durante las 8 semanas que dura el estudio. Durante las cuatro primeras semanas no se observa variación significativa del peso corporal. Sin embargo, en las cuatro últimas

semanas si se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) del peso.

En los animales **restringidos en hidratos de carbono** durante las 4 primeras semanas se observa una disminución altamente significativa del peso corporal ($p < 0,001$). En las cuatro siguientes semanas este peso se mantiene no habiendo diferencias significativas respecto al valor a las 4 semanas, el resultado del peso en este punto varía significativamente ($p < 0,05$) respecto al valor al principio del experimento.

2.- Estudio transversal

Al principio del experimento, evidentemente, los pesos medios de los distintos grupos eran muy homogéneos, pues como ya se ha explicado en Material y Métodos, el criterio para distribuir a los ratones en los tres grupos era conseguir que el peso medio fuera similar.

A las cuatro semanas de tratamiento cuando los animales contaban con 16 semanas de edad, el peso de los animales de restricción calórica global (R) era significativamente menor ($p < 0,01$) que el grupo control. En este mismo punto, el peso de los animales restringidos en hidratos de carbono (RH) también variaba significativamente con respecto al grupo control, pero en este caso la significación era aún mayor ($p < 0,001$), ya que en este caso el descenso de peso era más alto que en grupo anterior. Entre los dos grupos de tratamiento R y RH existían también diferencias significativas ($p < 0,05$).

A las ocho semanas de tratamiento, el peso corporal del grupo R era significativamente menor ($p < 0,001$) que el grupo control, y las diferencias habían aumentado con respecto al punto anterior. En este punto también el grupo RH mostraba *variaciones significativas ($p < 0,001$) con respecto al grupo control*. Entre los dos grupos de tratamiento R y RH también se observaban diferencias significativas ($p < 0,05$).

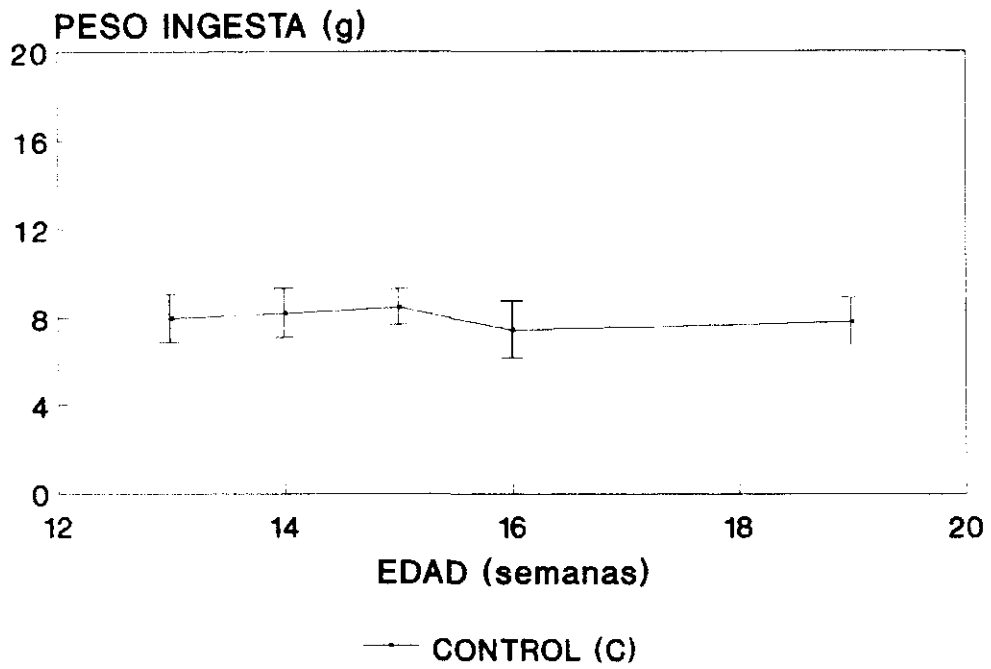


Figura 1.- Ingesta de los animales controles a lo largo del período de experimentación.

Tabla I. Variación del peso de la ingesta de los animales control a lo largo del período de experimentación.

INGESTA DEL GRUPO CONTROL (gr)	
13 semanas	7,98 ± 1,12 (10)
14 semanas	8,21 ± 1,16 (7)
15 semanas	8,47 ± 0,86 (7)
16 semanas	7,44 ± 1,35 (7)
19 semanas	7,80 ± 1,11 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.

() = número de datos.

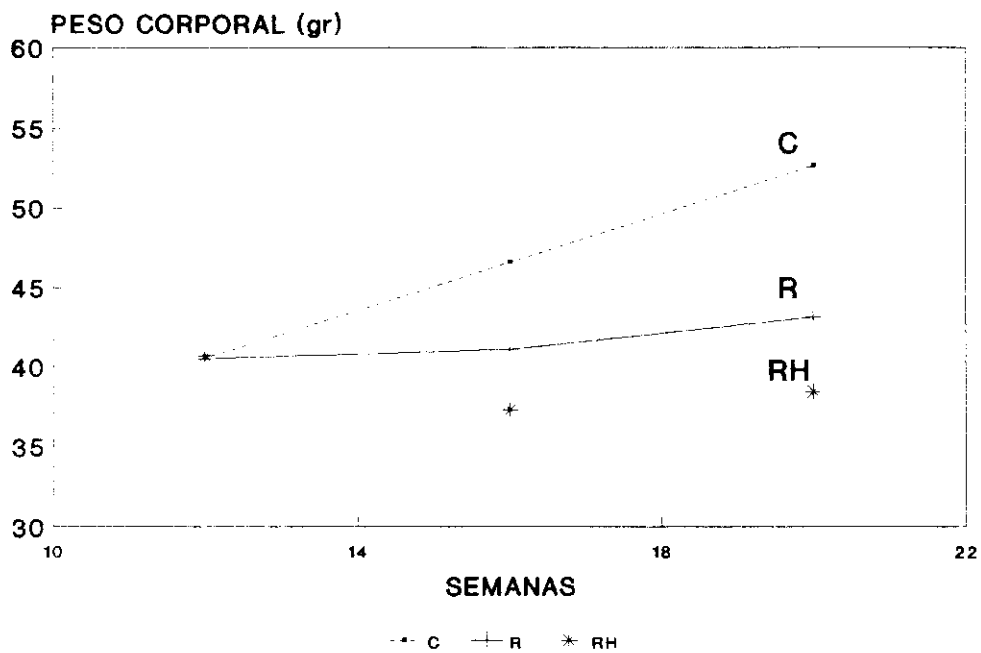


Figura 2.- Peso corporal de los animales objeto del estudio a lo largo del período de experimentación.

Tabla II. Variación del peso corporal de los animales objeto del estudio a lo largo del período de experimentación.

PESO CORPORAL (gr)			
	<u>12 semanas</u>	<u>16 semanas</u>	<u>20 semanas</u>
C	40,56 ± 0,62	46,57 ± 1,74 ^{a*}	52,63 ± 2,49 ^{a***}
R	40,50 ± 0,47	41,09 ± 0,82 ^{b**}	43,13 ± 0,68 ^{b***}
	↑	↑	
	*	*	
	↓	↓	
RH	40,69 ± 0,69	37,29 ± 0,47 ^{b***}	38,41 ± 0,65 ^{b***}
		a***	a***

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.

Los asteriscos muestran las diferencias significativas existentes con respecto al grupo control (C).

a: diferencias significativas dentro del mismo tratamiento con respecto al grupo de 12 semanas.

b: diferencias significativas con respecto al grupo control en un mismo tiempo.

* p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001

El número de datos en todos los casos fueron 7.

III. ACTIVIDADES ENZIMATICAS

1.- HIGADO

A. Superóxido-dismutasa (Figura 3, tabla III)

No se observa ninguna variación en la actividad total (U SOD/mg de tejido) ni en la actividad específica (U SOD/mg de proteína) en los grupos R y RH con respecto al control. Tampoco existen diferencias significativas entre los grupos R y RH.

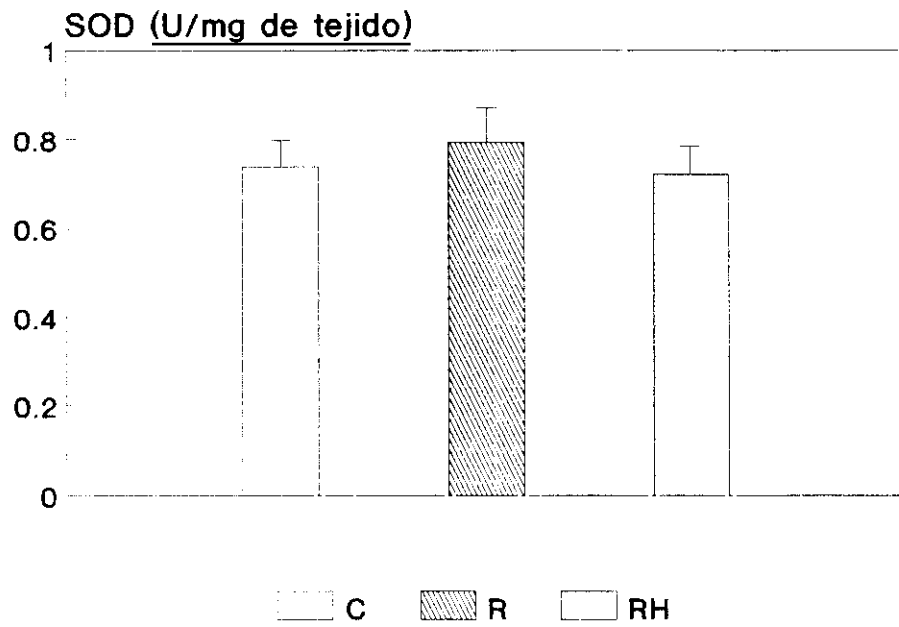
Se observa sin embargo, que en el grupo R existe un pequeño aumento de la actividad SOD respecto a los otros dos grupos, tanto en la actividad específica como en la total.

B. Catalasa (Figura 4, tabla IV)

No se observa ninguna variación significativa de la actividad catalasa, ya sea total o específica, de los grupos R y RH respecto al control. Tampoco existen diferencias significativas de los grupos R Y RH entre si. Se observa, sin embargo un ligero aumento de la actividad catalásica en el grupo R tanto respecto al control como al grupo RH, pero como se ha dicho antes este aumento no llega a ser significativo.

C. Glutación-peroxidasa (Figura 5, Tabla V)

En la actividad Se-GPx (específica y total), no se observa ningún efecto debido a la restricción calórica global, ni debido a la restricción en hidratos de carbono. Tampoco existen diferencias significativas entre estos dos grupos. No obstante, aunque no llega a ser significativo, se ve que la actividad GPx (específica y total) aumenta en el grupo R y en el grupo RH este aumento es aún mayor.



HIGADO

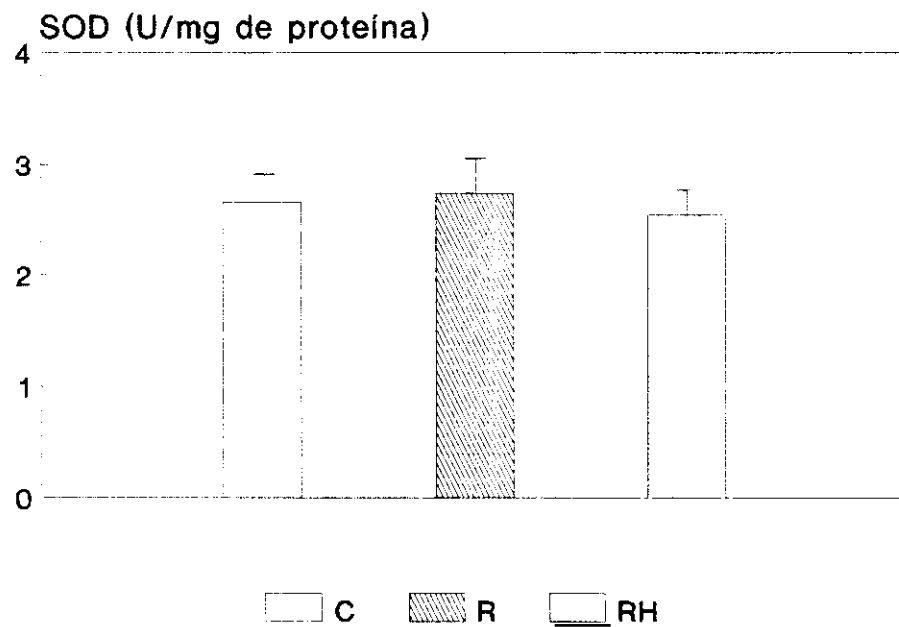


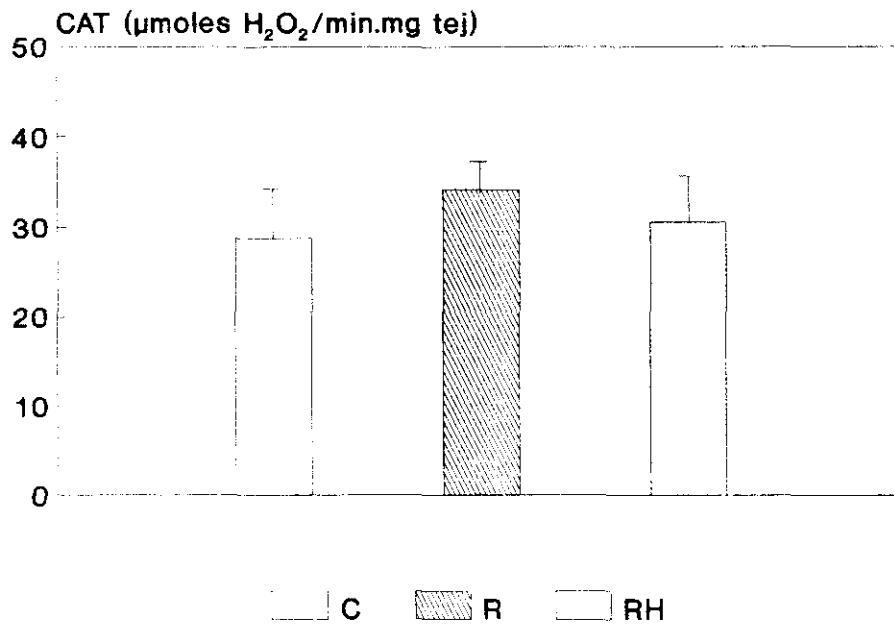
Figura 3.- Actividad SOD, específica y total, en hígado de ratones controles (C), restringidos (R) y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla III. Actividad SOD en hígado de ratones controles (C), restringidos (R) y restringidos en hidratos de carbono (RH).

SOD HIGADO

	<u>U SOD/mg de tejido</u>	<u>U SOD/mg de proteína</u>
C	0,739 ± 0,058 (7)	2,66 ± 0,23 (7)
R	0,793 ± 0,079 (7)	2,74 ± 0,28 (7)
RH	0,723 ± 0,059 (7)	2,54 ± 0,22 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.
() = número de datos



HIGADO

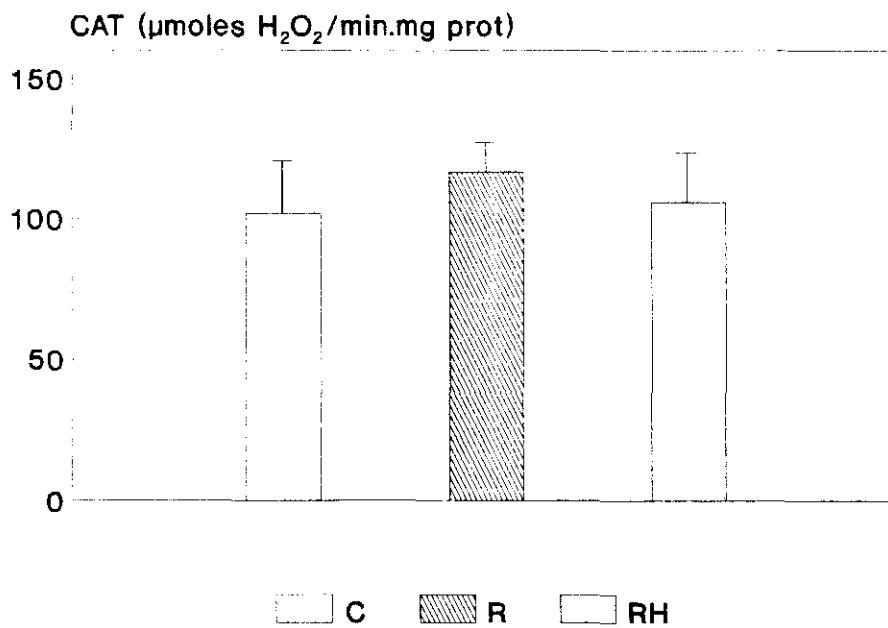


Figura 4.- Actividad CAT, total y específica, en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

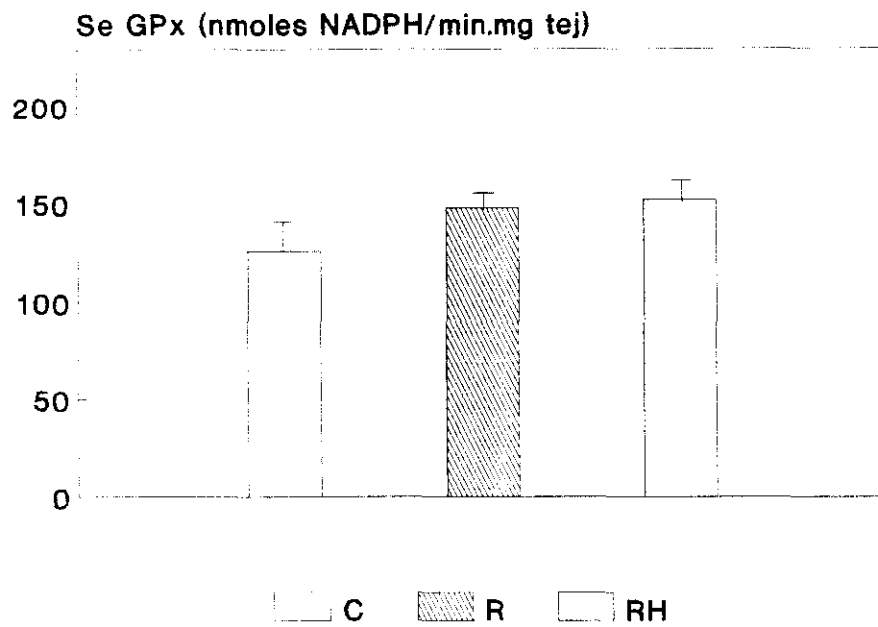
Tabla IV. Actividad CAT en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

CAT HIGADO

	<u>$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min.mg tej}$</u>	<u>$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min.mg prot}$</u>
C	28,7 \pm 5,7 (7)	102 \pm 20 (7)
R	34,2 \pm 3,5 (7)	117 \pm 10 (7)
RH	30,6 \pm 5,4 (7)	106 \pm 18 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética \pm error estándar.

() = número de datos



HIGADO

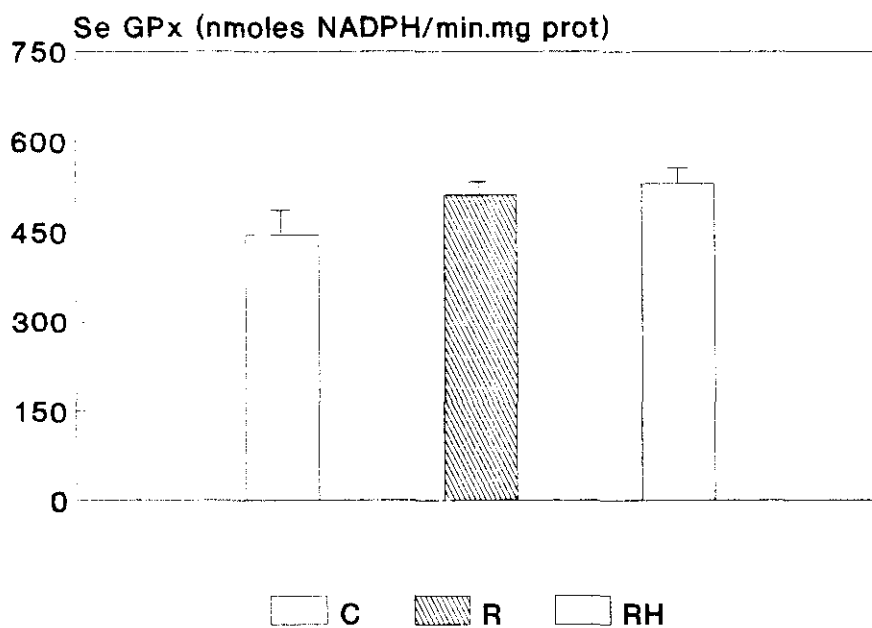


Figura 5.- Actividad GPx Se-dependiente en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla V. Actividad GPx Se dependiente en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

GPx HIGADO

	<u>nmoles NADPH/min.mg tej</u>	<u>nmoles NADPH/min.mg prot</u>
C	126 ± 14 (7)	445 ± 38 (7)
R	148 ± 8 (7)	511 ± 24 (7)
RH	152 ± 10 (7)	531 ± 23 (7)

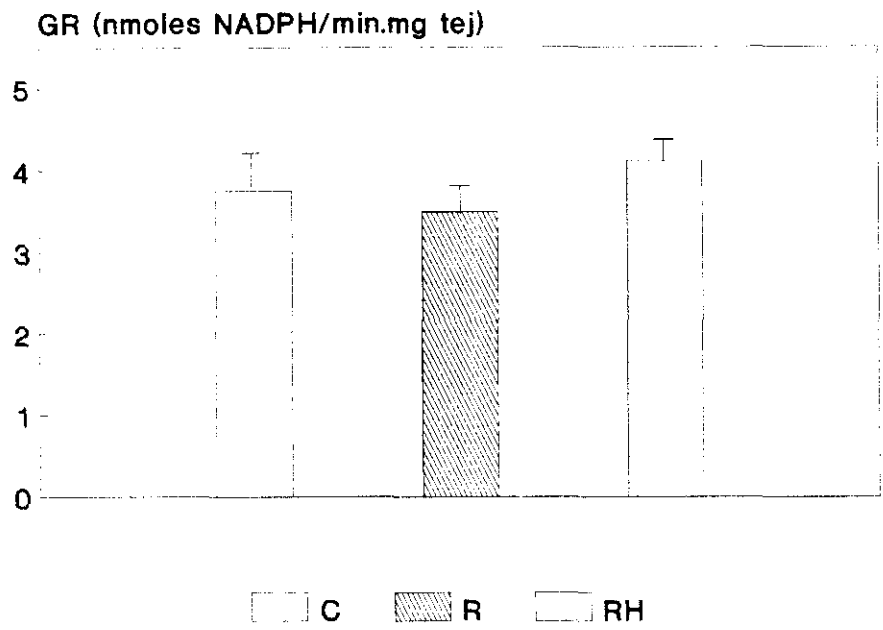
Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.
() = número de datos

D. Glutación-reductasa (Figura 6, tabla VI)

No se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos en lo que se refiere a la actividad glutatión reductasa ya sea la actividad referida a mg de tejido (total) como referida a mg de proteína (específica). Existe una ligera disminución de la actividad GR (específica y total) en el grupo R pero sin llegar a ser significativo.

E. Citocromo-oxidasa (Figura 7, Tabla VII)

Respecto a la actividad COX , ya sea total o específica, no existe ningún efecto sobre ésta de la restricción calórica global ni de la restricción en hidratos de carbono. Tampoco existen diferencias significativas entre estos dos grupos (R y RH). Sin llegar a ser significativo existe un ligero aumento de la actividad COX total y específica en el grupo de restricción calórica global.



HIGADO

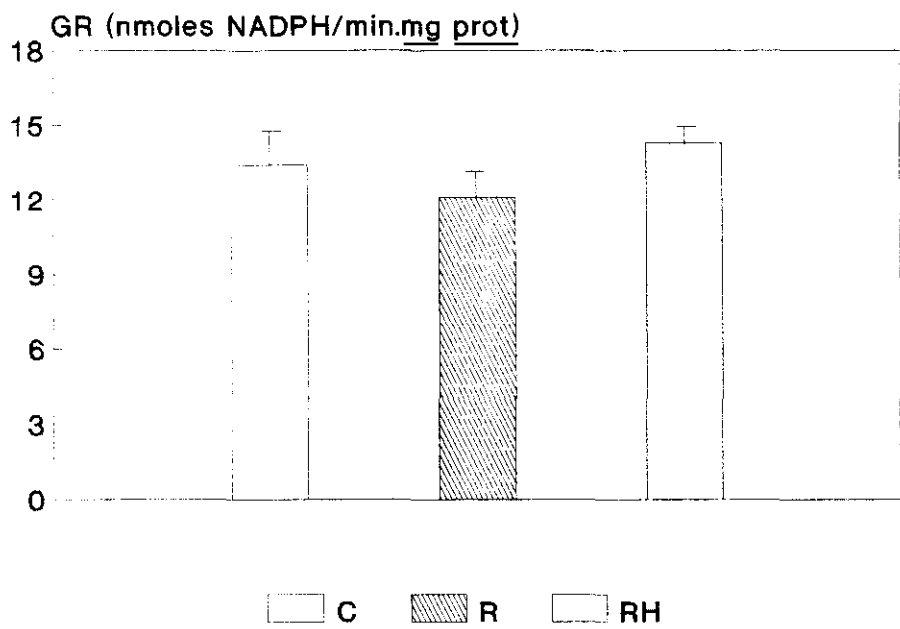


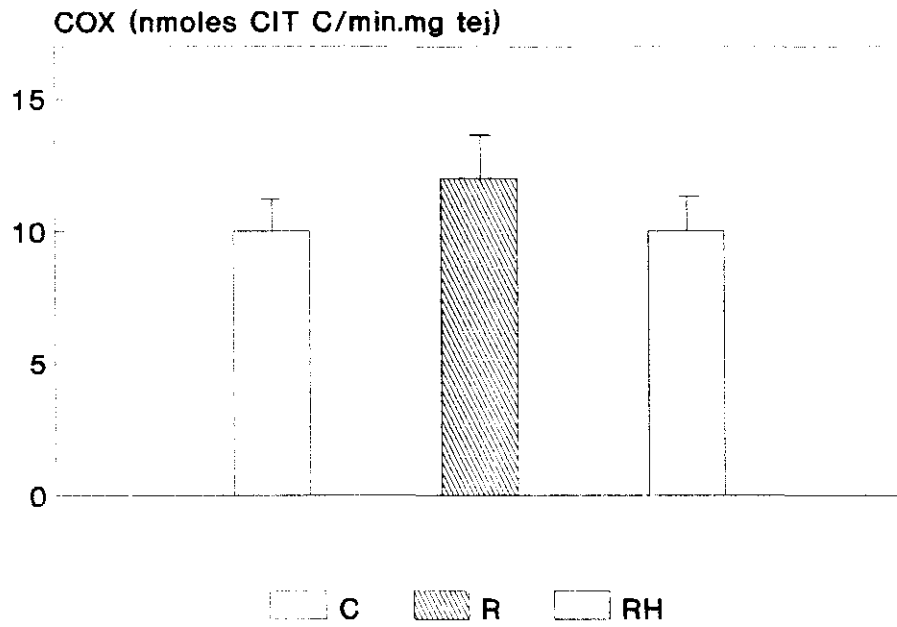
Figura 6.- Actividad GR, total y específica, en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla VI. Actividad GR en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

GR HIGADO

	<u>nmoles NADPH/min.mg tej</u>	<u>nmoles NADPH/min.mg prot</u>
C	3,76 ± 0,46 (7)	13,4 ± 1,4 (7)
R	3,5 ± 0,35 (7)	12,1 ± 1,2 (7)
RH	4,12 ± 0,27 (7)	14,3 ± 0,7 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.
() = número de datos



HIGADO

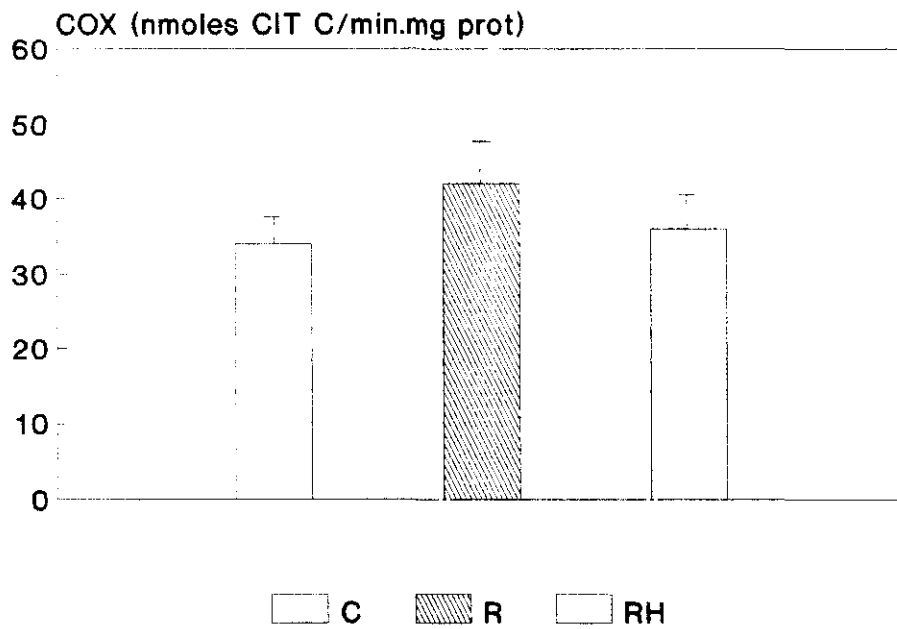


Figura 7.- Actividad COX en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla VII. Actividad COX en el hígado de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

COX HIGADO

	<u>nmoles CIT C/min.mg tej</u>	<u>nmoles CIT C/min.mg prot</u>
C	9,6 ± 1,2 (7)	33,6 ± 3,5 (7)
R	12,3 ± 1,7 (7)	42,4 ± 5,9 (7)
RH	10,2 ± 1,4 (7)	35,7 ± 4,7 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.
() = número de datos

2.- RIÑÓN

A. Superóxido-dismutasa (Figura 8, tabla VIII)

No se han encontrado variaciones significativas en la actividad SOD tanto específica como total, en ningún grupo experimental. Sin embargo, se observa un aumento de ésta enzima en el grupo R tanto en la actividad específica como total, aunque este aumento no llega a ser significativo.

B. Catalasa (Figura 9, tabla IX)

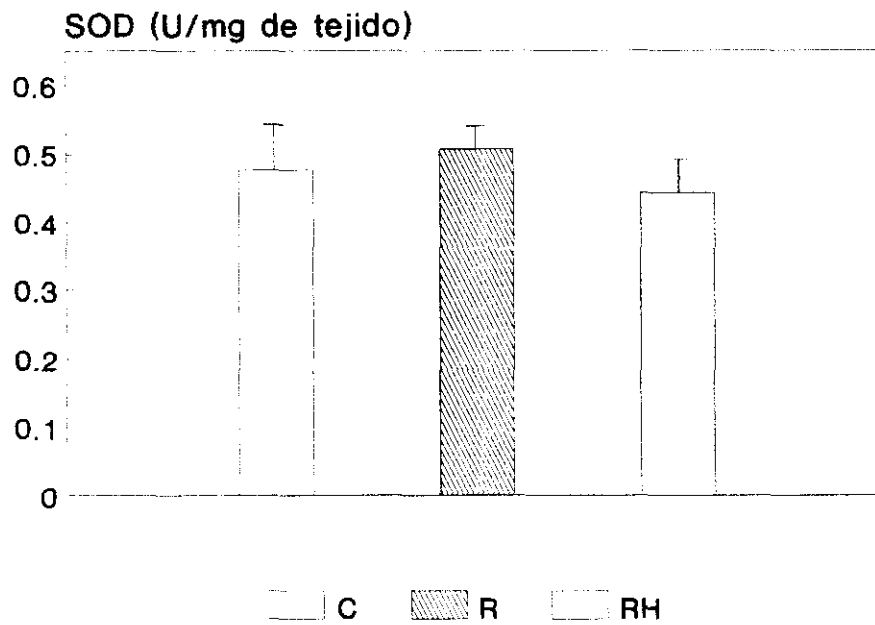
La actividad catalásica de riñón no se ha visto modificada significativamente en los distintos grupos experimentales tanto para la actividad total como para la específica. Se puede apreciar sin embargo, un ligero aumento, que no llega a ser significativo, de la actividad catalasa en el grupo R.

C. Glutación-peroxidasa (Figura 10, tabla X)

En el grupo de restricción en hidratos de carbono se produce un aumento de la actividad Se-GPx con respecto al grupo control ($p < 0,01$) tanto para la actividad Se-GPx total como específica. En el grupo de restricción calórica global no se observa ningún cambio significativo, aunque el valor de la actividad Se-GPx es ligeramente mayor que el grupo control. Tampoco se dan diferencias significativas entre el grupo de restricción calórica global y restricción en hidratos de carbono.

D. Glutación-reductasa (Figura 11, tabla XI)

La actividad GR (específica y total) no se ha visto modificada significativamente entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, se observa que esta actividad disminuye ligeramente en los dos grupos de tratamiento con respecto al control, pero sin llegar a ser significativo. No existe ningún cambio de los grupos R y RH entre sí.



RIÑÓN

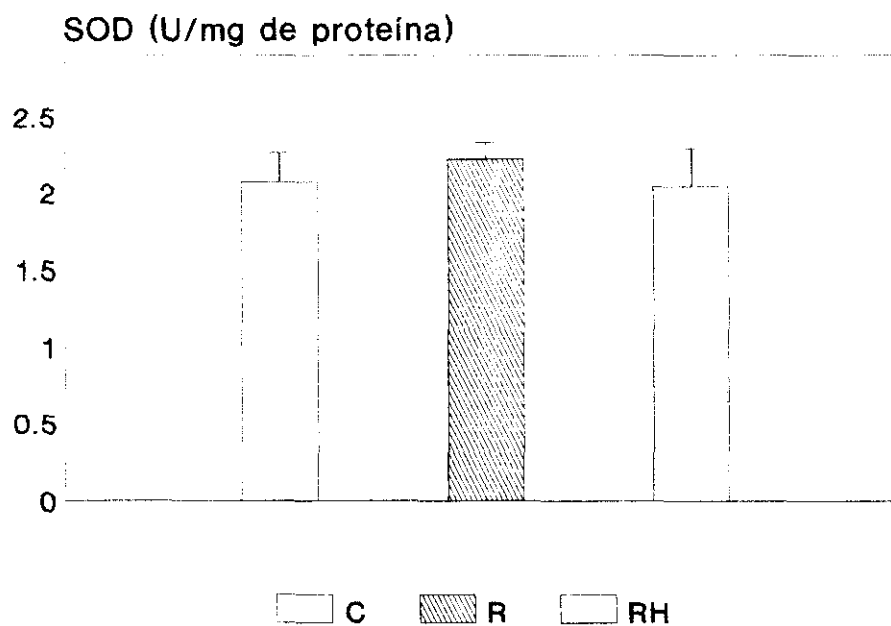


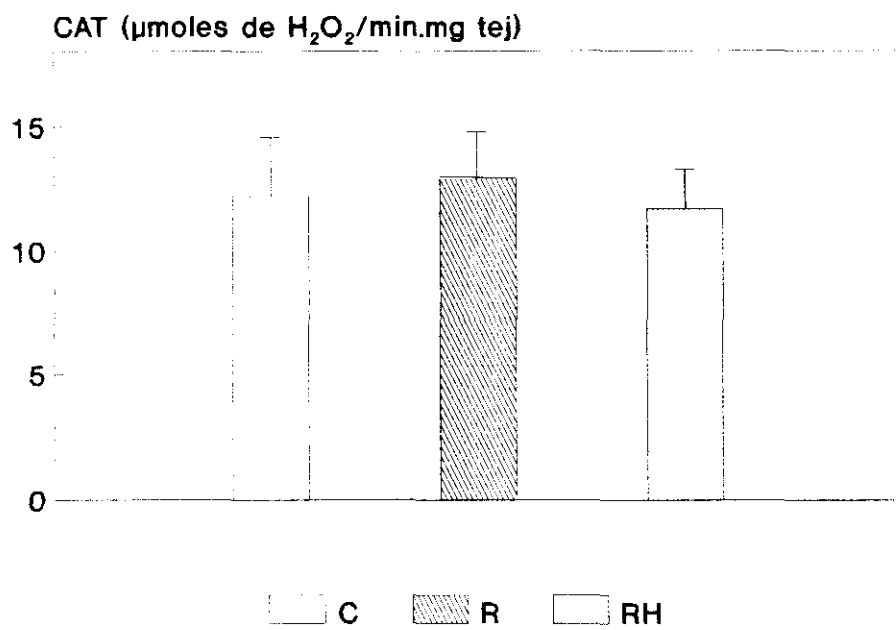
Figura 8.- Actividad SOD, total y específica, en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R) y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla VIII. Actividad SOD en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R) y restringidos en hidratos de carbono (RH).

SOD RIÑÓN

	<u>U SOD/mg de tejido</u>	<u>U SOD/mg de proteína</u>
C	0,477 ± 0,065 (7)	2,07 ± 0,19 (7)
R	0,507 ± 0,033 (7)	2,22 ± 0,12 (7)
RH	0,443 ± 0,048 (7)	2,04 ± 0,25 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.
() = número de datos



RIÑÓN

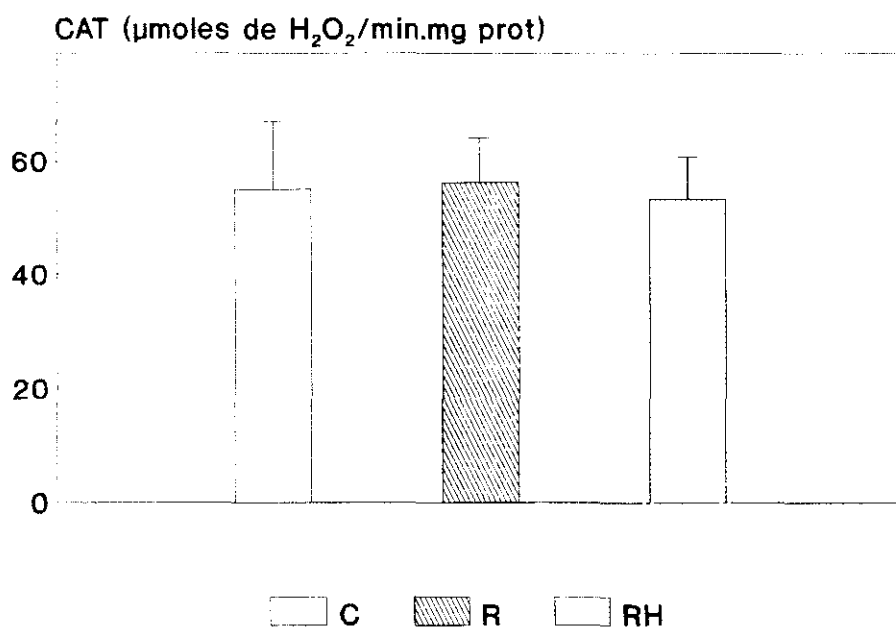


Figura 9.- Actividad CAT en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

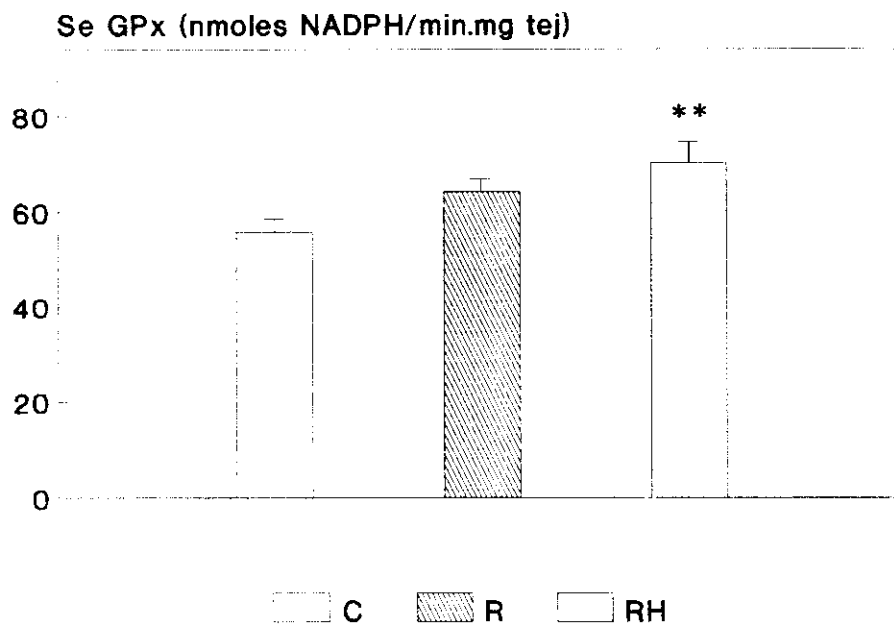
Tabla IX. Actividad CAT en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

CAT RIÑÓN

	<u>$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min.mg tej}$</u>	<u>$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min.mg prot}$</u>
C	12,2 \pm 2,4 (7)	55,0 \pm 11,8 (7)
R	12,9 \pm 1,9 (7)	56,2 \pm 8,0 (7)
RH	11,7 \pm 1,6 (7)	53,3 \pm 7,3 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética \pm error estándar.

() = número de datos



RIÑON

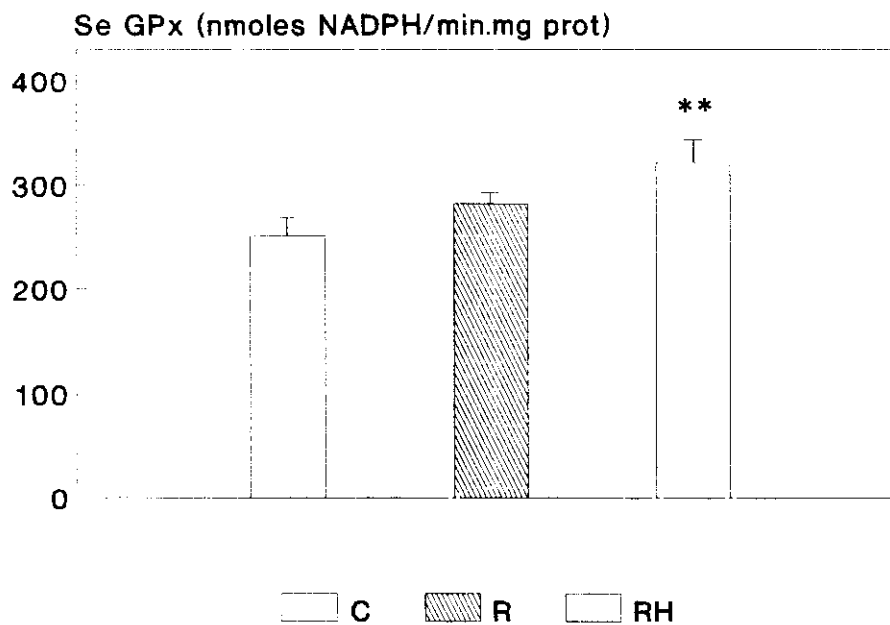


Figura 10.- Actividad Gpx Se-dependiente, total y específica, en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla X. Actividad GPx Se dependiente en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

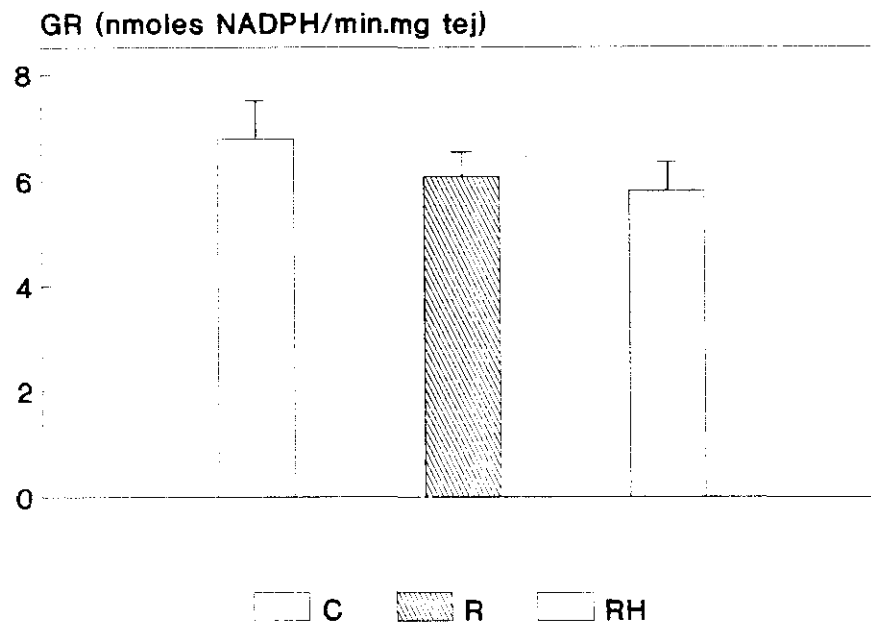
GPx RIÑON

	<u>nmoles NADPH/min.mg tej</u>	<u>nmoles NADPH/min.mg prot</u>
C	55,8 ± 2,4 (7)	251 ± 17 (7)
R	64,2 ± 2,7 (7)	282 ± 12 (7)
RH	70,2 ± 4,0 (7) **	322 ± 21 (7) **

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.
Los asteriscos muestran las diferencias significativas respecto al grupo control (C).

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

() = número de datos



RIÑÓN

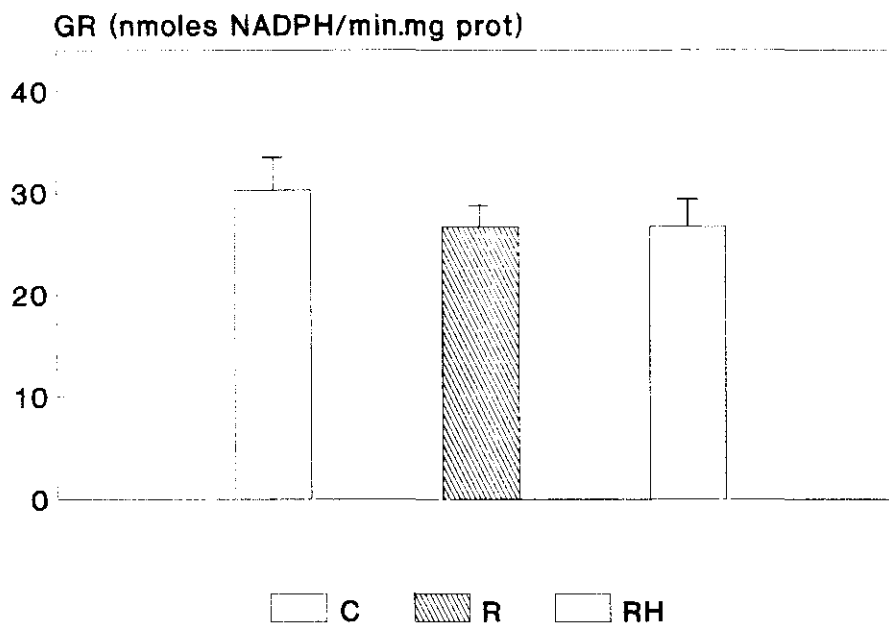


Figura 11.- Actividad GR, total y específica, en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla XI. Actividad GR en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

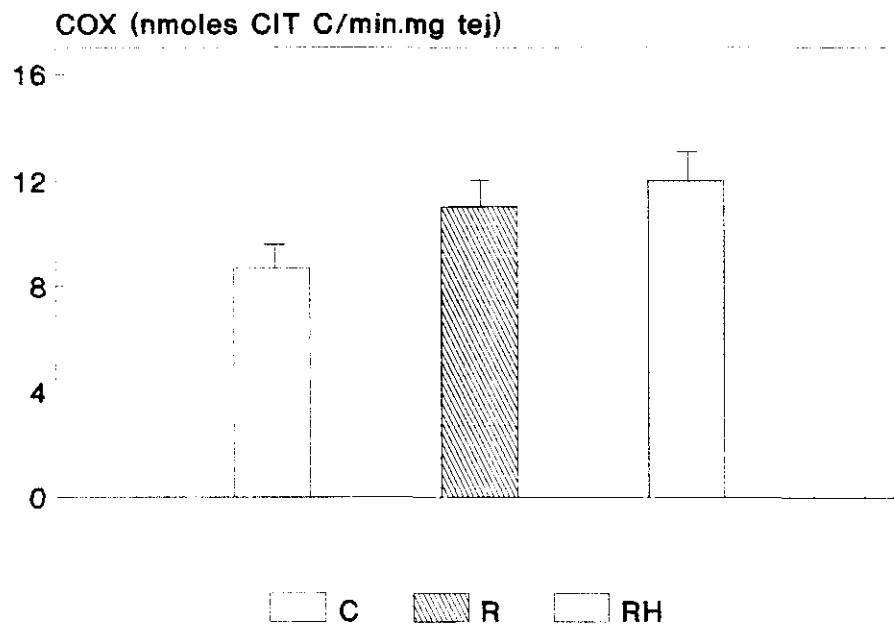
GR RIÑON

	<u>nmoles NADPH/min.mg tej</u>	<u>nmoles NADPH/min.mg prot</u>
C	6,79 ± 0,70 (7)	30,3 ± 3,2 (7)
R	6,07 ± 0,45 (7)	26,7 ± 2,0 (7)
RH	5,81 ± 0,55 (7)	26,7 ± 2,6 (7)

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.
() = número de datos

E. Citocromo-oxidasa (Figura 12, tabla XII)

En el grupo de animales restringidos en hidratos de carbono existe un aumento de la actividad citocromo oxidasa específica, que llega a ser significativa ($p < 0,05$). En lo que se refiere al grupo de restricción calórica global, la actividad citocromo oxidasa específica también está aumentada con respecto al control, pero este aumento no llega a ser significativo. La actividad citocromo oxidasa referida a mg de tejido presenta la misma tendencia que en el caso de la actividad específica pero que ni para el grupo R ni para el RH llega a ser significativa.



RIÑON

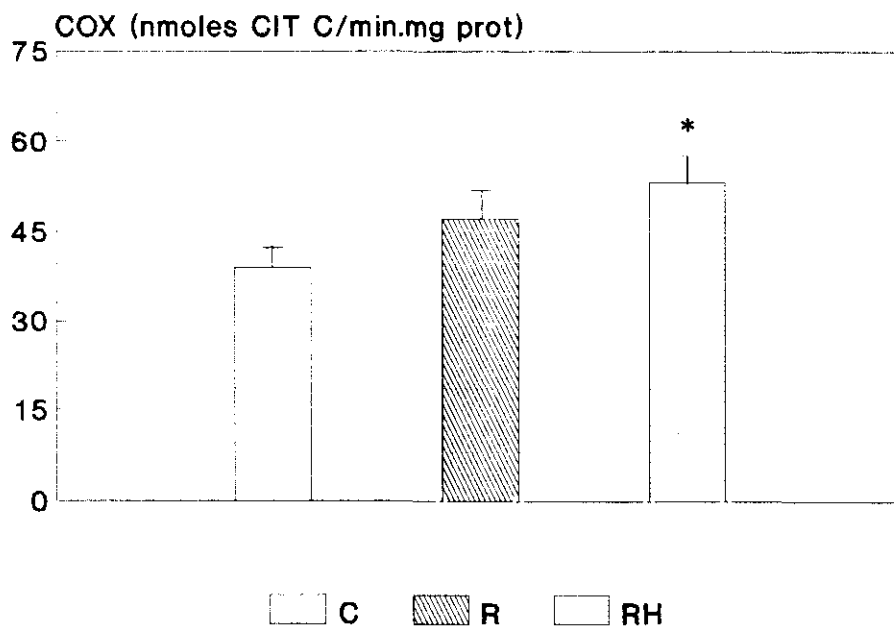


Figura 12.- Actividad COX, total y específica, en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

Tabla XII. Actividad COX en el riñón de ratones controles (C), restringidos (R), y restringidos en hidratos de carbono (RH).

<u>COX RIÑÓN</u>		
	<u>nmoles CIT C/min.mg tej</u>	<u>nmoles CIT C/min.mg prot</u>
C	8,7 ± 0,8 (7)	39 ± 3,7 (7)
R	11 ± 1,0 (7)	47 ± 4,9 (7)
RH	12 ± 1,1 (7)	53 ± 4,8 (7)*

Los resultados están expresados como media aritmética ± error estándar.

Los asteriscos muestran las diferencias significativas existentes con respecto al grupo control (C).

* p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001

() = número de datos

DISCUSSION

Durante el período de restricción calórica global y de hidratos de carbono, la evolución del peso corporal de los tres grupos experimentales con el tiempo muestra claras diferencias significativas en el grupo R (disminuye el 18%), y en el grupo RH (disminuye el 27%) con respecto al grupo control, lo cual está en concordancia con lo observado por otros autores, cuando el grado de restricción calórica era igualmente del 40%, siendo en estos casos la reducción de peso del 25% a los 6 meses (Laganieri y Yu, 1989a) o del 28% y 23% a los 12 y 24 meses respectivamente (Koizumi *et al.*, 1987).

Cuando la restricción calórica es impuesta en roedores jóvenes, el crecimiento es inhibido y por lo tanto da lugar a animales más pequeños. McCay y colaboradores en 1935 (McCay *et al.*, 1935), interpretaron el fenómeno de aumento de la longevidad debido a la restricción calórica basándose en este hecho. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la masa corporal (sin considerar la grasa), aumenta en ratas sometidas a restricción calórica durante el 70% de su vida (Enesco *et al.*, 1991). En coincidencia con la literatura nuestro estudio presentó en lo que al grupo R se refiere, un aumento de peso a lo largo del período de experimentación pero más lento que los controles. Sin embargo, en el grupo RH se produce el efecto contrario, disminución del peso en las primeras semanas, si bien entre las 16 y 20 semanas se corrige ligeramente aumentando de peso, pero sin llegar al peso original. El crecimiento de los animales del grupo RH es menor que el que se observa en el grupo R. De cualquier manera el peso del grupo RH no tiene por qué seguir la misma pauta que la indicada por Enesco y colaboradores, pues el tipo de restricción es distinta.

La ingesta del grupo control, la cual fue comprobada periódicamente, fue muy constante a lo largo del período de experimentación. Como la ingesta de los animales restringidos dependía directamente de lo ingerido por el grupo control, estos resultados nos dan idea de una uniformidad de las condiciones, en lo que a la restricción se refiere, a lo largo del período de estudio.

En el presente trabajo realizamos valoraciones de la enzimas antioxidantes

SOD, CAT, GPx, GR y de la capacidad aeróbica máxima COX, en el hígado y el riñón de ratón con objeto de observar el papel de dichas actividades en el fenómeno de la restricción calórica.

Cuando se comparan los resultados obtenidos por diferentes autores en relación con la restricción calórica, hay que tener en cuenta tanto el tipo de restricción aplicada como la duración de dicho tratamiento.

En cuanto al tipo de restricción, existe variabilidad tanto su grado, como en la manera en que ésta se llevaba a cabo, pues hay autores que realizan la restricción dando alimento a los animales en días alternos, en cambio otros reducen la ingesta de calorías diarias, como es nuestro caso, consiguiendo así un mayor control para este tipo de tratamiento.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que en la mayor parte de los trabajos realizados previamente, los animales restringidos están sometidos a una reducción de la ingesta de vitaminas y minerales, por lo que si lo que perseguimos es ver el efecto de la restricción calórica únicamente, y no un efecto combinado debido a una deficiencia vitamínica o de minerales, se tendría que suplementar la dieta de los animales restringidos con estos elementos. En el presente trabajo hemos tenido en cuenta este hecho por lo que hemos añadido a la dieta vitaminas y minerales en la misma proporción en que la restricción había sido aplicada, de modo que la ingesta final de estas sustancias esenciales era la misma en los tres grupos. De los trabajos realizados hasta la fecha por otros autores, son escasos en los que se controle este factor (Koizumi *et al.*, 1987; Laganier y Fernandes, 1991).

Debido al tipo de valoraciones realizadas, enzimas antioxidantes, hay que tener muy en cuenta que un descenso en la ingesta de vitaminas antioxidantes podría inducir a estas enzimas. Se precisa por lo tanto trabajos en los que se realice un buen control de la dieta en este sentido.

Por otro lado, la mayoría de los trabajos sobre restricción calórica, no son

tan completos como el presente estudio en cuanto al número de enzimas antioxidantes valoradas. Una gran proporción de éstos están realizados en rata, y sólo alguno en ratón (Koizumi *et al.*, 1987). La mayor parte son longitudinales a largo plazo, en los que se valoraban a distintos tiempos las diferencias entre el grupo restringido y el control. En estos trabajos, las valoraciones realizadas en los primeros meses de restricción son equiparables en la mayoría de los casos a nuestro estudio a corto plazo, siempre salvando las distancias que suponen el método empleado, el tipo de restricción y la especie utilizada.

El hígado ha sido el órgano más estudiado en los trabajos más recientes de restricción calórica. Nuestros resultados en este órgano muestran que la actividad superóxido dismutasa (SOD), tanto específica como total, no varía significativamente con respecto al grupo control. Estos resultados coinciden con otros autores en trabajos realizados en hígado de rata. Entre éstos están los realizados en ratas Fischer 344 y con un grado de restricción similar al empleado por nosotros pero sin control de las vitaminas y minerales, en los que no se han encontrado aumentos significativos de la actividad SOD a los 2,5 meses de tratamiento (Rao *et al.*, 1990; Masoro *et al.*, 1991). Pieri y colaboradores, por otra parte, en trabajos realizados en ratas Wistar hembras coinciden con nuestros resultados a los 2,5 meses de restricción, aunque en este caso se realizó por el método de dar a los animales de comer en días alternos (Pieri *et al.*, 1992). Por otro lado, Koizumi y colaboradores, en ratón con igual grado de restricción al empleado por nosotros, y con suplementación en vitaminas y minerales no encuentran, coincidiendo con nosotros, variaciones en la actividad SOD a corto plazo (Koizumi *et al.*, 1987). Sin embargo, cuando la restricción se realizó a largo plazo (1-2 años), se encontraron aumentos en la SOD en animales restringidos viejos respecto a los controles viejos (Rao *et al.*, 1990).

De forma análoga a lo que ocurría con la actividad superóxido dismutasa, ocurre con la actividad catalasa; no se observan variaciones significativas de dicha actividad durante el período de restricción calórica de 2 meses con respecto al grupo control. Entre las enzimas antioxidantes, la catalasa ha sido la más estudiada en relación con este tema, no en vano fue en la primera enzima en la que se observó un aumento durante la restricción. En 1969 Ross observó que en los animales restringidos aumentaba la CAT en ratas viejas, y en cambio no se observaba variación de dicha actividad en ratas

jovenes y por lo tanto sometidas a un corto período de restricción, (Ross *et al.*, 1969) lo cual estaría en concordancia con los datos obtenidos en nuestro trabajo. Existen otros trabajos realizados recientemente en ratas Fischer 344 machos y con el mismo grado de restricción al empleado por nosotros que apoyan nuestros resultados en el sentido de que no se observan variaciones significativas de la actividad catalasa, (Rao *et al.*, 1990). Igualmente Koizumi y colaboradores tampoco encuentran variaciones significativas para esta actividad. El trabajo realizado por estos autores es especialmente comparable con el nuestro pues tanto la especie empleada, como el grado de restricción y la suplementación vitamínica y de minerales coinciden con nuestro trabajo (Koizumi *et al.*, 1987). Existen también trabajos en hígado de ratas Fischer 344 con el mismo tipo de restricción que la impuesta en el presente estudio, en los que sus resultados no están en concordancia con los nuestros, ya que en estos estudios se observan aumentos significativos de la actividad catalasa en períodos de restricción cortos (Masoro *et al.*, 1991; Laganieri y Yu, 1989b). No obstante, en períodos de restricción a largo plazo, se producían aumentos en la actividad catalasa cuando se comparaban animales viejos restringidos con controles de la misma edad (Koizumi *et al.*, 1987; Semsei *et al.*, 1989; Laganieri y Yu, 1989b; Rao *et al.*, 1990; Pieri *et al.*, 1992; Masoro, 1991).

En estudios sobre restricción calórica la glutatión peroxidasa es una enzima que, al igual que la catalasa, ha sido ampliamente estudiada. Los resultados sobre la GPx nos muestran que esta enzima presenta valores más altos en los ratones restringidos con respecto al grupo control pero, aunque no se alcanza la significación, es la enzima que más cerca está de ella. Existe bastante variabilidad en cuanto a los resultados de otros autores en relación con esta enzima en hígado. En concordancia con nuestros datos están por una parte los trabajos de Masoro y colaboradores realizados en hígado de rata Fischer 344 en los que no se observa un aumento significativo de la actividad glutatión peroxidasa (Masoro *et al.*, 1990) y los realizados por otros autores también en hígado de rata y bajo un 40% de restricción en los que la actividad GPx permanece invariable con respecto al grupo control (Rao *et al.*, 1990). En ratas Lobund Wistar sometidas a una restricción del 30% a corto plazo se observó por ejemplo, que la GPx aumentaba significativamente con respecto al grupo de ratas controles (Chen *et al.*, 1992). En restricción calórica del 40%, como la utilizada por nosotros pero sin suplementación en vitaminas y minerales, se

observó que esta actividad aumentaba significativamente en ratas Fischer 344 restringidas después de 1,5 meses de tratamiento (Laganiere y Yu, 1986b). Por otra parte, en restricción realizada a largo plazo se encontraron aumentos significativos de la actividad GPx en animales restringidos viejos con respecto a controles del mismo tiempo (Rao *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992).

En el hígado la única enzima que presenta valores inferiores a los del control es la glutatión reductasa, aunque no existen diferencias significativas. Al igual que ocurría con la glutatión peroxidasa existe mucha variabilidad en los datos de la GR en la literatura. Por ejemplo, en ratas Fischer 344 restringidas al 60% de la ingesta del control, no se observaron cambios en la actividad glutatión reductasa a los 1,5 meses de restricción. Sin embargo, cuando se analizaba dicha enzima a los 4,5 meses de restricción se observaba un aumento significativo (Laganiere y Yu, 1989b). En este mismo tipo de ratas e igual grado de restricción, otro autor tampoco observa incrementos significativos de dicha actividad a los 6 meses de tratamiento. (Masoro *et al.*, 1990). En restricción calórica del 30% realizada a corto plazo, en ratas macho Lobund Wistar se observó un aumento significativo de actividad glutatión reductasa en ratas libres de germen, pero ninguna variación en ratas convencionales (Chen *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando se sometieron a períodos de restricción largos (1-2 años), se encontraban incrementos significativos en la GR en animales restringidos viejos con respecto a los animales controles de la misma edad (Laganiere y Yu, 1989b; Masoro, 1991).

En cuanto a la actividad citocromo oxidasa hepática, no conocemos ningún trabajo de restricción calórica realizado hasta la fecha en el que se mida dicha enzima. En nuestros resultados se observa que esta actividad no aumenta significativamente. Por una parte esta enzima nos da idea de la capacidad aeróbica máxima, lo cual sería importante en cuanto a su relación con los radicales de oxígeno, y por otra parte nos sirve como control ya que no actuaría al mismo nivel que las enzimas antioxidantes, y por lo tanto nos ayudaría a intuir si la variación en las enzimas es específico de enzimas antioxidantes o están también implicadas otras actividades enzimáticas.

En la actualidad existen muy pocos trabajos que estudien la restricción

calórica generalizada en el riñón. La mayoría de los trabajos realizados en este órgano, en relación con este tema, se han basado en la restricción proteica. Estos estudios se han realizado de esta manera porque se sabe que la restricción de proteínas disminuye la incidencia de nefropatías, las cuales son una de las principales enfermedades asociadas con la edad en ratas (Sambuichi, 1991; Masoro *et al*, 1991).

Los resultados del presente trabajo en el riñón indican que las enzimas antioxidantes no sufren ninguna variación significativa en la restricción a corto plazo. El único trabajo conocido por nosotros en el que se estudie en riñón las actividades enzimáticas después de la restricción calórica, valora únicamente la actividad glutatión reductasa, no produciéndose ninguna variación significativa en los primeros meses, aunque sí se producían aumentos de dicha actividad cuando la restricción se realizaba a largo plazo (Laganieri y Fernandes, 1991). En este trabajo al igual que en el nuestro, se suplementó la dieta con vitaminas y minerales.

En cuanto al grupo experimental de restricción en hidratos de carbono, el presente trabajo es novedoso pues este tipo de tratamiento, reduciendo un único componente de la dieta, no se había sido realizado hasta la fecha por ningún otro autor. Si bien es cierto que llevado a cabo reducciones en la ingesta de proteínas, (Sambuichi , 1991; Masoro *et al.*, 1991) éstas se realizaron disminuyendo del porcentaje de proteínas, pero con dieta isocalórica. Además, debido a la baja proporción existente de proteínas en la dieta normal de rata-ratón una restricción del 40% no es posible. Por lo tanto, dada la novedad del trabajo no puede realizarse una discusión de nuestros resultados con otros autores.

No se observa ninguna variación significativa de las enzimas antioxidantes o de la citocromo oxidasa en el hígado de los animales restringidos en hidratos de carbono con respecto a los controles.

En el riñón de los ratones sometidos a restricción de hidratos de carbono, se observa un aumento significativo de la actividad glutatión peroxidasa; esta enzima muestra también una tendencia al alza en animales de restricción calórica global tanto en

el hígado como en el riñón.

La actividad citocromo oxidasa específica también muestra un incremento significativo en el riñón del grupo RH. Sin embargo, la actividad total no se ve afectada, aunque está muy cerca de la significación.

El aumento de la actividad glutatión peroxidasa en el riñón de animales restringidos en hidratos de carbono, podría significar una mayor capacidad de detoxificación de hidroperóxidos, aunque también podría representar un ajuste frente a una capacidad aeróbica máxima aumentada.

En el riñón del grupo de animales restringidos en hidratos de carbono el resto de las enzimas no varían significativamente, al igual que ocurría en el riñón de restricción calórica global.

Muchos de los estudios sobre restricción calórica en rata y ratón muestran, salvo excepciones (Chen *et al.*, 1992), una disminución de las enzimas antioxidantes con la edad. Por otra parte, como ya hemos explicado, en períodos de restricción calórica mayores de 12 meses la tendencia generalizada es la de un aumento significativo de las enzimas antioxidantes en animales restringidos con respecto al control de la misma edad (Ross, 1969; Koizumi *et al.*, 1987; Semsei *et al.*, 1989; Weindruch, 1989; Laganiere y Yu, 1989b; Rao *et al.*, 1990; Masoro *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Pieri *et al.*, 1992). Esto unido al hecho, corroborado por el presente trabajo, de que en períodos de restricción cortos no varían las enzimas antioxidantes, parece indicar que la restricción calórica actúa atenuando el declive generalizado de estas enzimas con la edad más que induciendo dichas actividades. Si fuera así, se esperaría un aumento significativo de las enzimas antioxidantes tanto en períodos de restricción cortos como a largo plazo. Además, en la mayoría de los casos, los animales restringidos también presentan un declive de sus actividades enzimáticas antioxidantes y nunca superan los valores de los animales controles jóvenes.

Es posible que el aumento de enzimas antioxidantes en la restricción calórica

no sea el responsable de los efectos producidos por este tipo de tratamiento (aumento hasta un 50% de la vida máxima, retraso incidencia de tumores, etc.), ya que las variaciones de estas enzimas no son tan acusadas como para justificar unos efectos tan espectaculares. Por lo tanto podríamos decir, que aunque si bien un aumento en las enzimas antioxidantes puede mejorar el estado general del organismo, estas variaciones podrían ser, cuando se producen, efecto de la restricción calórica más que causa de sus notables efectos sobre la longevidad.



CONCLUSIONES

1) La restricción calórica global a corto plazo, no produce variaciones significativas de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa ni de la capacidad aeróbica máxima (citocromo oxidasa) en el hígado y el riñón.

2) La restricción en hidratos de carbono a corto plazo, en el hígado no modifica la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa ni de la capacidad aeróbica máxima (citocromo oxidasa); produciendo en el riñón aumentos significativos de las actividades glutatión peroxidasa y citocromo oxidasa.

3) El aumento de la actividad glutatión peroxidasa en el grupo de restringidos en hidratos de carbono podría significar una mayor capacidad de detoxificación de hidroperóxidos en el riñón. Sin embargo, es posible que este cambio represente un ajuste frente a una mayor capacidad aeróbica máxima.

4) La comparación de nuestros resultados con los disponibles en la bibliografía sugiere que la restricción calórica no actuaría, como se ha indicado a veces, induciendo las enzimas antioxidantes, sino atenuando el declive de las mismas en animales viejos. El papel de este efecto en el desarrollo del fenómeno de la restricción calórica no ha sido aún aclarado.

BIBLIOGRAFIA

AMES V.N., CATHCART R., SCHWIERS E. y HOCHSTEIN P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant -and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 6858-6862.

BEERS R.F. y SIZER I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140.

CERAMI A. (1985). Hypothesis: Glucose as a mediator of aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* **33**: 626-634.

CUTLER R.F. (1984). Antioxidants, aging, and longevity. En: *Free Radicals in Biology*, vol VI (W.A. Pryor Ed.). Academic Press. New York. pp 379-428.

CUTLER R.G. (1986). Aging and oxygen radicals. En: *Physiology of Oxygen Radicals* (Taylor A.E., Matlon S., Ward P. Eds.). Am. Physiol. Soc. Bethesda, MD. Clinical Monograph Series. pp. 251-285.

CHANCE C., SIES H. y BOVERIS A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.*, **59**: 527-605.

CHEN L.H. y SNYDER D.L. (1991). Effects of age, dietary restriction and germ-free environment on glutathione-related enzymes in Lobund-Wistar rats. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **14**: 17-26.

DAVIES K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. General Aspects. *The Journal of Biological Chemistry.* **262**: 9895-9901.

-
- DAVIES K.J.A., DELSIGNORE M.E. y LIN S.W. (1987a). Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**: 9895-9901.
- DAVIES K.J.A. y DELSIGNORE M.E. (1987b). Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of secondary and tertiary structure. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**: 9895-9901.
- DEL MAESTRO R.F. y McDONALD W. Oxidative enzymes in tissue homogenates. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. pp. 291-293.
- DEL RIO L.A., SANDALIO L.M. y PLAMA J.M. (1990). A new cellular function for peroxisomes related to oxygen free radicals. *Experientia* **46** : 989-992.
- ENESCO H.E., SHIMOKAWA I, y YU B.P. (1991). Effect of dietary restriction and aging on polyploidy in rat liver. *Mechanisms of Ageing and Development*. **59**: 69-78.
- FRAGA C.G., SHINEGAGA M.K., PARK J.W., DEGAN P., y AMES B. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4533-4537.
- FRIDOVICH I. (1979). Superoxide and superoxide dismutases. *Avanc. inorg. Biochem.*, **1**: 1-40.
- GILMAN-SACHS A., KIM Y.M., POLLARD M., y SNYDER D.L.(1991). Influence of aging, environmental antigens, and dietary restriction on expression of lymphocyte subsets in germ-free and conventional Lobund-Wistar rats. *Journal of Gerontology*. **46**: B101-106.
- HALLIWELL B. (1981). Free Radicals, oxygen toxicity and aging. En: Age Pigments (Sohal R.S. Ed.). Elsevier. North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp 1-62.

-
- HALLIWELL B. y GUDTTERIDGE J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. New York.
- INGRAM D.K., CUTLER R. G., WEINDRUCH R., RENQUIST D.M, KNAPKA J.J., APRIL M., BELCHER C.T., CLARK M.A., HATCHERSON C.D., MARRIOTT V.M. y ROTH G.S. (1990). Dietary restriction and aging: the initiation of a primate study. *Journal of Gerontology*. **45**: B148-163.
- KOIZUMI A., WEINDRUCH R., y WALFORD R. (1987). Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *The Journal of Nutrition*. **117**: 361-367.
- LAGANIERE S. y FERNANDES G. (1991). Study on the lipid composition of aging Fischer-344 rat lymphoid cells: effect of long-term calorie restriction. *Lipids* **26**: 472-478.
- LAGANIERE S. y YU B.P. (1987). Anti-lipoperoxidation action of food restriction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **145**: 1185-1191.
- LAGANIERE S. y YU B.P. (1989a). Effect of chronic food restriction in aging rats I. Liver subcellular membranes. *Mechanisms of ageing and development*. **48**: 207-219.
- LAGANIERE S. y YU B.P. (1989b). Effect of chronic food restriction in aging rats II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes. *Mechanisms of ageing and development*. **48**: 221-230.
- LEWIS S.E.M., GOLDSPIND D. F., PHIPLIPS J.G., MERRY B.J. y HOLEHAN A.M. (1985). The effects of ageing and chronic dietary restriction on whole body growth and protein turnover in the rat. *Exp. Gerontol.*, **20**: 353-263.

-
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MARKLUND S., MARKLUND G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
- MASORO E.J. (1992). A dietary key to uncovering aging processes. *NIPS* **7**: 157-160.
- MASORO E.J., KATZ M.S., y McMAHAN C.A. (1989). Evidence for the glycation hypothesis of aging from the food-restricted rodent model. *Journal of Gerontology.* **44**: B-20-22.
- MASORO E.J. y McCARTER R.J.M. (1991). Aging as a consequence of fuel utilization. *Aging.* **3**: 117-128.
- MASORO E.J., SHIMOKAWA I. y YU B.Y. (1991). Retardation of the aging processes in rats by food restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **621**: 337-351.
- McCARTER R., MASORO E.J. y YU B.P. (1985). Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate?. *Am. J. Physiol.* **248**: E488-490.
- McCAY C., CROWEEL M. y MAYNARD L. (1935). The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. *J. Nutr.* **10**: 63-79.
- McCORD J.M. y FRIFOVICH I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocytorein (haemocytorein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- MEDVEDEV Z.A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev.* **65**: 375-398.

-
- MIQUEL J. ECONOMOS A.C., FLEMING J. y JOHNSON J.R. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* **15**: 575-591.
- NOHN H. Y HEGNER D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals *in vivo* ?. *Europ. J. Biochem.*, **82**: 563-567.
- OSHINO N., JAMIESON D. SUGNO T. y CHANCE B. (1975). Optical measurement of the catalase-hydrogen peroxide intermediate (compound I) in the liver of anaesthetised rats. Its implication to hydrogen peroxide *in situ*. *Biochem. J.* **146**: 53-56.
- PAGLIA D.E. y VALENTINE W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**: 158-169.
- PEARL R. (1928). The rate of living. University of London Press.
- PIERI C., FALASCA M., MARCHESELLI F., MORONI F., RECCHIONI R., MARMOCCHI F. y LUPIDI G. (1992). Food restriction in females Wistar rats: V. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the liver. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **14**: 93-99.
- PITSIKAS N., GAROFALO P., MANFRIDI A., ZANOTTI A., y ALGERI S. (1991). Effect of lifelong hypocaloric diet on discrete memory of senescent rat. *Aging.* **3**: 147-152.
- PRYOR W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* **48**: 657-67.
- RAO G., XIA E., NADAKAVUKAREN M.J. y RICHARDSON A. (1990). Effect of Dietary Restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *The Journal of Nutrition.* **120**: 602-609.

-
- RATTAN S.I.H., WARD W.F., GLENTING M., SVENDSEN L, RIIS B. y CLARK B.F.C.(1991). Dietary calorie restriction does not affect the levels of protein elongation factors in rat livers during ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. **58**: 85-91.
- ROSS M.H. (1969). Aging, nutrition and hepatic enzyme activity pattern in the rat. *The Journal of Nutrition*. **97**: 563-602.
- ROTH E.F. y GILBERT H.S. (1984). The pirogallol assay for superoxide dismutase: absence of a glutation artifact. *Analytical Biochemistry* **137**: 50-53.
- RUBNER M. (1908). Das problem der lebensdauer und seine beziehungen zu wachstum und ernährung. Oldenburg R. ed. München.
- SACHER G.A. (1977). En: Handbook of the Biology of Aging. (Finch C. y Hayflick L. eds.). New York: Reinhold. pp. 582-639.
- SAMBUICHI E.J., SHIZUKA F., y KISHI K. (1991). The influence of dietary protein on lipid peroxide formation in old, food restricted rats. *Nutrition research*. **11**: 1415-1426.
- SAUL R.L., GEE P. y AMES B.N. (1987). En: Modern Biological Theories of Aging (Warner H.R. *et al.* eds.). Raven Press. New York.
- SCHUCKELT R., BRIGELIUS-FLOHE R., URSINI F., FLOHE L. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDna and aminoacid sequencing. *Free. Rad. Res. Comms*. **14**: 343-361.
- SEMSEI I., RAO G. y RICHARDSON A. (1989). Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a funtion of age and dietary restriction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **167**: 620-625.

-
- SIMIC M.G. (1992). The rate of DNA damage and aging. En: Free Radicals and Aging (Emerit I., Chance B. Eds.) Birkhäuser Verlag Basel. Switzerland.
- SIMONETTI I., DE TATA V., DEL ROSO A., GORI Z. y BERGAMINI (1990). Changes in the transmural distribution of antioxidant enzymes activities across the left ventricle heart wall from rats fed ad libitum or food-restricted during growth and aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **10**: 163-171.
- SMITH L. (1955). Spectrophotometric assays of cytochrome c oxidase. En: Methods of Biochemical Analysis. Vol.2 (Gick D. Ed.) Wiley- Interscience. New York. pp.427-434.
- SOHAL R.S. y ALLEN R.G.(1986). Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv. in Free Rad. Med.* **2**: 117-160.
- SOHAL R.S., ARNOLD L. y ORR W.C. (1990). Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ IN *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **56**: 223-235.
- SOHAL R.S., FARMER K.J., ALLEN R.G., y COHEN N.R. (1983). Effect of age on oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides and chloroform-soluble antioxidants in the adult males housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* **24**: 185-195.
- SOUTHORN P.A., POWIS G. y PHIL D. (1988). Free radicals in Medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.* **63**: 381-389.
- STADTMAN E.R. (1988). Biochemical markers of aging. *Experimental Gerontology* **23**: 327-347.

-
- STADTMAN E.R., STARKE-REED P.E., OLIVER C.N. CARNEY J.M. y FLOYD R.A. (1992). Protein modification in aging. En: Free Radicals and Aging (Emerit I., Chance B. Eds.) Birkhäuser Verlag Basel. Switzerland.
- VIIDIK A. (1991). Past, present and future nutrition, ageing and longevity of men and mice. *European Journal of Gerontology*. **1**: 34-46.
- WEAARCHAKUL N., STRONG R., WOOD W.G. y RICHARSON A. (1989). The effect of aging and dietary restriction on DNA repair. *Experimental Cell Research*. **181**: 197-204.
- WEINDRUCH R.H. (1989). Dietary restriction, tumors, and aging in rodents. *Journal of Gerontology*. **44**: 67-71.
- WEINDRUCH R.H. y WALFORD R.L. (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: Effect on lifespan and spontaneous cancer incidence. *Science*. **215**: 1415-1418.
- WOLFF S.P. y DEAN R.T. Glucose autoxidation and protein oxidation: role of autoxidative glycosilation in diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J.* **245**: 243-250.
- YU B.P., MASORO E.J., McMAHA C.A. (1985). Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats. I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J. Gerontol.* **40**: 657-670.
- YUSA T., BECKMAN J.S., CRAPO D. y FREEMAN B.A. (1987). Hyperoxia increases H₂O₂ production by brain *in vivo*. *J. Appl. Physiol.* **63**: 353-358.